

XXXII. OTDK Agrártudományi Szekció

Rezervoárja-e a keleti sün a *Borrelia burgdorferi* sensu lato baktériumoknak?

Készítette: Gajdos Mónika

Állatorvosi, V. évfolyam

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

Témavezető: Dr. Földvári Gábor

Parazitológiai és Állattani Tanszék

SZIE-ÁOTK, egyetemi adjunktus



Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Parazitológiai és Állattani Tanszék

Budapest

2015

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzések.....	2
2.	Irodalmi áttekintés	3
2.1.	A keleti sün, <i>Erinaceus roumanicus</i> (Barrett-Hamilton, 1900)	3
2.2.	Sünök és ektoparazitáik.....	5
2.2.1.	Ektoparazita csáprágósok.....	5
2.2.2.	Ektoparazita rovarok	6
2.3.	A kullancsok.....	7
2.4.	A <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	8
3.	Anyag és módszer.....	11
3.1.	Vizsgálati állatok	11
3.2.	Xenodiagnózis.....	12
3.3.	Molekuláris laboratóriumi vizsgálatok	15
3.3.1.	DNS-kivonás.....	15
3.3.2.	PCR-vizsgálat.....	17
3.3.3.	Gél-elektroforézis	19
3.3.4.	Szekvenálás.....	19
4.	Eredmények.....	20
4.1.	Fülbiopsziás szövetminták.....	20
4.2.	Vérkenetek	21
4.3.	Xenodiagnózis.....	21
5.	Megbeszélés	22
6.	Összefoglalás	25
7.	Summary.....	26
8.	Köszönetnyilvánítás.....	27
9.	Irodalomjegyzék	28

1. Bevezetés és célkitűzések

A keleti sün (*Erinaceus roumanicus*) hazánkban őshonos kisemlős, mely a természetes és urbánus területeken egyaránt nagy számban fordul elő. Ezek a kisemlősök gyakori gazdái a Magyarországon igen nagy számban előforduló *Ixodes ricinus* valamint az *Ixodes hexagonus* kullancsfajoknak, melyek többek között a *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) biológiai vektorai. A sünök méretük és életmódjuk miatt a kullancsok mindhárom fejlődési alakjának gazdái, így az általuk terjesztett kórokozók fenntartásában és terjesztésében egyaránt kiemelkedő szerepet játszanak.

A *B. burgdorferi* s.l. fajcsoportba tartozó spirochaeta baktériumok kullancs vektorok közvetítésével terjednek a gerinces állatok között, és emberi fertőződés esetén a Lyme borreliosis nevű kórképet alakítják ki. Még napjainkban sem tisztázott, hogy pontosan mely gerinces állatok töltenek be rezervoár szerepet a kórokozó életciklusában. Fontos lenne azonban, hogy felderítsük azokat az alapvető járványtani összefüggéseket, melyek rávilágítanak a keleti sün potenciális szerepére a (sokszor városi) megbetegedések fenntartásában.

Kutatásom során a Fővárosi Állat- és Növénykert menhelyén található, Budapestről és környékéről begyűjtött keleti sünöket vizsgáltunk egy csekély fájdalmat okozó kísérletben. A keleti sün rezervoár szerepének igazolására, azaz, hogy a *B. burgdorferi* s.l. fajcsoportba tartozó baktériumok képesek-e átadódni a fertőzést közvetítő ízeltlábú vektorokba, xenodiagnosztikai módszert alkalmaztunk.

Célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- korábbi leírások alapján egy xenodiagnosztikai kísérletet megtervezni és kivitelezni;
- kideríteni, hogy a rágcsálókra általánosan alkalmazott xenodiagnosztikai módszer a keleti sünnre alkalmazható-e;
- kísérletesen igazolni a keleti sün rezervoár szerepét a *B. burgdorferi* s.l. fertőzés tekintetében.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A keleti sün, *Erinaceus roumanicus* (Barrett-Hamilton, 1900)

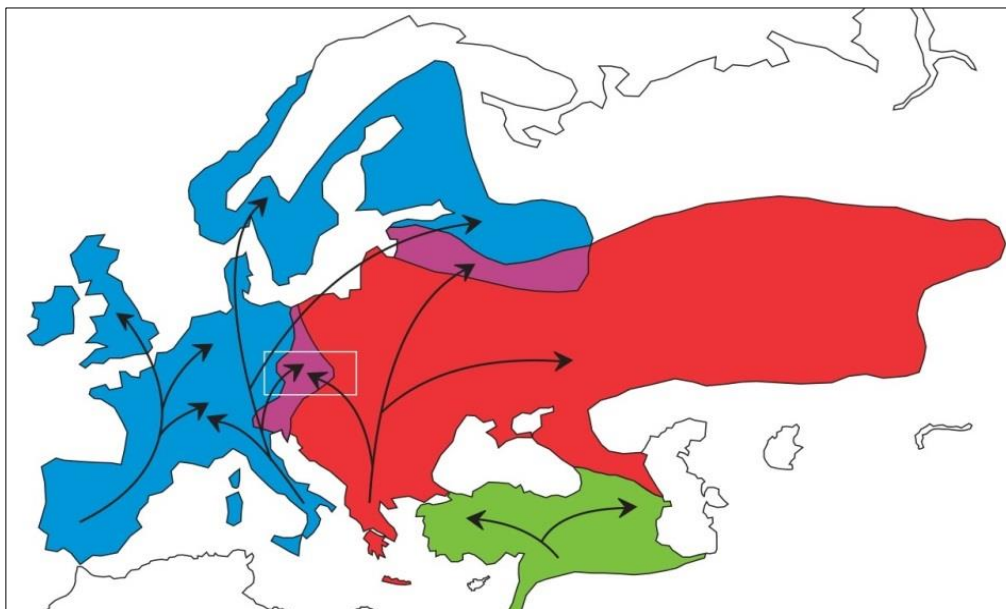
Mivel a hazánkban élő keleti sünek tökéletesen alkalmazkodtak a városi életmódhoz, a városlakó emberek közvetlen környezetében is megtalálhatóak ezek a kisemlősök. Számos kórokozócsoport (pl. vírusok, baktériumok, gombák) potenciális gazdája lehet (Rigó et al., 2012; Földvári et al., 2014), ezért fontos, hogy tisztában legyünk e faj életmódjával és ökológiájával.



1. ábra. A vizsgálatban résztvevő egyik keleti sün (*E. roumanicus*)

A keleti sünt a Mammalia osztályba, az Erinaceiformes rendbe és az Erinaceidae családba soroljuk (1. ábra). Testhossza 30-35 cm, farokhossza 4-5 cm, testtömege pedig 0,5-1,8 kg között változik (Bihari, 2007). Közép-Európában széles körben elterjedt, Lengyelországban, Szlovéniában és Görögországban egyaránt megtalálható, élőhelye egészen Nyugat-Szibériáig húzódik. Észak-Amerikába és Ausztráliába egyaránt betelepítették. Magyarország egész területén megtalálható, legnagyobb számban az északkeleti régióban. Az Európában előforduló további két sünfaj a nyugati sün (*Erinaceus europaeus*) és a kisázsiai sün (*Erinaceus concolor*). Az *E. roumanicus* hosszú ideig az *E. europaeus*, majd az *E.*

concolor alfajának tekintették, 2005-től (Wilson & Reader, 2005) azonban önálló fajként tartják számon (2. ábra). Legjellemzőbb morfológiai eltérés a két faj között, hogy a nyugati sün mellkasának közepe sötétbarna színű, azonban a keleti sünnél ez minden esetben fehér (Aulagnier et al., 2009).



2. ábra. Az *E. europaeus* (kék), *E. roumanicus* (piros) és *E. concolor* (zöld) előfordulása a Nyugati-Paleartikumban. A szimpatrikus régiók lila színnel vannak jelölve. Az utolsó jégkorszak utáni elterjedési útvonalakat jelzik a feltüntetett nyilak (Bolfiková & Hulva, 2011).

Tökéletesen képes alkalmazkodni a környezetéhez, ezért szinte minden élőhelyen előfordul, azonban előnyben részesíti az erdőket és fás társulásokat. Kimondottan gyakori az előfordulása a városi, emberközeli élőhelyeken, ahol a kertekben, faskamrákban előszeretettel megtelepszik.

Szaglása és hallása kiváló, azonban látása gyenge. Veszély esetén összegömbölyödve védi magát sűrű tüskéivel. Ha a környezeti hőmérséklet 8°C alá süllyed, búvóhelyet keresve pl. farakások alá vagy gyökerek közé vonul valódi téli álmot aludni. Testhőmérséklete 6°C alá csökken, és addig így is marad, amíg a külső hőmérséklet 15°C fölé nem emelkedik. Ha álmában megzavarják, könnyen felébred, testhőmérséklete mindössze 2 óra alatt

normalizálódik. Napi alvása kinyújtózott testhelyzetben történik. Territóriumuk nincs. Magányos állat, de párzási időszakban a hímek konfrontálódnak egymással (Bihari, 2007).

Táplálékszerző körútjait éjszaka tartja, melynek során akár 150 g táplálékot is elfogyaszt. Hangos szuszogás kíséretében giliszták, rovarok, csigák után kutat, esetenként kisebb gerinces állatokat is fogyaszt, pl. békákat, gyíkokat, madár és emlős fiókákat.

Párzásuk a téli nyugalmi időszakot követően történik, mely áprilistól augusztusig is eltarthat. Vemhessége 34-49 napig tart, miután 4-5 utódot hoz világra, melyek lágy tüskékkel születnek. Az anyaállat kicsinyeit egyedül neveli. Az utódok 4 hétig kizárólag anyatejjel táplálkoznak, majd fokozatosan térnek át a szilárd táplálékra. Átlagéletkoruk 10 év.

Tüskés kültakarójuk kiváló védelmet biztosít ellenségeivel szemben. Legfontosabb ragadozója az uhu, de vaddisznó, borz és róka is fogyasztja (Bihari, 2007). Lakott területeken és azok környezetében az autók gyéríthetik a populációit.

2.2. Sünök és ektoparazitáik

A sünök viszonylag kis testméretük, az ektoparaziták megbúvására alkalmas kültakarójuk, és talajhoz kötött életmódjuk miatt ideális célpontot jelentenek a külső élősködők számára. Ezeket az emberek lakókörnyezetében is képesek fenntartani, mivel igen nagy számban fordulnak elő a sünökön, és folyamatosan újra is fertőződnek azokkal (Rigó et al., 2012).

2.2.1. Ektoparazita csáprágósok

Az ektoparazita csáprágósok sünökön előforduló legfontosabb képviselői a kullancsok, azonban előfordulhatnak a Dermanyssidae család képviselői, rühatkák, szőrtüszőatkák és elvértve óvontagok is.

A Dermanyssidae családba tartozó fajok közül a sünökön is előforduló *Haemolaelaps megaventralis* és a *Hirstionyssus arcuatus* a vérszívóatkák közé sorolható, melyek nem gazdaspecifikusak, rágcsálókön és más kisemlősökön is előfordulnak. A *Haemolaelaps* genusba tartozó fajok szerepet játszhatnak a *Francisella tularensis* terjesztésében, mely a tularémia kórokozója (Keim et al., 2007).

A sünökön előforduló rühatkák közül számos faj került már leírásra. Ilyen a Psoroptidae családba tartozó *Caparinia tripilis*, mely leginkább a *Trichophyton erinacei* gombás fertőzéssel társulva okoz súlyos megbetegedést, minek következtében a bőr kiszárad, megrepedezik, majd az állat szőre és tüskéi kihullanak (Robinson & Routh, 1999).

Megtalálható továbbá a Sarcoptidae családba tartozó, főként macskák fejrühösségét okozó *Notoedres cati* (Robinson & Routh, 1999), illetve a patkányokon és más rágsálókon előforduló *Notoedres muris* (Klompen & Nachman, 1990). Az Izraelben előforduló juh- és kecskeállományok rühösségi eseteinek vizsgálata során fény derült a nyájak környezetében élő európai sün és hosszúfülű sün *Sarcoptes scabiei* fertőzöttségére (Yeruham et al., 1999), mely arra enged következtetni, hogy az itt élő sünek rezervoárjai az említett kórokozónak, így szerepet játszhatnak azok terjesztésében és fenntartásában.

A *Demodex erinacei* a sün saját szőrtüszőatka faja, melynek előfordulása meglehetősen ritka (Izdebska, 2004).

Eddigi vizsgálatok során két óvantagfajt azonosítottak hosszúfülű sünek búvóhelyeiből, melyek a *Theriodoros arenicolous* és a *Theriodoros erraticus*. Ezek a paraziták sertéseken, ritkán embereken is szívhatnak vért, és az afrikai sertéspestis vírusának lehetséges vektoraiként tartják számon őket (Hoogstraal, 1953).

2.2.2. Ektoparazita rovarok

Az ektoparazita rovarok közül több bolhafaj és a myiasist kialakító legyek játsszák a legfontosabb szerepet. A sünöket parazitáló szőrtetvek és vérszívó tetvek, valamint kullancslegyek és bagócsaik ezidáig nem kerültek leírásra (Ellis & Mori, 2001).

Az Európában előforduló sünfajokon a gazdaspecifikus sünbolha (*Archaeopsylla erinacei*) fordul elő leggyakrabban (Thamm et al., 2009). Ez a bolhafaj egyaránt képes a kutyákon, macskákon (Gilles et al., 2008), és embereken is élősködni (Pomykal, 1985). Az *A. erinacei* gyakran fertőzött *Rickettsia* fajcsoportba tartozó baktériumokkal, *Bartonella henselae*-vel mely emberben az ún. macskakarmolási betegséget alakítja ki, továbbá *Mycoplasma haemofelis*-szel (Rigó et al., 2012). Egy hazai kutatás során a Margit-szigeten élő keleti sünek bolháiban *R. helvetica*-t, egy eddig még nem azonosított *Rickettsia* genotípust és *B. henselae*-t is kimutatták a közelmúltban (Hornok et al., 2014). Néhány esetben találkoztak már *Pulex irritans*-szal (Szabó, 1975), *Ctenocephalides canis*-szal, *Ctenocephalides felis*-szel, és *Ceratophyllus gallinae*-vel is (Földvári et al., 2011; Visser et al., 2001).

Nyár közepétől őszi végéig a sünek körében is előfordul az az elsődleges és másodlagos myiasis, melyeket okozói főként a *Lucilia*- és *Calliphora*-fajok (Robinson & Routh, 1999).

2.3. A kullancsok

A Parasitiformes öregrendbe, azon belül pedig az Ixodida rendbe és Ixodidae családba sorolható kullancsok rendszertanilag a póksabásúak közé tartoznak. Fejlődésmenetükre jellemző, hogy az adult állapotot lárv- és nimfastádium előzi meg (Rózsa, 2005). Morfológiailag két részre oszthatóak, melyek a fej és az idiosoma. Utóbbi szintén két részre tagolódik, melyek a podosoma, ahol a lábak találhatóak és az opisthosoma. A kullancsok testét egy lágy kutikula és egy kemény pajzs egyaránt fedi. Az ivari dimorfizmus szembetűnő, mivel a hímek testét teljesen, a nőstényekét viszont csak részben borítja ez a képlet. Szájszervük a test csúcsán található. Első pár lábukon helyezkedik el a Haller-féle szerv. A kullancsok ezen szerv segítségével érzékelik többek között a környezet CO₂ és páratartalmát, ammónia- és vajsavkoncentrációját, a hőmérsékletet, a légmozgást, a feromonokat és a levegő rezgéseit. A lábaik külön-külön való mozgatásával „integetve” határolják be a potenciális gazdaállatot (Bowman & Nuttall, 2008).

A legtöbb kullancsfaj háromgazdás, ami azt jelenti, hogy fejlődésük során a különböző stádiumokban lévő kullancsoknak három különböző gazdán kell táplálkozniuk, melyek lehetnek emlősök, madarak és hüllők egyaránt (Bowman & Nuttall, 2008). Vérszívás után leválnak arról, és vedlést követően új gazdát keresnek. Előfordulnak kétgazdás (*Rhipicephalus spp.*, *Hyalomma spp.*) és egygazdás pl. (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) kullancsfajok is (Barker & Murrell, 2008).

Kizárólagosan vérrel táplálkoznak, melyből a nőstények testsúlyukhoz viszonyítva óriási mennyiséget, akár annak százszorosát is képesek felvenni. Egyesek akár kettő vagy több hetet is táplálkozással töltenek. Teljes életsiklusuk hét évig is eltarthat (Bowman & Nuttall, 2008).

Az Ixodidae családba tartozó kullancsok igen változatos élőhelyeken fordulnak elő. Megtalálhatók a füves, bozótos, erdős vidékeken, száraz és nedves területeken egyaránt. Táplálékkeresési stratégiájuk szerint megkülönböztetünk exofil és endofil kullancsokat. Az exofil csoportba tartozó kullancsok a növényzeten várakoznak a gazdára (egyes esetekben aktívan keresik a potenciális gazdát, pl.: *Amblyomma*, *Hyalomma* genus), az endofil kullancsok viszont a gazdaállatok fészkeiben vagy üregében élnek (Bowman & Nuttall, 2008).

Az Európában előforduló kullancsfajok közül az *I. ricinus* és az *I. hexagonus* fordul elő leggyakrabban a sünökön (Gray et al., 1994; Thamm et al., 2009). Ez a két faj

életmódjában és az élőhelyválasztás tekintetében is különböző. Az *I. ricinus* Európa leggyakoribb kullancsfaja, melynek mindhárom fejlődési stádiuma exofil. Jellemzően a dús aljnövényzetű fás társulásokban és bokros területeken fordul elő (Hillyard, 1996). Aktivitásuk évszakonként eltérő, mivel túlélésükhöz az egyik legfontosabb tényező a kellően magas páratartalom (Randolph et al., 2000). Az *I. hexagonus* endofil stratégiát folytat, így egész életciklusát a gazdán vagy annak fészkében tölti, ezért külföldi felmérések szerint gyakrabban fordul elő a más kullancsok számára kevésbé optimális városi élőhelyeken (Gern et al., 1997). A Margit-szigeti speciális élőhelyen végzett kutatás szerint azonban az *I. ricinus* fordul elő gyakrabban (Földvári et al., 2011). E két *Ixodes*-faj egyedeiből akár 600-800 kullancs is előfordulhat egyetlen európai sünön, ezért még akkor sem elhanyagolható a gazdaszervezetre gyakorolt hatásuk, ha nem fertőzik kórokozók az állatot. Ezekben az esetekben vérszegénységre és erőltetett vérképzésre utaló értékeket figyeltek meg egy korábbi kutatás alkalmával (Pfäffle et al., 2009). A Margit-szigeten végzett korábbi vizsgálatok során, ahol keleti sünök vérparamétereit és egyéb élettani adatait is monitorozták, az előbb említett kórképek nem voltak megfigyelhetőek (Molnár V. publikálatlan adatok).

Az Európában őshonos sünökön az említett két kullancsfajon kívül már más fajok is megállapításra kerültek. Keleti sünön a *Haemaphysalis concinna* (Kozuch et al., 1963), *Ixodes acuminatus* és *Hyalomma marginatum* (Földvári et al., 2011), az európai sünön pedig az *Ixodes trianguliceps*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis inermis*, *Haemaphysalis punctata*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma aegyptium* és *Rhipicephalus sanguineus* fajokat írták le (Hillyard, 1996).

2.4. A *Borrelia burgdorferi* sensu lato

A *B. burgdorferi* s.l. fajcsoportba tartozó baktériumok a Spirochaetales rend képviselői. Dugóhúzó alakú, flexibilis sejtfalú, 5-25 µm hosszú és 0,2-0,5 µm széles rendkívül mozgékony mikroorganizmusok (Lakos, 2009). Jelenlegi ismereteink szerint a borreliák fajkomplexébe 19 külön faj tartozik (Casjens et al., 2011; Rudenko et al. 2011), azonban folyamatosan fedeznek fel újabb fajokat, így leírásuk még valószínűleg nem fejeződött be. (Rudenko et al., 2011). Ezek közül számos fajról igazolódott, hogy képes a Lyme borreliosis kórképének kialakítására.

A *B. burgdorferi* s.l. fajcsoportba tartozó baktériumok a kullancsok közepbelében szaporodnak, és a vérszívás alkalmával a nyálmirigyen keresztül jutnak a gerinces gazdába (Hillyard, 1996). A baktériumok közül először ennél a csoportnál írták le azt a jelenséget,

hogy a kórokozótól mentes, vért szívó kullancsok képesek felvenni a baktériumokat a gazda szisztémás fertőzöttségének hiányában is, amennyiben olyan helyen táplálkoznak, ahol korábban fertőzött vektor szívott vért (Gern & Rais, 1996). Ezt co-feedingnek, vagy együtt táplálkozási fertőzésnek nevezzük. Későbbi kutatások során azonban kimutatták, hogy sokkal nagyobb valószínűséggel fertőződik a kullancs egy rezervoár gazdától, mint együtt-táplálkozással, mivel a transzmissziót befolyásolja a vérszívás időtartama, a kullancsok száma, és a csípések távolsága (Richter et al., 2002).

A gazdán belüli vándorlásuk alkalmával a spirochaeták által a kullancs középbelében termelt OspA (Outer surface protein A) és nyálmirigyben termelt OspC (Outer surface protein C) fehérjék segítik a baktériumokat a gazdaszervezet sejtjeihez való kötődésben. A *Borrelia* fajcsoportba tartozó baktériumok ezeknek a felszíni fehérjéknek a génexpresszióját növelik a kullancs megfelelő szervében (Schwann & Piesman, 2002).

Az európai sünről (*E. europaeus*) már egy 1994-ben végzett kísérlettel bebizonyították, hogy a *B. burgdorferi* s.l. fajcsoport egyes tagjainak rezervoárja lehet. A vizsgálat során a kutatócsoport tagjai sikeresen fertőztek meg mongol futóegereket (*Meriones unguiculatus*) a már korábban *Borrelia*-val fertőzött sünon vért szívott kullancsokkal (Gray et al., 1994).

Egy további kísérlet során szintén xenodiagnózissal bizonyították az európai sün (*E. europaeus*) rezervoár szerepét. Az eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy az európai sün rezervoárja a Lyme borreliosis okozó baktériumoknak, mivel a kísérletesen megfertőzött sünökből származó fülbiopátumokból és a vékonytű aspirációs citológiai leletekből kimutatták a *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* és *B. afzelii* baktériumok DNS-ét (Gern et al., 1997).

A *B. burgdorferi* s.s.-ről, a *B. afzelii*-ről és a *B. garinii*-ről már korábban bizonyították, hogy emberi megbetegedéseket okoz (Margos et al., 2008). Németországban *B. spielmanni* jelenlétét igazolták a közelmúltban európai sünből (Skuballa et al., 2007), melyet korábban nem tartottak patogén kórokozónak, azonban többek között hazánkban is kimutatták az említett *Borrelia*-fajt egy fertőzött ember bőréből származó biopátumból (Földvári et al., 2005). Az utóbbi években a *B. lusitaniae* (Collares-Pereira et al., 2004), a *B. valisiana* (Diza et al., 2004) és a *B. bissetti* (Rudenko et al., 2008) szerepe is valószínűsíthető a betegség kialakításában.

A Lyme borreliosis az északi félteke leggyakrabban előforduló vektor által közvetített betegsége, melyeket az *Ixodes ricinus* fajkomplexbbe tartozó kullancsok terjesztenek. Az érintett területek közül Közép-Európa a legfertőzöttebbek közé sorolható. Magyarország minden régiójában előfordul (Lakos, 2009; Zöldi et al., 2013). A kórokozó baktériumok rezervoárjai közé elsősorban kisemlősök (rágcsálók, nyulak, rovarrevők), egyes madarak (pl. feketeterítő, fácán) és gyíkok tartoznak (Földvári et al., 2009; Földvári & Rigó, 2009; Richter & Matuschka, 2006). A friss megbetegedések leginkább május-júniusban keletkeznek, majd ősszel egy második, kisebb hullám mutatkozik (Lakos, 2009).

Az első humán eseteket 1984-ben írták le Magyarországon (Lakos et al., 1985), de a kórokozó kullancsból történő hazai kimutatására csak 1991-ben került sor (Lakos et al., 1991). A Lyme borreliosis Európában túlnyomórészt jóindulatú, sokszor magától gyógyuló betegség, azonban némely esetben progresszív lefolyást mutat. A betegség klinikai képe és kórlefolyása igen változatos, mely idült esetben ritkán évtizedekig is elhúzódhat (Lakos, 2009).

A Lyme borreliosis jellegzetes klinikai tünetei alapján több csoportra oszthatjuk fel. A vándorló bőrpír (erythema migrans) a kullancscsípés helyén keletkező, széli részén lassan növekvő, ovális alakú bőrpír (Török et al., 1987). A bőrpír legalább egy hétig, némely esetben hónapokig is megmaradhat, majd elmúlik. Fájdalmat ritkán okoz, előfordulhat azonban, hogy fáradékonysággal, fej-, ízületi és izomfájdalmakkal jár. A *Borrelia lymphocytoma* fájdalommentes, tömörtapintatú, lilászvörös, cseresznye méretű csomó, mely hónapok alatt tűnik el, amennyiben nem kezelik (Lakos, 1992). Az acrodermatitis chronica atrophicans főként idősebb nőknél előforduló jellegzetes tünet. A végtagok fesztítő oldalán a bőr térsztás tapintatúvá válik, és foltokban atrofizálódik. Általában igen fájdalmas, mivel az adott területen lévő idegvégződés, csontok és ízületek is megbetegszenek. Kezelés nélkül gyógyulás nem következik be (Liszkay et al., 1988). Elvértve szívizomgyulladás alakulhat ki a kezeletlen fertőzés esetében (Lakos, 2009). Egyes esetekben különböző neurológiai kórformák is kialakulhatnak, melyek a meningitis, egy- vagy kétoldali arcidegbénulás, a szemmozgató idegek bénulása és a radiculoneuritis. A nervus facialis és a szemmozgató idegeken kívül más agyidegeket nem érint a betegség (Lakos, 2002). A reumatológiai kórformák hetekkel, hónapokkal a fertőzést követően jönnek létre és ízületi gyulladások alakulnak ki. Gyakran spontán javulás, majd újabb fellángolás tapasztalható (Lakos, 2009).

Állatorvosi szempontból fontos, hogy Lyme borreliosis kialakító spirochaeták jelenléte sok esetben kimutatható kutyák esetében is, mivel közülük sokan egész életük során hordozói a kórokozónak, azonban csak egy részükben alakul ki megbetegedés (Beugnet, 2002). A Magyarországon végzett kutatások eredményei azt mutatják, hogy a kutyákban valószínűleg *B. afzelii* és *B. garinii* fajok fordulnak elő (Földvári et al., 2007).

3. Anyag és módszer

3.1. Vizsgálati állatok

Kutatásunkat a Fővárosi Állat- és Növénykert menhelyén tartott sünökkel végeztük. A vizsgált egyedeket egyesével, műanyag ládákban helyezték el. Látogatásunk időpontjában nyolc menhelyi sün volt megtalálható itt, melyek mindegyikével ugyanazon protokoll szerint jártunk el, az állatvédelmi jogszabályok betartása mellett. Munkánk során Dr. Molnár Viktor, a Fővárosi Állat- és Növénykert állatorvosa biztosította a szakszerű háttérrel az anesztéziához.

Minden egyedeket egyesével megvizsgáltunk, majd izofluránnal anesztetizáltunk annak érdekében, hogy megfelelő mintát tudjunk venni (3. ábra). Steril sebészszollóval fülbiopsziás szövetmintát vettünk az állatokból (4. ábra), majd a sünök egyedi azonosítójának segítségével felcímkézve tároltuk azokat. A vizsgált egyedeket E1-től E8-ig jelöltük meg. Az altatás ideje alatt lehetőségünk nyílt a sünökből való vérvételre is, melyből a helyszínen vérkenetet készítettünk későbbi vizsgálatok céljából.



3. ábra. Keleti sün altatása izofluránnal



4. ábra. Fülbiopátum vétele altatásban

3.2. Xenodiagnózis

Azért, hogy vizsgálatunkat az előírt protokollnak megfelelően tudjuk elvégezni, a két kiválasztott (egy nőstény és egy hím) *B. burgdorferi* s.l. fertőzött sünt a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi karának Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszékére szállítottuk. A sünöket egyedileg fém ketrecekben helyeztük el, melyek három oldalról zártak a külvilág felé, előlről pedig egy rácsos ajtón keresztül lehetett az állatokhoz hozzáférni. A ketrec aljára rácspadozatot alakítottunk ki, mely alá egy ugyanekkora méretű, pontosan illeszkedő rozsdamentes fém tálcát helyeztünk el, melyet félig vízzel feltöltöttünk. A vizsgálat ideje alatt naponta egyszer száraz macskaeledellel, és lisztukaccal (*Tenebrio molitor* lárvával) etettük meg a kísérletben részt vevő állatokat, ivóvíz pedig *ad libitum* állt rendelkezésre.

A keleti sün rezervoár szerepének megállapítására az egyetlen lehetséges módszert, a xenodiagnózist választottuk. Ennek céljából Németországból származó, igazoltan *Borrelia*-mentes Specific Pathogen Free (SPF) *Ixodes ricinus* kullancslárvákat használtunk, melyeket Dr. Hans Dautel laboratóriumából rendeltünk meg (IS Insect Services GmbH, Berlin, Németország). Ezekből a lárvákból 100-100 darabot helyeztünk el egyesével a sünökön. A felhelyezést követően minden nap gondoztuk a sünöket, és minden délután ugyanabban az időpontban a sünök alatt lévő tálcát átvizsgáltuk. Fejlámpával pásztáztuk át az egész területet, törekedve arra, hogy minden egyes lehulló lárvát megtaláljunk és begyűjtsünk. Ezt követően a

tálcákat fertőtlenítő szerez vízzel elmostuk, és friss vízzel feltöltöttük, majd újra a sünök alá helyeztük. Minden ilyen alkalommal a ketrecek alatti felületet is átvizsgáltuk annak érdekében, hogy azokat a lárvákat is összegyűjtsük, amelyek a köztes időben estek le (5. ábra).

Az összegyűjtött kullancslárvákat dátummal ellátott üvegekbe helyeztük, melyeken azt is feltüntettük, hogy melyik állatról estek le. Annak érdekében, hogy a gombás fertőzéseket elkerüljük, az üvegcsékbe nystatinnal átitatott vattacsomókat helyeztünk, és azoknak a száját szorosan lezártuk megnedvesített vattával. Utóbbira azért volt szükség, hogy a termosztátba téve elérjük a megfelelő páratartalmat, mely szükséges a kullancslárvák vedléséhez. Napközben a zárt inkubációs kamrába fényforrást is helyeztünk, hogy a megvilágítás időtartama hasonló legyen a természetes körülményekhez. Az üvegek tartalmát naponta megvizsgáltuk és szellőztettük a tapasztalható túl nagy nedvesség miatt (6. ábra). Ezt addig ismételtük, amíg meg nem történt a vedlés, és az inkubált lárvák nimfává nem alakultak. A nimfákat (7. ábra) ezután egyedileg helyeztük el újabb üveg edényekben, melyen feltüntettük a vedlés időpontját, és, hogy melyik kísérleti sünből származtak.



5. ábra. Megszívott lárvák gyűjtése

Fotó: Szekeres Sándor



6. ábra. Az inkubátorban tartott kullancslárvák szellőztetése

Fotó: Szekeres Sándor



7. ábra. A kísérletből származó SPF (Specific Pathogen Free) kullancs nimfa közvetlenül
vedlés után

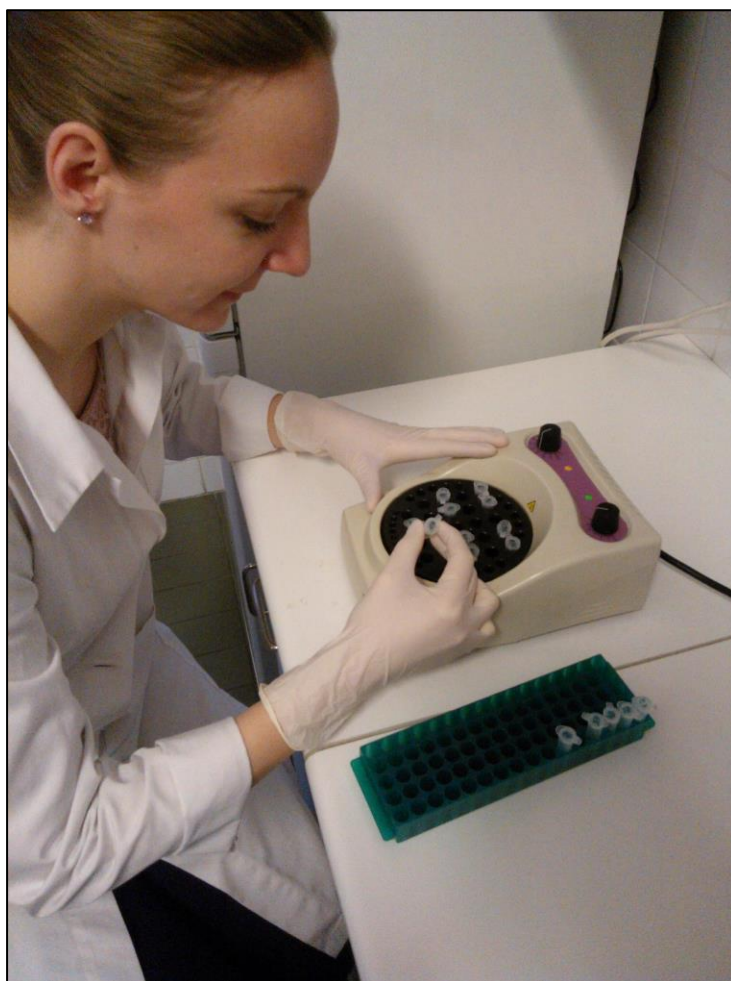
Fotó: Szekeres Sándor

3.3. Molekuláris laboratóriumi vizsgálatok

3.3.1. DNS-kivonás

A megbízhatóbb eredmények érdekében külön helyiségben végeztük a DNS kivonást, a PCR (polymerase chain reaction) összemérését és a gél-elektroforézist. A kontamináció elkerülésének céljából rendszeresen cseréltük a pipettahegyeket, kesztyűket, valamint negatív kontrollt (PCR víz) és templát DNS-t nem tartalmazó kontrollt (NTC) is alkalmaztunk. Pozitív kontrollként egy Gemencről származó *Borrelia lusitaniae* mintát használtunk.

A *B. burgdorferi* s.l. jelenlétét fülbiopátumokban vizsgáltuk. Összesen nyolc keleti sünből származó mintából történt DNS kivonás. A szövetmintákat egyesével dolgoztuk fel. Belőlük QiAamp DNA mini kit-tel (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) vér és szövetminta protokollja segítségével nyertük ki a DNS-t. A szövetmintákat 1,5 ml-es eppendorf csövekbe helyeztük, és hozzáadtunk 180 µl ATL lízispuffert, majd 20 µl proteináz-K enzimet. Az elegyet rázógéppel összeráztuk, majd a thermo blokkban 56 °C-on a lágy szövetek teljes oldódásáig egy éjszakás emésztés következett. Másnap rövid centrifugálást végeztünk, hogy a cső oldalán maradt folyadékcseppek a cső aljára kerüljenek, majd 200 µl ATL lízispuffert hozzáadva 15 mp-ig rázógéppel összeráztuk. Ezt követően 70 °C-on 10 percig inkubáltuk. Rövid centrifugálás után 200 µl 96%-os etanolt mértünk az elegyhez, és 15 mp rázógép használat után újból lecentrifugáltuk. Óvatosan ráhelyeztük a precipitátumot tartalmazó elegyet a QIAamp Spin Column-ra, anélkül hogy a széléhez ért volna a minta, mely egy 2 ml-es gyűjtőcsőben található. Ezt követően a gyűjtőcső tetejét lezártuk, majd 6000 g-n (8000 fordulat/perc) 1 percig centrifugáltuk. A centrifugából kivettük, a régi gyűjtőcsövet eldobtuk és egy újba helyeztük. Felnyitottuk a QIAamp Spin Column-ot és 500 µl AW1-es puffert ráértünk a mintára, majd újból 6000 g-n (8000 fordulat/perc) centrifugáltuk. Újra tiszta gyűjtőcsőbe helyeztük az elegyet, és 500 µl AW2-es puffert ráérve 20000 g-n (14000 fordulat/perc) 3 percig centrifugáltuk. Az AW2-es puffer kiöntése után újra lecentrifugáltuk a terméket maximális fordulatszámon (14600 fordulat/perc) 1 percig, hogy az összes mosópuffer távozzon, a szűrletet és a gyűjtőcsövet pedig eldobtuk. A QIAamp Spin Column-ot tiszta, 1,5 ml-es eppendorf csőbe helyeztük, és 200 µl AE-puffert (eluáló-puffert) mértünk rá, melynek funkciója az volt, hogy a DNS-t leoldja a membránról. Ezt 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 6000 g-n (8000 fordulat/perc) 1 percig centrifugáltuk. Az eluáló pufferben oldott DNS mintákat ezután -20 °C-os fagyasztoóban tároltuk.



8. ábra. DNS kivonás alkalikus hidrolízissel

Fotó: Szekeres Sándor

A DNS kivonása a kullancs nimfákból alkalikus hidrolízissel történt (Guy & Stanek, 1991). A kullancsokat szűrőpapírra helyeztük, hogy elpárologjon belőlük az alkohol, ezután a testüket kettévágtuk. A mintákat 1,25% ammónium–hidroxid oldatot tartalmazó mikrocentrifuga csőbe helyeztük. Az így előkészített csöveket fél óráig zárt fedővel forraltuk, hogy a mintában található DNS oldatba kerüljön (8. ábra). Ezután egy fél órás nyitott fedeles forralás következett, ami során az ammónium-hidroxid elpárolgott az elegyből. Az így feltárt DNS-t ezután fagyasztva tároltuk ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a molekuláris vizsgálatok megkezdéséig.

3.3.2. PCR-vizsgálat

A fülbiopátumokból származó DNS vizsgálatát BSL (OspA) PCR-rel végeztük. A kivonást követő PCR-vizsgálat során BSL-F (forward) primert (5-AATAGGTCTAATAATAGCCTTAATAGC-3) és BSL-R (reverse) primert (5-CTAGTGTTTTGCCATCTTCTTTGAAAA-3) használtunk, ezzel felerősítve azt a kb. 250 bázispárnyi régiót, ami minden Lyme borreliosis okozó spirochaeta baktérium génállományában megtalálható, a külső felszíni fehérje (outer surface protein A – OspA) kódolásáért felelős génszakasz (Demaerschlaeck et al., 1995; Földvári et al., 2005). A reakciónak első lépéseként egy denaturációs szakasz történt 94 °C-on 15 percig, majd 39-szer ismételt ciklusban denaturációs (94 °C, 30s), anellációs (58 °C, 30s) és extenziós (72 °C, 30s) szakaszok követték egymást. Egy végső terminációs (72 °C, 5 perc) szakasz után 4 °C-ra hűtöttük a mintákat.

A mastermix összetevőinek arányait az 1. táblázatban tüntettük fel.

1. táblázat. Az OspA fehérje génjére irányuló PCR reagensei

Összetevő	Mennyiség (μl)/minta
PCR víz	17,675
5 x Taq Puffer	5
Taq-polimeráz (5 U/μl)	0,125
dNTP-oldat (10 mmol/l)	0,5
Forward primer (BSL-F) (100 pmol/ml)	0,1
Reverse primer (BSL-R) (100 pmol/ml)	0,1
DNS-templát	1,5
Végtérfogató	25

A kullancs nimfákból származó DNS mintáknál használt forward (5'-GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATTGCC-3') és reverz (5'-TCAGGGTACTTAGATGGTTCCTCC-3') primerpár a riboszómális fehérjéket kódoló régiók közötti nem-kódoló szakasz (intergenikus spacer – IGS) felszaporítását végzi (Coipan et al., 2013). Ennek a reakciónak az első lépése egy denaturációs szakasz 94 °C-on 5 percig, majd 10-szer ismételt ciklusban denaturációs (94 °C, 20s), anellációs (70 °C, 30s) és extenziós (72 °C, 30s) szakaszok követték egymást úgy, hogy minden ciklusban 1 °C-kal csökkent az anellációs hőmérséklet. Ezután ismét 40-szer denaturációs (94 °C, 20s),

anellációs (60 °C, 30s) és extenziós (72 °C, 30s) szakaszok követték egymást az elongációs fázisban, majd egy extenziós (72 °C, 7s) szakasz után 4 °C-ra hűtöttük a mintákat.

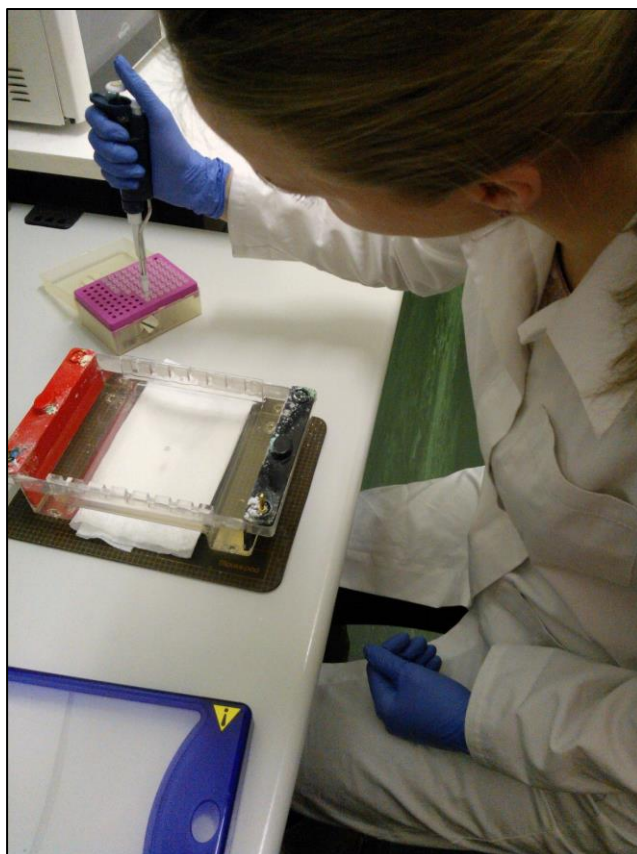
A PCR termékek azonosításához pozitív kontrollként humán mintából származó tenyészetből izolált DNS szolgált. A mastermix összetevőinek aránya a 2. táblázatban megtalálható.

2. táblázat. Az intergenikus spacer (IGS) primerekkel végzett PCR reagensei

Összetevő	Mennyiség (μl)/minta
PCR víz	5
HotStarTaq Plus Mastermix	12,5
Coral Load dye	2,5
IGSa (0,1 nmol/μl)	1
IGSb (0,1 nmol/μl)	1
Templát DNS	3
Végtérfogat	25

3.3.3. Gél-elektroforézis

Az amplikonokat 1,5%-os agaróz gélen futtattuk, aminek az elkészítéséhez TBE (Tris-Borát-EDTA) puffert használtunk (9. ábra). A futtató közeghez etídium-bromidot adtunk, így UV sugárzás mellett készített fényképen láthatóvá vált a PCR reakció eredménye.



9. ábra. Gélelektroforézis

Fotó: Szekeres Sándor

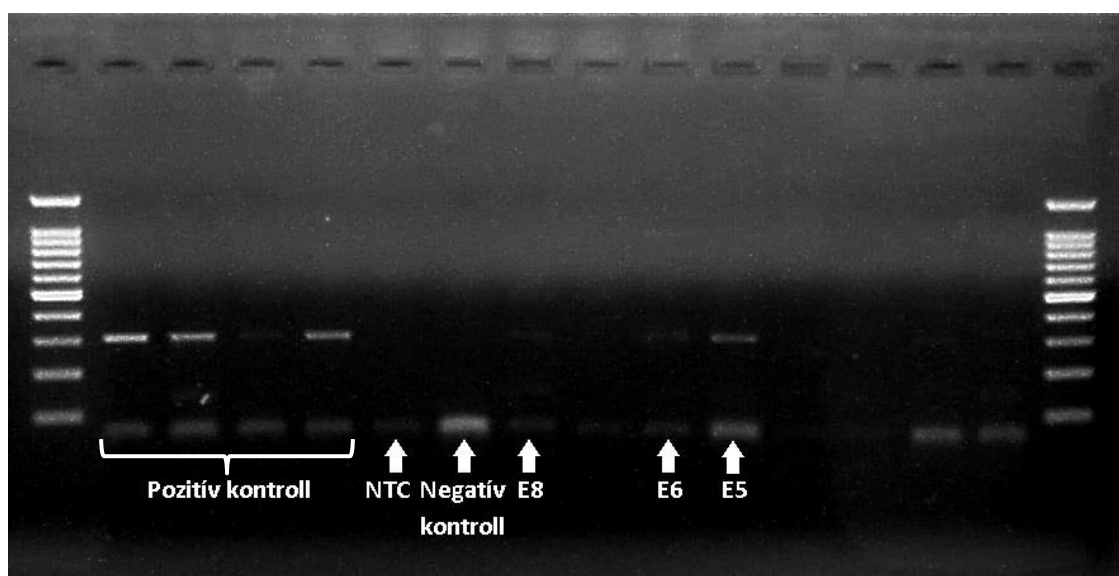
3.3.4. Szekvenálás

A konvencionális PCR reakció *Borrelia burgdorferi* s.l. pozitív mintái közül a legerősebb két mintából küldtünk külföldre szekvenálni (LGC Genomics GmbH, Berlin, Németország). A visszaküldött szekvenciát BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) segítségével összehasonlítottuk a nemzetközi génbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid adatbázisával.

4. Eredmények

4.1. Fülbiopsziás szövetminták

A menhelyen tartott keleti sünökből vett fülbiopsziás szövetminták *B. burgdorferi* külső felszíni fehérje (OspA) gén egy szakaszát felerősítő BSL primerpárral végeztük el a reakciót. Ennek eredménye azt mutatta, hogy nyolcból három példány (E5, E6, E8) volt fertőzött *B. burgdorferi* s.l. fajcsoportba tartozó baktériumokkal (6. ábra). Az E8 jelzésű minta esetében kis mennyiségű DNS-t amplifikált a PCR, ezért csak a két erősebb pozitivitást mutató mintát választottuk ki.



6. ábra. A nyolc keleti sün fülbiopsziátum OspA PCR-vizsgálatának gél-elektroforézis eredménye.

Az E5 megjelölésű sün 100%-os hasonlóságot mutatott a GenBank *Borrelia afzelii* szekvenciáihoz, azonban az E6 megjelölésű sünnel a kromatogramja alapján kevert *Borrelia*-fertőzése volt, ezért nem lehetett egyértelműen azonosítani a szekvencia hasonlóság alapján. Az alkalmazott négy pozitív kontroll minta egyike DNS degradáció miatt nem eredményezett PCR terméket. A negatív kontroll és NTC esetében sem volt detektálható termék.

4.2. Vérkenetek

A Giemsa-val festett vérkeneteket 1000 x-es nagyítás mellett vizsgáltuk fénymikroszkóppal. Kóros elváltozás vagy kórokozó jelenléte nem volt megfigyelhető egyikben sem.

4.3. Xenodiagnózis

A xenodiagnózis során az SPF kullancslárvákat 2014. április 8-án helyeztük fel a sünökre. A rendszeres megfigyelés során a 3. táblázatban látható napokon találtunk megszívott kullancslárvákat a kísérleti állataink alatt elhelyezett vizes tálcában.

3. táblázat. A sünökről gyűjtött kullancslárvák leesésének időpontja és száma

Dátum	E5 megjelölésű sün	E6 megjelölésű sün
2014. 04. 12.	6 db	32 db
2014. 04. 13.	34 db	32 db
Összesen	40 db	64 db

A termosztátba helyezve nem minden kullancslárva vedlett át nimfává. Az E5 megjelölésű sünről származó 40 lárvából összesen csupán 12, az E6 megjelölésű sünről származó 64 lárvából pedig 16 nimfa alakult ki, így összesen 28 átvedlett nimfán tudtuk elvégezni a DNS-kivonást, majd a PCR-vizsgálatot. Az IGS (nem-kódoló szakaszt felerősítő) PCR nem erősített fel semmit a mintákban. Ezért a másik protokollt, a külső felszíni fehérjét (OspA) felerősítő PCR-t is elvégeztük az összes mintán. Ebben az esetben sem volt látható termék a gél-elektorforézis végén.

5. Megbeszélés

Kísérletünk során a vizsgált sünökről származó xenodiagnosztikus kullancslárvákból átvedlett nimfákban nem sikerült kimutatnunk a *B. burgdorferi* s.l. jelenlétét. Vizsgálatunk mégis fontos tapasztalatokkal szolgálhat a további tudományos munkákhoz, mivel a korábbiakban kevés ilyen jellegű kutatás készült a kullancsok által terjesztett kórokozók felderítésére. A bevezetőben tárgyalt szempontok alapján a keleti sün fontos láncszeme a kórokozó fenntartásának. Hogy miért nem sikerülhetett ezt kísérletünk során bizonyítanunk, az alábbiakban diszkutálom röviden.

A negatív eredmények több okra is visszavezethetőek. Első és egyik legfontosabb magyarázat erre, hogy a kísérletben résztvevő sünök származása ismeretlen volt, valószínűleg nem természetes élőhelyükről kerültek közvetlenül kiválasztásra, mivel a menhelyen nem került feljegyzésre a befogadott állatok pontos megtalálási helye. Ez azt jelenti, hogy származhatnak olyan belvárosi szubpopulációból is, melynek tagjai nem, vagy ritkán találkoztak a *B. burgdorferi* s.l. fajcsoportba tartozó baktériumokkal. Az sem került pontos regisztrálásra, hogy ezek a sünök mióta voltak a Fővárosi Állat- és Növénykert menhelyén, így az sem, mióta nem találkoztak kullancsokkal, melyek a fertőzést terjesztik. Elképzelhető azonban az is, hogy találkoztak a fertőzéssel, de az általunk alkalmazott vizsgálati módszer nem volt elég érzékeny a fertőzés kimutatására. A jövőben ezért indokolt lenne egy jóval érzékenyebb kvantitatív valós idejű PCR használata (de Leeuw et al., 2014), mely lehetővé teszi a PCR ciklusok során keletkező termék valós idejű megfigyelését és mennyiségének mérését. Egy ilyen módszer beállítása és optimalizálása jelenleg zajlik a Parazitológiai és Állattani Tanszék molekuláris biológiai laboratóriumában. A másik lehetőség az ún. nested PCR alkalmazása lenne a molekuláris laboratóriumi munkálatok során. A nested PCR működési elve, hogy az egymásba ágyazott primerek segítségével két egymást követő reakciót futtat le. Mivel az első eredményét használjuk templátnak egy másik belső primerpárral, ezért sokkal kisebb mennyiségű DNS-t is ki lehet mutatni vele.

További magyarázat lehet, hogy a Németországból importált SPF *I. ricinus* kullancslárvák nagyarányú pusztulása miatt 200-ból csupán 28 lárva vedlett át nimfává, ami esetleg nem volt elég a *B. burgdorferi* s.l. kimutatására a mintából. A nagyarányú mortalitás oka lehet, hogy az említett kullancslárvák mesterséges, több generáció óta laboratóriumban tartott tenyészetből származnak, így valószínűleg már csökkent biológiai fitneszük, és kevésbé voltak életképesek, mint a vadonélő kullancspopuláció tagjai.

Más xenodiagnosztikai vizsgálatokkal összevetve elmondhatjuk, hogy a jövőbeni vizsgálatok során indokolt lenne nagyobb számban kullancsokat helyezni a kísérleti sünökre. Természetes körülmények között előfordulhat, hogy egy sünen akár több száz kullancsegyed is megtalálható (Földvári et al., 2011; Pfäffle et al., 2009). Egy korábbi tanulmányban, a vizsgált európai sünök esetében leírtak olyan vadon élő befogott egyedet is, melyről hasonló módszerrel összesen 189 *I. ricinus* és 309 *I. hexagonus* kullancsegyedet gyűjtöttek össze. Az ezt követő, összesen 13 európai sünen végzett xenodiagnosztikai vizsgálat során azt tapasztalták, hogy az alkalmazott spirochaeta mentes *I. ricinus* kullancsok 30%-ában, és az *I. hexagonus* kullancsok 33%-ában megtalálható volt a *B. burgdorferi* baktérium fajcsoport valamely képviselője (Gern et al., 1997). Egy további kutatás során, melyben szintén xenodiagnosztikai módszert alkalmaztak különféle rágcsálók *Borrelia*-fertőzésének megállapítására, egyedenként 200 lárvát helyeztek el a kísérleti állatokon (Burri et al., 2014). Ez szintén arra enged következtetni, hogy a jóval nagyobb testű keleti sünen akár 300-400 lárvát felhelyezése is indokolt lehetne a fertőzés átvitele és annak igazolása céljából.

Vizsgálatunk során a keleti sün kiváló alannak bizonyult a xenodiagnosztikai alkalmazhatóság szempontjából. Első sorban könnyen tartható, és nem igényel különleges bánásmódot. Kísérleti állatainkon azt tapasztaltuk, hogy a felhelyezett kullancslárvák nem voltak megterhelőek a sünök egészségére nézve. Nem utolsó sorban a kísérlet kivitelezése szempontjából igen lényeges volt, hogy lehetőségeinkhez mérten költséghatékonyan tudtuk a keleti sünen végrehajtott vizsgálatainkat elvégezni. Fontos megjegyezni, hogy azok a kullancslárvák, melyeket nem gyűjtöttünk össze, nagy valószínűséggel elpusztultak, és a vizes tálcában összegyűlt tartalommal keveredve eltávolításra kerültek, így a környezetbe biztosan nem jutottak ki. Az ilyen jellegű kísérleteknél lényeges szempont, hogy az elszabadult kullancsok ne okozzanak emberre vagy állatra nézve fertőzésveszélyt.

A dolgozatomban végzett előkísérlet alapján a keleti sün megfelelő körülményekkel, és az állatvédelmi szempontokat és előírásokat figyelembe véve, alkalmas a xenodiagnosztikai kísérletek kivitelezésére. Az ilyen jellegű vizsgálat nemcsak költség-, de munkaigényes folyamat is. Szükséges egy laboratóriumban tenyésztett, SPF kullancspopuláció, állatház, valamint molekuláris biológiai laboratórium is. A jövőben kívánatos lenne, hogy a *B. burgdorferi* s.l. mellett más kórokozók járványtanában betöltött szerepét is hasonló módon bizonyítani lehessen. Az elmúlt években számos újonnan felbukkanó és/vagy növekvő jelentőségű kórokozót (emerging pathogens) mutattak ki sünen vagy a róluk leszedett kullancsokban. A *Candidatus Neorhlichia mikurensis*-t és az *Anaplasma phagocytophilum*-ot

a Margit-szigeti sünökben is megtalálták (Földvári et al. 2014). Ezek a baktériumok aspecifikus tüneteket okoznak a fertőzött emberekben, és valószínűleg hazánkban is előfordulnak megbetegedések, amelyek azonban specifikus diagnosztikai eszköztár híján azonosíthatatlanok maradnak. Tekintve, hogy városi elterjedésük révén a gazdakereső kullancsok közvetlen fertőzésforrásként szolgálhatnak, előfordulhat, hogy a sünök jelentős hatással vannak a humán megbetegedések számára a városi környezetben (Rizzoli et al. 2014). Ahhoz azonban, hogy tényleges rezervoár szerepüket bizonyítsuk, jól tervezett xenodiagnosztikai kísérleteket kell elvégezni ezen kórokozók esetében is.

A korábbiakban tárgyaltak alapján feltételezzük, hogy a két kísérletbe bevont sün nagyon kis mennyiségű *B. burgdorferi* baktériumot, esetleg csak azok DNS maradványait hordozták, és ezért nem sikerült a rajtuk táplálkozó kullancsokból kimutatható mennyiséget találnunk. Meggyőződésünk, hogy a jövőben további kutatások keretein belül igazolható lenne a keleti sün rezervoár szerepe, ha a vadon élő befogott egyedeken közvetlenül végezhetnénk el a kísérletet.

A keleti sünök járványtani szerepének pontosabb megismerése érdekében tervezzük elgázolt sünök vizsgálatát is. A hazánkban élő sünök enterális, és más szerveiben illetve szöveteiben előforduló egyéb parazitákról így átfogóbb képet kaphatnánk. Erre azért van szükség, mert a védett keleti sünökből csupán csekély fájdalmat okozó módszerekkel engedélyezett mintát gyűjteni (pl. fülbiopszia). A sünök tetemeiből olyan mintákhoz is hozzájutnánk, amelyek más, emberre is veszélyes kórokozók és paraziták kimutatását és vizsgálatát tennék lehetővé.

6. Összefoglalás

A keleti sün (*Erinaceus roumanicus*) Magyarországon őshonos kisemlős, amely jól alkalmazkodik a városi életmódhoz. Korábbi kutatások alapján felmerült a sünök szerepe a Lyme borreliosis járványtanában, hiszen gyakori kullancsgazdák, és fertőzöttek lehetnek a *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochaeta baktériumokkal. Vizsgálataink célja az volt, hogy kísérletesen igazoljuk a keleti sün rezervoár szerepét a *B. burgdorferi* s.l. baktériumok fenntartásában.

Ahhoz, hogy ezt a kérdést megválaszoljuk, az erre alkalmas egyetlen módszert, a xenodiagnózist alkalmaztuk. Nyolc menhelyi sün fülbiopsziás szövetmintáit vizsgáltuk molekuláris módszerekkel a *B. burgdorferi* s.l. fertőzöttségre. A fertőzött egyedek közül kettőt választottunk ki a xenodiagnosztikai kísérletekhez. Ezekben polimeráz láncreakciót (PCR) és szekvenálással azonosítottuk a *Borrelia afzelii* fertőzést. A kísérlet során specifikusan patogénmentes tenyészetből származó (SPF) kullancs lárvákat helyeztünk el a fertőzött sünökön, majd a vérszívás után összegyűjtve azokat megvártuk, hogy megtörténjen a vedlés, és nimfává alakuljanak. A kórokozó kimutatására PCR-t alkalmaztunk.

A kísérlet során az egyik fertőzött sünről 40, a másikról pedig 64 vérrel teleszívott kullancs lárvát gyűjtöttünk össze. Ezeket megfelelő páratartalmú termosztátba helyeztünk, és az átvedlett nimfákból alkalikus hidrolízissel egyenként DNS-kivonást végeztünk. Az ezt követő PCR vizsgálat egyik esetben sem mutatott ki *B. burgdorferi* s.l. fertőzést a kullancsokban.

Előkísérletünk során nem tudtuk bizonyítani a keleti sün rezervoár szerepét a *B. burgdorferi* s.l. baktériumok járványtanában, így a jövőben további kutatások szükségesek a jelenség vizsgálatára, és a kísérlet módszereinek tökéletesítésére.

7. Summary

The Northern white-breasted hedgehog (*Erinaceus roumanicus*) is an endemic small mammal in Hungary, which successfully adapts to urban habitats. Previous studies showed the potential role of hedgehogs in the epidemiology of Lyme borreliosis, because they often carry ticks and they can be infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes. The aim of this study was to verify the role of the Northern white-breasted hedgehog in the maintenance of *B. burgdorferi* s.l. bacteria life cycle.

To answer our question we applied xenodiagnosis, the only appropriate method. We examined the ear biopsy of eight rescued hedgehogs with molecular methods to find the *B. burgdorferi* s.l. infection. We selected two infected hedgehogs for the xenodiagnostic experiments. Polymerase chain reaction (PCR) and sequencing confirmed that they were infected with *Borrelia afzelii*. During the experiment we put specific pathogen-free (SPF) larvae from a laboratory colony on the infected hedgehogs. After they engorged, we collected them and waited for molting in to the nymphal stage. We used PCR to detect *B. burgdorferi* s.l. DNA in the molted nymphs.

We collected 40 fully engorged larvae from the first infected hedgehog and 64 from the other one. The larvae were put into a thermostat with sufficient humidity and after they molted to nymphal stage we extracted the DNA individually with alkaline hydrolysis. All samples examined with PCR targeting *B. burgdorferi* s.l. infection were negative.

In our pilot study, we were not able to prove the reservoir role of the Northern white-breasted hedgehog in the life cycle of *B. burgdorferi* s.l. bacteria. Further studies are needed to test this phenomenon and to specify the experimental method.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Földvári Gábornak és Szekeres Sándornak a közös munkáért, a türelemért, az elmélyült szakmai beszélgetésekért és segítségért, amivel kutatásomat támogatták.

Köszönöm Dr. Majoros Gábornak a keleti sünökből származó vérkenetek vizsgálatát.

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

Köszönöm Dr. Gál Jánosnak és az Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszék dolgozóinak a kísérlet helyszínének biztosítását.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Molnár Viktornak és Fekete Gabriellának a sünök altatásában nyújtott segítségért, és Dr. Hans Dautelnek (IS Insect Services GmbH, Berlin, Németország) a kísérletben felhasznált SPF kullancsok biztosításáért. Köszönet továbbá Lise Gernnek (Université de Neuchâtel, Laboratoire d'éco-épidémiologie, Neuchâtel, Svájc) a hasznos tanácsokért, melyekkel munkánkat segítette.

Vizsgálatainkat a Munkahelyi Állatvédelmi Bizottság (6/2014), továbbá a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével (PEI/001/725-4/2014) végeztük.

A kísérlet kivitelezéséhez a SZIE-ÁOTK Kutató Kari pályázata és az NKB kutatási pályázat nyújtott anyagi támogatást.

9. Irodalomjegyzék

- AULAGNIER, S., HAFFNER, P., MITCHELL-JONES, A. J., MOUTOU, F., ZIMA, J. (2009): Mammals of Europe, North Africa and the Middle East. London: A & C Black Publishers Ltd., p. 42.
- BARKER, S. C., MURRELL, A. (2008): Systematics and evolution of ticks. In: Ticks Biology, Disease and control. Ed. Bowman, A. S., Nuttall, P. A. New York: Cambridge University Press. 1-39. p.
- BEUGNET, F. (2002): Guide to major vector-borne diseases. Lyon: Merial, S. A. S. 203. p.
- BIHARI Z. (2007): Keleti sün. In: BIHARI, Z., CSORBA, G., HELTAI, M. (szerk.), Magyarország emlőseinek atlasza. Budapest: Kossuth Kiadó, 50-51. p.
- BOLFIKOVÁ, B. and HULVA, P. (2011): Microevolution of sympatry: landscape genetics of hedgehogs *Erinaceus europaeus* and *E. roumanicus* in Central Europe. *Heredity*, 108. 248-255.
- BOWMAN, A. S., NUTTALL, P. (2008): Ticks: Biology, disease and Control. New York: Cambridge University Press, 507 p.
- CASJENS, S. R., FRASER-LIGGETT, C. M., MONGODIN, E. F., QIU, W-G., DUNN, J. J., LUFT, B. J., SCHUTZER, S. E. (2011): Whole Genome Sequence of an Unusual *Borrelia burgdorferi* Senu Lato Isolate. *Journal of Bacteriology*, 193. 1489–1490.
- COIPAN, E. C., FONVILLE, M., TIJSSE-KLASSEN, E., W. B. VAN DER GIESSEN, J., TAKKEN, W., SPRONG, H., TAKUMI, K. (2013): Geodemographic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato using the 5S–23S rDNA spacer region. *Infection, Genetics and Evolution*, 17. 216-222.
- COLLARES-PEREIRA, M., COUCEIRO, S., FRANCA, I., KURTENBACH, K., SCHÄFER, S. M., VITORINO, L., GONCALVES, L., BAPTISTA, S., VIEIRA, M. L., CUNHA, C. (2004): First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42. 1316-1318.

DE LEEUW, B. H., MARAHA, B., HOLLEMANS, L., SPRONG, H., BRANDENBURG, A. H., WESTENEND, P. J., KUSTERS, J. G. (2014): Evaluation of *Borrelia* real time PCR DNA targeting *OspA*, *FlaB* and 5S-23S IGS and *Borrelia* 16S rRNA RT-qPCR. *Journal of Microbiology Methods*, 16. 41-46.

DEMAERSCHALCK, I., MESSAOUD, A. B., DE KESEL, 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. 602-608.

DIZA, E., PAPA, A., VEZYRI, E., TSOUNIS, S., MILONAS, I., ANTONIADIS, A. (2004): *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerging Infectious Diseases*, 10. 1692-1693.

ELLIS, C. and MORI, M. (2001): Skin diseases of rodents and small exotic mammals. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 4. 493-542.

FÖLDVÁRI G., FARKAS R., LAKOS A. (2005): *Borrelia spielmanii* Erythema Migrans. *Emerging Infectious Diseases*, 11. 1794-1795.

FÖLDVÁRI G., MÁRIALIGETI M., SOLYMOSI N., LUKÁCS Z., MAJOROS G., KÓSA J. P., FARKAS R. (2007): Hard Tick Infesting Dogs in Hungary and their Infection with *Babesia* and *Borrelia* species. *Parasitology Research*, 101. 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.

FÖLDVÁRI G. and RIGÓ K. (2009): A Lyme borreliosis járványtana és a gyíkfajok szerepe a betegség fenntartásában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 131. 494-502.

FÖLDVÁRI G., RIGÓ K., JABLONSKY M., BÍRÓ N., MAJOROS G., MOLNÁR V., TÓT, M. (2011): Ticks and the city: Ectoparasites of the Northern white-breasted hedgehog (*Erinaceus roumanicus*) in an urban park. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2. 231-234.

- FÖLDVÁRI G., JAHFARI, S., RIGÓ K., JABLONSKY M., SZEKERES S., MAJOROS G., TÓTH M., MOLNÁR V., COIPAN, E. C., SPRONG, H. (2014): *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Anaplasma phagocytophilum* in Urban Hedgehogs. *Emerging Infectious Diseases*, 20. 496-497.
- GERN, L. and RAIS, O. (1996): Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 33. 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*, 44. 309-314.
- GILLES, J., JUST, F. T., SILAGHI, C., PRADEL, I., ET AL. (2008): *Rickettsia felis* in fleas. *Emerging Infectious Diseases*, 14. 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 hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. *Experimental and Applied Acarology*, 18. 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.
- HILLYARD, P. D. (1996): Ticks of North-West Europe. Shrewsbury: Field Studies Council. P. 178. p.
- HOOGSTRAAL, H. (1953): *Ornithodoros arenicolous* sp. nov. (Ixodidea, Argasidae) from Egyptian dessert mammal burrows. *Journal of Parasitology*, 39. 505-516.
- HORNOK S., FÖLDVÁRI G., RIGÓ K., MELI M. L., TÓTH M., MOLNÁR V., GÖNCZI E., FARKAS R., HOFMANN-LEHMANN, R. (2014): Vector-borne agents detected in fleas of the northern white-breasted hedgehog, *Vector-borne and zoonotic diseases*, 14. 74-76.
- IZDEBSKA, J. N. (2004): Species of Demodecidae (Acari, Actiniedida), new for the fauna of Poland, in common shrew (*Sorex araneus* L.). *Zoologica Poloniae*, 49. 47-51.

- KEIM, P. S., JOHANSSON, A., WAGNER, D. M. (2007): Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1105. 30-66.
- KLOMPEN, S. H. and NACHMAN, M. W. (1990): Occurrence and treatment of the mange mite *Notoedres muris* in marsh rats from South America. *Journal of wildlife diseases*, 26. 135-136.
- KOZUCH, O., NOSEK, J., ERNEK, E., LICHARD, M., ALBRECHT, P. (1963): Persistence of tick-borne encephalitis virus in hibernating hedgehogs and dormice. *Acta Virologica*, 19. 430-433.
- LAKOS A., BÓZSIK B., BUDAI J., KÁLI G., TELEGDY L., AMBRÓZY GY. (1985): Lyme-kór – kullancs által terjesztett borreliosis Magyarországon. *Orvosi hetilap*, 126, 2697-2700.
- LAKOS A., NAGY G., JANKOVICS I., CSÍK M. (1991): A *Borrelia burgdorferi* (Lyme spirochaeta) első hazai izolálása kullancsokból. *Orvosi hetilap*, 132. 129-130.
- LAKOS A. (1992): Kullancsok és betegségek. Budapest: Melánia, 144. p.
- LAKOS A. (2002): Neuroborreliosis. In: Betegségenciklopédia. Szerk.: Kornya László. Budapest: Springer Tudományos Kiadó Kft. 778-779. p.
- LAKOS A. (2009): Lyme-borreliosis – 25 év tapasztalatai. *Orvosi hetilap*, 150. 725-732.
- LISZKAY G., LAKOS A., DARÓCZY J., VECSEI É. (1988): Az acrodermatitis chronica atrophicans, mint a Lyme borreliosis késői manifesztációja. *Orvosi Hetilap*, 129. 2143-2145.
- 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 an European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 105. 8730-8735.

- 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. 443-452.
- POMYKAL, J. (1985): A case of infestation of humans with fleas *Archaeopsylla erinacei* (Siphonaptera, Pulicidae). *Folia parasitologica*, 32. 348.
- 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. 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*, 8. 1421-1425.
- RICHTER, D. and MATUSCHKA, F-R. (2006): Perpetuation of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia lusitaniae* by Lizards. *Applied and Environmental Microbiology*, 72. 4627-4632.
- RIGÓ K., MAJOROS G., JABLONSKY M., MOLNÁR V., TÓTH M., FÖLDVÁRI G. (2012): A sünök ektoparazitái és a sünökből kimutatott zoonotikus kórokozók. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 134. 353-360.
- RIZZOLI, A., SILAGHI, C., OBIEGALA, A., RUDOLF, I., HUBÁLEK, Z. , FÖLDVÁRI, G., PLANTARD, O., VAYSSIER-TAUSSAT, M. , BONNET, S., ŠPITALSKÁ, E. , KAZIMÍROVÁ M. (2014): Ixodes ricinus and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Health*. 2:251.
- ROBINSON, I. and ROUTH, A. (1999): Veterinary care of the hedgehog. *In Practice*, 21. 128-137.
- RÓZSA L. (2005): Élősködés: az állati és emberi fejlődés motorja. Budapest: Medicina. 318. p.
- RUDENKO, N., GOLOVCHENKO, M., MOKRACEK, A., PISKUNOVÁ, N., RUZEK, D., MALLATOVÁ, N., GRUBHOFFER, L. (2008): Detection of *Borrelia bissetti* in cardiac

valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, 46. 3540-3543.

RUDENKO, N., GOLOVCHENKO, M., GRUBHOFFER, L., OLIVER, J. H. JR. (2011): Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2. 123-128.

SCHWANN, T. G. and PIESMAN, J. (2002): Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 8. 115-21.

SKUBALLA, J., OEHME, R., HARTELT, K., PETNEY, T., BÜCHER, T., KIMMIG, P., TARASCHEWSKI, H. (2007): European hedgehogs as hosts for *Borrelia* spp. *Emerging Infectious Diseases*, 13. 952-953.

SZABÓ I. (1975): Bolhák – Siphonaptera. Fauna Hungariae. Budapest: Akadémiai kiadó. 97 p.

THAMM, S., KALKO, E. K. V., WELLS, K. (2009): Ectoparasite infestations of hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) are associated with small-scale landscape structures in an urban-suburban environment. *Ecohealth*, 6. 404-413.

TÖRÖK É., LAKOS A., DRAGODÁN K., LÁNYI C. (1987): Erythema chronicum migrans Lipschütz. (A Lyme borreliosis első tünete.), *Orvosi Hetilap*, 128. 1983-1986.

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

VISSER, M., REHBEIN, S., WIEDEMANN, C. (2001): Species of flea (Siphonaptera) infesting pets and hedgehogs in Germany. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 48. 197-202.

YERUHAM, I., ROSEN, S., HADNI, A. (1999): Hedgehogs as a possible reservoir of sarcoptic mange for wild and domestic ruminants. *Acarologia*, 40. 65-67.

ZÖLDI V., JUHÁSZ A., NAGY CS., PAPP Z., EGYED L. (2013): Tick-Borne Encephalitis and Lyme Disease in Hungary: The Epidemiological Situation Between 1998 and 2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13. 256-265.

Nyilatkozat

Alulírott Gajdos Mónika kijelentem, hogy a „Rezervoárja-e a keleti sün a *Borrelia burgdorferi* sensu lato baktériumoknak?” c. pályamunka saját munkám.

Budapest, 2015. január 7.

Gajdos Mónika