

SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A kutya leishmaniózis és a parazita vektorainak
vizsgálata Magyarországon**

Tánczos Balázs
PhD értekezés

Budapest
2012

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető

.....

Dr. habil. Farkas Róbert
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Parazitológiai és Állattani Tanszék

Témabizottsági tagok:

Dr. Vörös Károly
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Belgyógyászati tanszék és klinika

Dr. Marina Gramiccia
Reparto di Malattie Trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate
Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Dr. Paul D Ready
Department of Entomology, Natural History Museum, Cromwell Road, London, UK.

Készült 8 példányban. Ez az 1. számú példány

.....

Tánczos Balázs

Tartalom

Tartalom	3
Rövidítések	7
1. Összefoglalás	8
2. Bevezetés és célkitűzések	10
3. Irodalmi áttekintés.....	12
3.1 A leishmaniákkal kapcsolatos ismeretek rövid áttekintése	12
3.1.1 A Leishmania-fajok felfedezése és jelentősége	12
3.1.2 A Leishmania-fajok rendszertani besorolása és biológiája	13
3.1.2.1 Rendszertan.....	13
3.1.2.2 Morfológia	15
3.1.2.3 Fejlődésmenet	16
3.1.3. A leishmaniák gazdaköre, járványtani ciklusai és földrajzi elterjedése	17
3.1.4. A kutya <i>L. infantum</i> okozta fertőződéssel kapcsolatos ismeretek	18
3.1.4.1 A <i>L. infantum</i> átvitele és járványtani sajátosságai	18
3.1.4.2 A kutya leishmaniózis endémiás előfordulása Európában.....	19
3.1.4.3 A kutya leishmaniózisának hazai előfordulása	20
3.1.4.4 Kórfejlődés és klinikai tünetek	20
3.1.4.5 A kórjelzés módszerei	22
3.1.4.5.1 A parazita kimutatása	22
3.1.4.5.2 Ellenanyagok kimutatása	23
3.1.4.5.3 Parazita DNS kimutatása (PCR)	23
3.1.4.6 Gyógykezelés és védekezés	24
3.1.5 Az ember <i>L. infantum</i> okozta fertőződéssel kapcsolatos ismeretek	25
3.2 A lepkeszúnyogokkal kapcsolatos ismeretek rövid áttekintése.....	27
3.2.1 Elnevezés, rendszertan és földrajzi elterjedés.....	27
3.2.2 A leishmaniák vektoraiként ismert lepkeszúnyogok	28
3.2.2.1 A lepkeszúnyogok hazai előfordulásával kapcsolatos ismeretek.....	30

3.2.2.2 A lepkeszűnyog-fajok elterjedésének változásai napjainkban	30
3.2.3 A lepkeszűnyogok biológiája	31
3.2.3.1. Morfológia	31
3.2.3.2. Életmód	31
3.2.3.3. Fejlődésmenet	33
3.2.3.4. A leishmaniák hatása a lepkeszűnyogra.....	34
3.2.3.5. Lepkeshűnyogok által terjesztett más kórokozók	34
3.3. Lepkeshűnyogok elleni védekezés	34
4. Anyag és módszertan	35
4.1. A kutya leishmaniózis hazai vizsgálata	35
4.1.1. Kutya szerológiai vizsgálata	35
4.1.2. Állatorvosok körében végzett kérdőíves felmérés	35
4.1.3. Egy paksi kennelben végzett vizsgálatok	36
4.2. Vizsgálati módszerek.....	36
4.2.1. A fertőzöttség kimutatása Immunfluoreszcens Antitest Teszttel (IFAT)	36
4.2.2. A parazita kimutatása hisztológiai és immunhisztokémiai módszerekkel	37
4.2.3. A parazita DNS-ének kimutatása molekuláris biológiai módszerekkel.....	37
4.2.3.1. Vizsgálati minták.....	37
4.2.3.2. DNS kivonása	38
4.2.3.3. Kinetoplast DNS (kDNS) specifikus PCR reakció	38
4.2.3.4. A riboszomális kis alegységre (ssu rRNS) specifikus nested PCR reakció	39
4.2.3.5. PCR termékek szekvencianalízise	39
4.3. A lepkeshűnyogok hazai előfordulásának vizsgálata.....	39
4.3.1. A csapdázási helyek kiválasztása	39
4.3.2. Alkalmazott csapdázási módszerek.....	40
4.3.2.1. Ragacsos lap.....	40
4.3.2.2. CDC Miniature Light Trap	40

4.3.2.3. Mosquito Magnet X	41
4.3.2.4. A csapdák alkalmazása	41
4.3.3. Lepkeszúnyogok faji szintű határozása.....	42
4.3.4. A csapdázott lepkeszúnyogok filogenetikai vizsgálata	43
4.3.4.1. Vizsgált lepkeszúnyogok.....	43
4.3.4.2. DNS kivonása	43
4.3.4.3. PCR reakció.....	43
4.3.4.4. Szekvenciaelemzés és a génfa szerkesztése.....	44
5. Eredmények.....	44
5.1. A kutyák leishmaniosisának hazai előfordulásával kapcsolatos vizsgálatok	44
5.1.1. Szerológiai vizsgálatok	44
5.1.2. A paksi kennelben végzett vizsgálatok.....	45
5.1.2.1. Az elaltatott kutya mintáinak vizsgálatai	45
5.1.2.1.1. Vérvémi vizsgálat.....	45
5.1.2.1.2. Szöveti és immunhisztokémiai vizsgálat	45
5.1.2.2. Szerológiai és PCR vizsgálatok	47
5.1.2.3. A <i>Leishmania</i> specifikus PCR termékek szekvencia analízise	49
5.2. A lepkeszúnyogok hazai előfordulásával kapcsolatos vizsgálatok	49
5.2.1. A csapdázások eredményei.....	49
5.2.1.1. Ragacsos lapokkal végzett gyűjtés	49
5.2.1.2 CDC Miniature Light Trap és MMX csapdákkal végzett gyűjtések	50
5.2.1.3. A paksi kennelben és környékén végzett csapdázások.....	52
5.2.2. Hazánkban csapdázott lepkeszúnyogok filogenetikai vizsgálata	52
6. Megbeszélés	53
Konklúzió	60
7. Új tudományos eredmények.....	61
8. Irodalom.....	62
9. A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	74

9.1 A témában megjelent tudományos publikációk.....	74
9.2. A témában tartott előadások	74
9.3. Egyéb közlemények referált folyóiratokban.....	75
9.4. Egyéb poszter	75
10. Köszönetnyilvánítás	76
11. Mellékletek	78
12. Summary.....	97

Rövidítések

CDC	Az amerikai Betegségfelügyeleti és Megelőzési Központ (angolul: <u>C</u> enters for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and <u>P</u> revention)
DTH	késleltetett túlérzékenységi reakció (angolul: <u>D</u> elayed <u>T</u> ype <u>H</u> ypersensitivity)
IFAT	Indirekt immunfluoreszcens ellenanyag teszt (angolul: indirect <u>I</u> mmunfluorescent <u>A</u> ntibody <u>T</u> est)
IFN-γ	gamma interferon
IgG1	G1 típusú immunoglobulin
IgG2	G2 típusú immunoglobulin
IL10	10-es interleukin
IL2	2-es interleukin
IL4	4-es interleukin
MMX	Mosquito Magnet X
PCR	Polimeráz láncreakció (angolul: <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PMN	<u>P</u> olimorfonukleáris leukocita (neutrofil granulocita)
SP	ragacsos lap (angolul: <u>S</u> ticky <u>P</u> aper)
Th1	1-es típusú segítő T limfocita
Th2	2-es típusú segítő T limfocita
TNF-α	<u>T</u> umor <u>n</u> ekrózis <u>f</u> aktor alfa

1. Összefoglalás

Az Európa mediterrán országaiban elterjedt *Leishmania (L.) infantum* a kutyák és emberek szisztémás megbetegedését okozó egysejtű parazita. Az okozott bántalom az ebek egyik legjelentősebb halálozási oka az endémiás térség országaiban. A fertőzött állat évekig tünetmentes maradhat, ezért a parazitát ilyen kutyákkal gyakran hurcolják be nem-endémiás országokba. A *L. infantum* terjesztésében biológiai vektorai, egyes vérszívó lepkeszúnyog fajok nőtényei vesznek részt. A parazita és vektorainak elterjedését számos környezeti tényező (pl. földhasználat) mellett elsősorban az éghajlat határozza meg. Valószínű, hogy kontinensünkön az elmúlt évtizedek éghajlati és környezeti (társadalmi, gazdasági és ökológiai) változásai okozták egyes, korábban nem-endémiás területeken a *L. infantum* és a lepkeszúnyogok elterjedését. Magyarországot hagyományosan nem sorolják az endémiás régióba, de földrajzilag határos endémiás országokkal, ezért a parazita és vektorainak terjedése fenyegeti. Korábban hazánkban egyetlen külföldön fertőződött kutya, és kisszámú behurcolt emberi esetet jegyeztek fel. Az 1930-as évek elején az ország délkeleti felében egy vektor jelentőségű lepkeszúnyog faj egyedeit gyűjtötték, de hasonló vizsgálatok sem azelőtt, sem azóta nem folytak az országban.

Kutatómunkánk során arra kerestük a választ, hogy vajon előfordulnak-e hazánkban leishmaniával tünetmentesen fertőződött kutyák, ill. vektor lepkeszúnyogok. Ezért az ország több megyéjében 705, háznál tartott kutyát vizsgáltunk meg a *L. infantum*-mal szemben termelt ellenanyagok kimutatására alkalmas teszt segítségével, de fertőződött ebet nem találtunk. Az ország 216 állatorvosi rendelőjébe / klinikájára egy kérdőívet juttattunk el, amelyben a külföldről esetlegesen hazánk területére behurcolt leishmaniás kutyák előfordulásáról kértünk információkat. Összesen 8 importált esetről szereztünk ilyen módon tudomást. Különböző típusú csapdákkal vizsgáltuk a lepkeszúnyogfajok előfordulását az országszerte. Korábbi csapdázási helyéhez közel fogtuk a *Phlebotomus (P.) perfiliewi* egyedeit, egy másik vektor jelentőségű faj, a *P. neglectus* példányait pedig az ország délnyugati részében első alkalommal gyűjtöttük. További két lepkeszúnyogfaj, a *P. mascitti* és *P. papatasi* példányait elsőként gyűjtöttük az ország területén, de ezeknek nincs szerepe a *L. infantum* terjesztésében. A *P. perfiliewi* és a *P. neglectus* hazánkban fogott egyedeivel és e fajok külföldről kapott példányaival összehasonlító filogenetikai vizsgálatokat végeztünk, melyek során úgy találtuk, hogy mindkét faj részlegesen izolált populációkban él hazánk területén. A

hazánkban előforduló vektor fajok járványtani jelentőségét mérsékeltnak ítéltük, de szerepük a behurcolt leishmaniák átvitelében fogékony kutyákra vagy emberekre nem zárható ki.

Vizsgálataink ideje alatt, egy közép-magyarországi kutyakennelben tapasztaltuk az első autochton *L. infantum* fertőzéses eseteket, de a környéken lepkeszúnyogokat nem sikerült gyűjtenünk, ezért a fertőzés eredete tisztázatlan maradt.

2. Bevezetés és célkitűzések

A *Leishmania (L.) infantum* a kutyák és emberek több szervrendszert károsító megbetegedését, az ún. viscerális leishmaniózist okozó egysejtű parazita. Európában azokban a mediterrán országokban endémiás előfordulású, ahol a köztigazdái, egyes melegkedvelő, vérszívó lepkeszúnyogfajok elterjedtek. A *Phlebotomus (P.)* nembe tartozó fertőzött rovarok nőtényei vérszívás közben oltják be a *L. infantum* fertőző alakjait a kutyába, amely hónapokig, évekig tünetmentesen hordozhatja a parazitát. Az ilyen eb a vektorok közvetítésével, vagy ritkán, közvetlen módon (harapással, spermával, kongenitálisan) adhatja át a leishmaniákat fogékony kutyáknak. Endémiás országokban fertőződött kutyák utaztatásával gyakran hurcolják be a parazitát Európa lepkeszúnyogmentes országaiba, így pl. Németországba, Hollandiába, de ezeket az eseteket nem tartják fontosnak, mert járványtani szempontból a vektorokkal való terjedésnek van jelentősége. Emiatt a lepkeszúnyogok napjainkban is zajló, északi irányú földrajzi terjeszkedését, aminek hatására korábban parazita-mentes területek (pl. Észak-Olaszország) endémiássá váltak, növekvő aggodalom övezi Európában. A folyamat hajtóerejének az éghajlat, valamint a társadalmi, a gazdasági és az ökológiai környezet változásait tartják.

Magyarországot hagyományosan a *L. infantum*-tól és vektoraitól mentes országnak tekintik. A parazita vektoraként ismert lepkeszúnyogokat ugyan már gyűjtöttek az ország déli részén, de csak pár alkalommal, az 1930-as években. Sem ezt megelőzően, sem ezután nem kutatták e rovarok hazai előfordulását, s ezek előfordulásáról nem rendelkezünk hiteles adatokkal. A kutyák és emberek leishmaniózisára vonatkozó ismereteink hasonlóan szűkösek voltak. A *L. infantum* behurcolását egyetlen, Görögországban fertőződött kutya esetében dokumentálták eddig hazánkban. Az emberek fertőződéséről a Közel-Keletről és Horvátországból behurcolt 15, illetve egy eset kapcsán voltak értesüléseink.

Magyarország délen határos a Balkán-félsziget egyes endémiás országaival, ezért hazánkat a *L. infantum* és vektorai által fenyegetett országok közé sorolják. Horvátországban és Szerbiában legalább 3 vektor faj (*P. neglectus*, *P. perfiliewi* és *P. tobbi*) előfordulása ismert. Amennyiben e lepkeszúnyogfajok esetleges északi irányú földrajzi terjeszkedésük során elérnék hazánk területét, lehetségessé válna a behurcolt paraziták átvitele külföldön fertőződött kutyával (esetleg a Balkánról északra vándorló rókával, aranysakállal), ill. emberekkel (az utazó, a határt illegálisan átlépő) behurcolt paraziták endémiás átvitele a vektorok előfordulási helyein, ezek aktivitási időszakában. Emiatt fontos lenne naprakész

ismeretekkel rendelkezünk arról, hogy vajon előfordulnak-e vektor jelentőségű lepkeszúnyogfajok és/vagy leishmaniával fertőződött kutyák az országban.

Kutatásainkat 2006-2010 között részben az ízeltlábú vektorok és az általuk terjesztett kórokozók elterjedésének változásait kutató európai program keretében folytattuk.(GOCE-2003-010284 EDEN, Emerging Diseases in a changing European eNvironment) Vizsgálatainkat az ország több térségében végeztük, de a bántalom és a lepkeszúnyogok előfordulása szempontjából legveszélyeztetettebb déli országrészre fókuszáltuk. Kutatásaink során két alapvető célkitűzést követtünk:

1. Az ország különböző tájairól származó kutyák vérmintáinak szerológiai vizsgálatával, továbbá állatorvosi rendelőkbe és klinikákra eljuttatott kérdőív segítségével arra kerestük a választ, hogy hazánk területén előfordulnak-e *L. infantum*-mal, vagy más leishmaniával fertőződött kutyák, amelyek külföldön, vagy esetleg hazánkban fertőződhetek a parazitával.
2. Különböző csapdázási módszerek használatával azt vizsgáltuk, hogy vajon előfordulnak-e hazánkban a *L. infantum* átviteléért felelős lepkeszúnyogfajok.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A leishmaniákkal kapcsolatos ismeretek rövid áttekintése

3.1.1 A Leishmania-fajok felfedezése és jelentősége

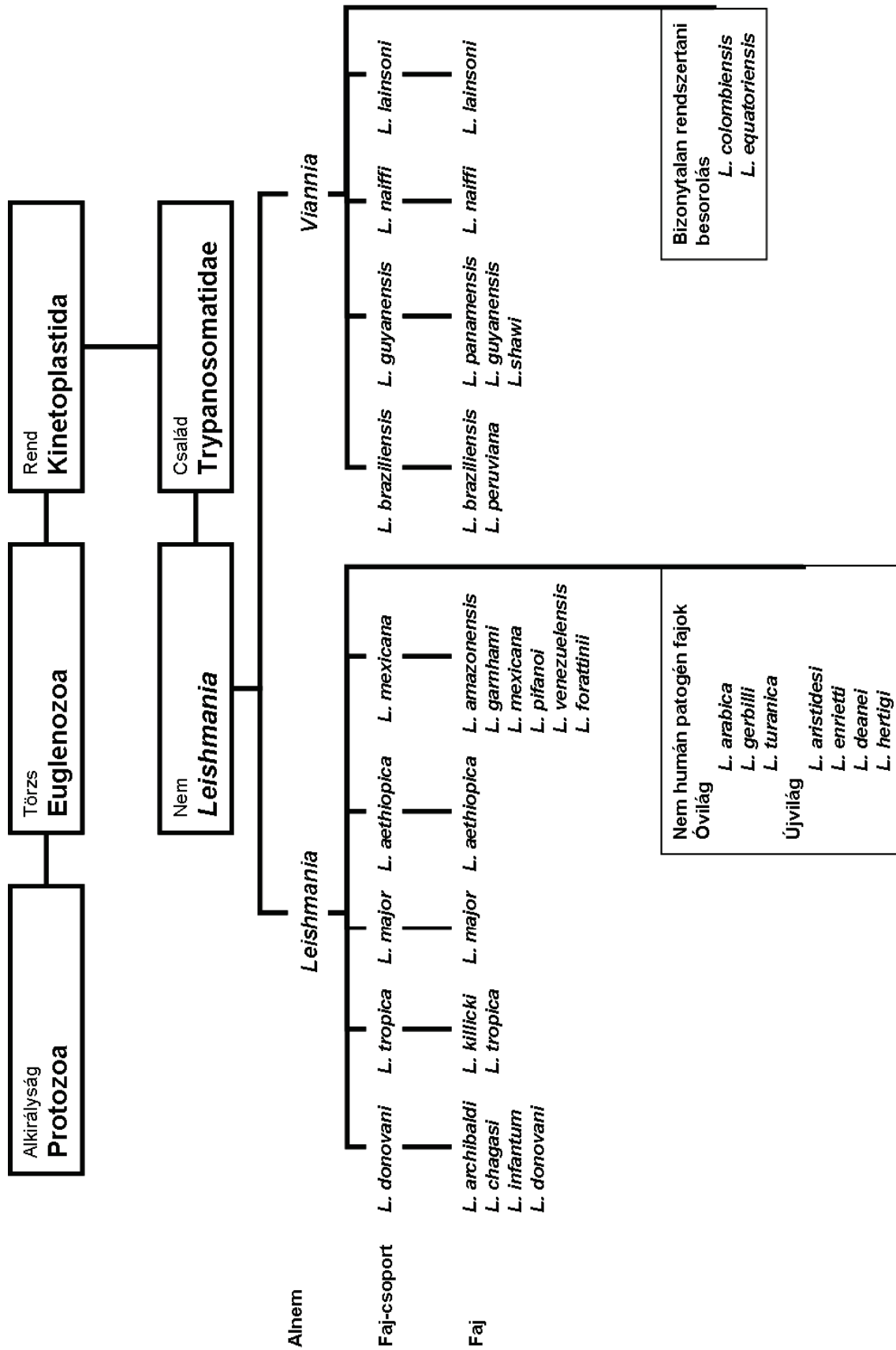
A *Leishmania*-fajok (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) által okozott megbetegedések évezredek óta kísérik az emberiséget, ám maguk a kórokozók és átvitelük módja a 20. századig ismeretlen maradt. A Közel-Keletről i.e. 2500-1500 közötti időszakból származnak az első olyan feljegyzések, amelyek emberek leishmaniózisként azonosítható megbetegedésére utalhatnak. A mai Afganisztán területéről, továbbá Bagdad és Jerikó városából származó kora középkori esetleírásaikban a korszak híres arab orvosai leishmaniózis-szerű megbetegedésekről számoltak be. A bántalmat vizsgáló modern kutatások a 19. század során Indiában kezdődtek el, ahol több alkalommal és több helyütt járványszerűen ütötte fel fejét a kala-azar (hindi nyelven „fekete halál”-t jelent) betegség. Ma már ismeretes, hogy a bántalmat egy *Leishmania*-faj, a *L. donovani* okozza, ám akkoriban a korszak orvosai, köztük a Nobel-díjas malária-kutató, Ronald Ross, a kininek ellenálló malária törzseket sejtettek a betegség hátterében. A századforduló évében, 1900-ban egymástól függetlenül William Leishman, skót katonaeorvos, és Charles Donovan, a Madras-i Egyetem élettan professzora kala-azarban szenvedő pácienseik lép izolátumaiban találta meg az intracelluláris, a felfedezőikről később elnevezett Leishman-Donovan testeket, melyeket három évvel később új parazita faj, a *L. donovani* sejtéként azonosított Laveran és Mesnil (Cox 2002).

Az újvilági megbetegedésekkel kapcsolatos legkorábbi ismereteink későbbi keletűek az óvilágiakénál. Az időszámításunk szerinti 5. századból származó, jellegzetesen eltorzult arcú emberi alakokat formázó indián szobrokban tudománytörténészek a leishmaniózis tüneteinek művészi ábrázolását vélik felfedezni. Az első írásos beszámolók a 15-16. sz.-i európai hódítók és misszionáriusok tollából származnak. A kórokozó óvilági felfedezését követően az amerikai kontinensen is intenzív kutatásokat folytattak, és 1911-ben Gaspar Vianna, brazil parazitológus azonosította az első újvilági *Leishmania*-fajt, a *L. braziliensis*-t. Az eltelt évtizedekben szerte a világon kiterjedt kutatásokat folytattak a kór terjedésének, pathomechanizmusának és járványtanának részletesebb megismerése céljából (Cox 2002).

3.1.2 A *Leishmania*-fajok rendszertani besorolása és biológiája

3.1.2.1 Rendszertan

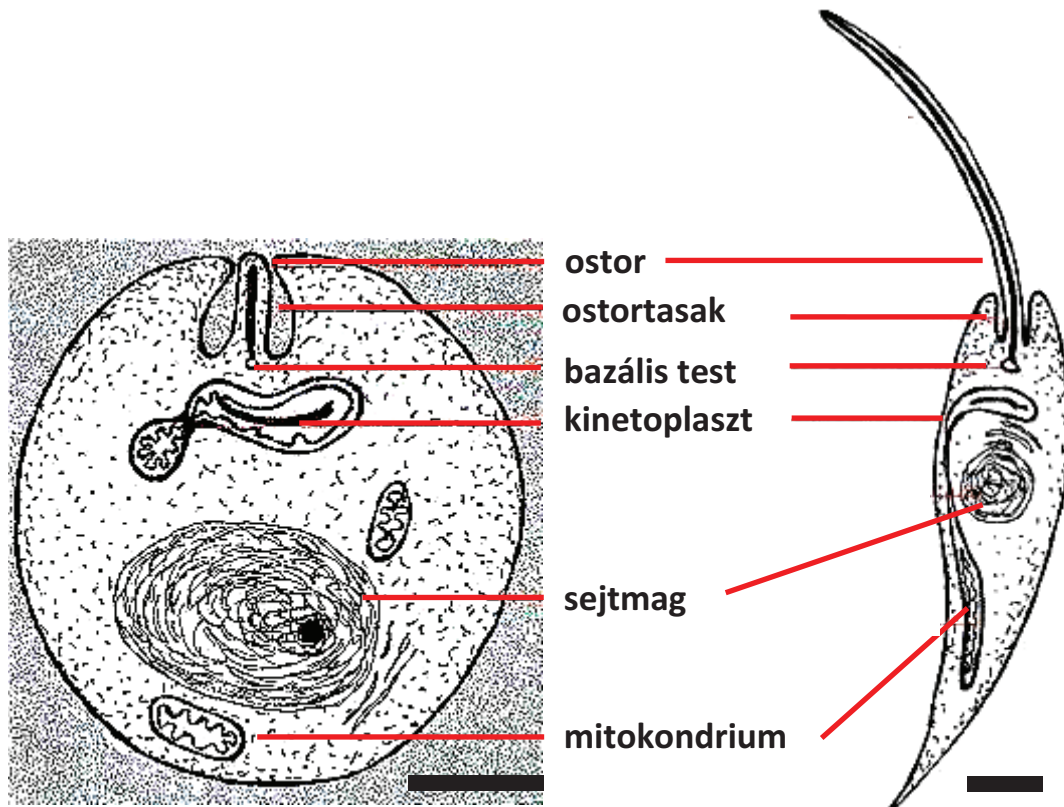
Hagyományosan a leishmaniák faji hovatartozását öko-biológiai tulajdonságaik (pl. járványtani ismeretek, gazdafajaik, klinikai tünetek) alapján határozták meg, ami gyakran vezetett ellentmondásos eredményekhez. Ezért az 1970-es évektől fokozatosan a molekuláris biológiai sajátyságaikra alapozták osztályozásukat. Napjainkban harminc fajt sorolnak az Euglenozoa törzs Kinetoplastida rendjének, Trypanosomatidae családjához tartozó *Leishmania* Ross 1903 genusba, amelyen belül *Leishmania* és *Viannia* alnemet különböztetnek meg (Bañuls és mtsai 2007). Miles és mtsai. (1980) alkalmazták elsőként a leishmaniák enzimjeinek elektroforetikus mobilitását vizsgáló módszert (angol elnevezése: Multilocus Enzyme Electrophoresis - MLEE), amellyel ún. zymodemeket, reprodukálható elválasztási-mintázat osztályokat határoztak meg, és erre alapozták faji besorolásukat. A módszer lehetővé tette fajokon belül a populációszintű és a több fajt magába foglaló csoportok megállapítását is (Bañuls és mtsai., 2007). Rioux és mtsai. (1990) 15 anyagcsere-enzim elemzésével a *Leishmania* alrenden belül az óvilági elterjedésű *L. donovani* (kivételesen az újvilági *L. chagasi*), *L. tropica*, *L. major*, *L. aetiopica* és az újvilági *L. mexicana* fajcsoportokat határoztak meg. Az újvilági *Viannia* alrenden belül a *L. braziliensis*, a *L. guyanensis* és a *L. naiffi* fajcsoportokat (1. ábra) azonosították e módszerrel (Bañuls és mtsai., 2007). Az 1990-es évek második felétől az automatizált DNS szekvencia meghatározás elterjedése elérhetővé tette a leishmaniák homológ DNS szakaszaiban mutatkozó variációk elemzésén alapuló osztályozását (angol elnevezése: Multilocus Sequence Typing - MLST). Az e módszerrel kapott információk hívebben tükrözik a leishmaniák leszármazási viszonyait, mint amelyeket az ún. MLEE módszerrel kaptak, ami a leishmaniák korábban elfogadott osztályozásának felülvizsgálatát indította el (Bañuls és mtsai., 2007). A *L. donovani* fajcsoportba tartozó *L. infantum*-ot és a *L. chagasi*-t a klinikai tünetek, valamint a két faj biológiai azonosságai miatt napjainkban azonosnak tekintik. Széles körben elfogadott, hogy a dél-amerikai faj az európai hódítók és kutyáik által behurcolt *L. infantum* törzsek közvetlen leszármazottja (Lukes és mtsai., 2007).



1. ábra A Leishmania-fajok rendszertani besorolása (Bañuls és mtsai., 2007 nyomán)

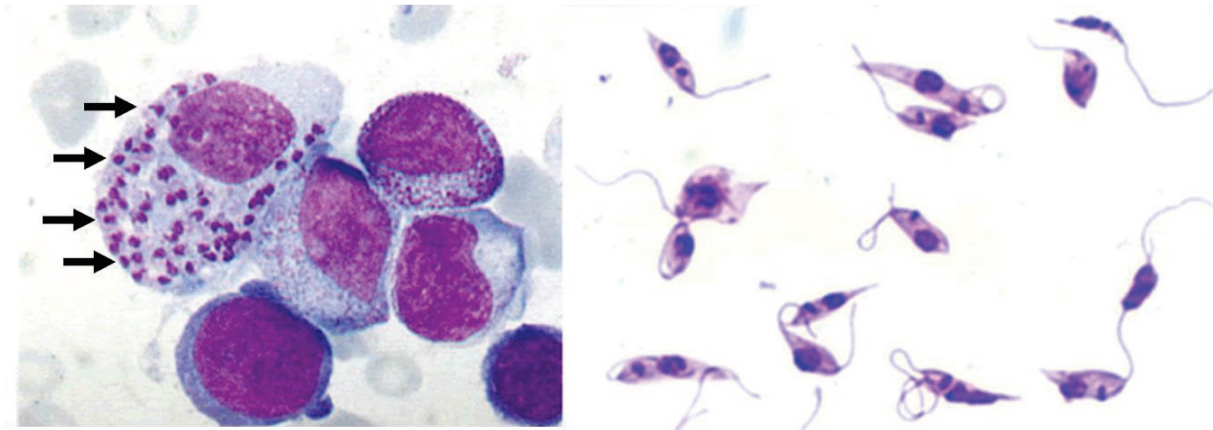
3.1.2.2 Morfológia

A leishmaniák az eukarióták általános sejtalkotói mellett ún. kinetoplaszttal is rendelkeznek, amely a sejt egyetlen, az ostor eredési pontjához közel helyeződő mitokondriumának belső kamrájában található. A kinetoplaszt relaxált DNS gyűrűk hálózatosan összekapcsolt tömege, melyet néhány tucat 20-40 kilobázis méretű, és több ezer, csupán néhány kilobázisnyi ciklikus lánc alkot (Lukes és mtsai., 2002).



2. ábra *Leishmania* amasztigóta (balra) és promasztigóta (jobbra) sematikus ábrázolása (mérce = 1mm) (http://www.leishmania.it/?page_id=6)

A parazita jellegzetes morfológiájú két alakját írták le. Az ún. **promasztigóta** aktív mozgásra képes, megnyúlt, 14-20 μm hosszúságú és 1-4 μm szélességű sejt egy ostorral, melynek eredési helyén egy jellegzetes membrán kettőzet, az ostortasak található (2. és 3. ábra). A másik megjelenési formája az ún. **amasztigóta** 4-20 μm átmérőjű, legömbölyödött, ostor nélküli sejt, amely a fertőzött emlős gazda makrofágjainak fagoszómáiban található (2. és 3. ábra). Korábban az amasztigótát írták le Leishman-Donovan testként (Chang, 1956).



3. ábra Leishmania amasztigóták (nyíllal jelölve) egy makrofágban (baloldali kép), és promasztigóták (jobbra) (Giemsa festés, 400x nagyítás)(Forrás: internet)

3.1.2.3 Fejlődésmenet

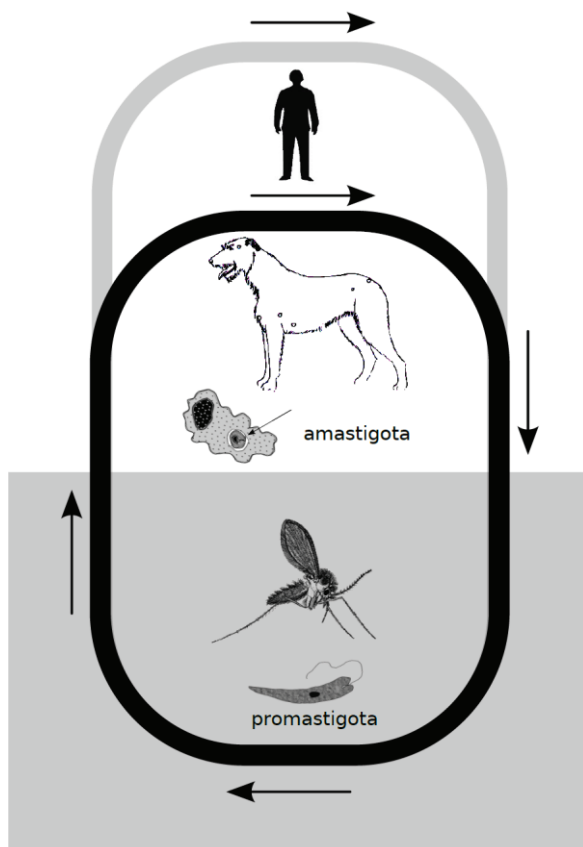
A Leishmania-fajok életsiklusa gazdaváltással történik, végleges gazdáik különféle emlős fajok, biológiai vektoraik lepkeszúnyogok (Diptera: Psychodidae) vérszívó nőtényei (Ready 2010). A leishmaniák fejlődésmenetét a laboratóriumban könnyen tenyészthető *L. major* fajon tanulmányozták, melynek végleges gazdája rágcsálók, ám ezeket az ismereteket érvényesnek tekintik a többi leishmaniára, köztük a *L. infantum*-ra is.

A lepkeszúnyogok a leishmaniával fertőzött gazdaállatból szívott vér emésztése során a makrofágokból kiszabaduló amasztigóttal fertőződnek (van Zandbergen és mtsai., 2006). Az amasztigóták specifikus lektinek segítségével a lepkeszúnyog közepbelének mikrovillusaihoz kötődnek, majd gyorsan osztódó, ostoros, ún. prociklikus promasztigótává fejlődnek. Ezek a külső hőmérséklettől függően 1-2 hét alatt alakulnak át lassan osztódó ún. metaciklikus alakokká, amelyek a közepéből a garat üregébe vándorolnak, oly módon, hogy kitinoldó enzimeikkel a két részt elválasztó szelepet károsítják. Itt a promasztigóták egy glikoprotein természetű anyagot választanak ki, amely pár nap alatt kitölti a rovar begyének üregét, fizikai gátat képezve a nyelés útjában. Az így képződött mátrix anyagba ágyazódva várják a fertőzésre kész promasztigóták a következő alkalmat, amikor a lepkeszúnyog vért szív, és a végleges gazda bőrén ejtett sebbe öklendezi garatüregének fertőző tartalmát (Bates, 2007).

A bőrön ejtett sebhez érkező polimorfonukleáris granulociták (PMN) elsőként kezdik el bekebelezni a metaciklikus promasztigótákat, amelyeket az immunválasz második hullámában érkező makrofágok a széteső PMN sejtek törmelékével fagocitálnak (van Zandbergen és mtsai., 2004). A bekebelezést követően a paraziták morfológiája

megváltozik, ostorukat elveszítve és lekerekedve amasztigóta alakokká alakulnak (Chang, 1956). A lizoszómákban a leishmaniák megemésztése gátolt, s így a makrofágok magukkal vihetik a sértetlen parazitákat a gazda parenchimas szöveteibe (van Zandbergen és mtsai., 2004). A bőrbe jutott promasztigóták egy része a makrofágok támadásakor programozott sejthalállal elpusztulva csillapítja a gazda immunválaszát (van Zandbergen és mtsai., 2006), és ennek hatására a fertőződés kialakulásához szükséges promasztigóták száma pár millióról 10-100 darabra csökken (Titus és Ribeiro, 1988). E folyamatban a lepkeszúnyog nyálának ismeretlen természetű és működésű, a gazda immunválaszát gátló vegyületei is szerepet játszanak (Waitumbi és Warburg, 1998, Bates, 2007, Rogers és Bates, 2007). A kórfejlődés későbbi szakaszában az amasztigóták a makrofágokban klonálisan szaporodva felhalmozódnak a májban, a lépben és a csontvelőben (Paltinieri és mtsai., 2010).

3.1.3. A leishmaniák gazdaköre, járványtani ciklusai és földrajzi elterjedése



4. ábra A *L. infantum* élelciklusa
(Forrás: Farkas és Tánczos, 2009)

A leishmaniák végleges gazdái közé rágcsáló, vendégízületes és ragadozó emlősök, továbbá háziállatok és az ember tartoznak. Tizenöt faj képes az ember fertőzésére, melyek közül háromnak a házikutyák és a kutyafélék, további tíznek különféle vad- és háziállat fajok a rezervoárjai (Baneth és mtsai., 2008, Gramiccia és Gradoni, 2005).

Az egyes *Leishmania*-fajok csak a rájuk jellemző közti- és végleges gazdák alkotta járványtani ciklusban képesek fejlődni (Bañuls és mtsai., 2007). A legősibbnek a vadon élő emlősök (pl. erdei rágcsálók, lajhárok, armadillók, szirti borzok) közötti, erdei másnéven **szilvatikus** átviteli ciklust tekintik, amely az Újvilág esőerdeiben előforduló *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. panamensis* és *L. shawi*, ill. a kelet-afrikai *L.*

aethiopica fajokra jellemző (Gramiccia és Gradoni, 2005). E fajok embereket, kutyákat és más háziállatokat is fertőzhetnek, a kiirtott esőerdő helyén létesített mezőgazdasági területeken és településeken (Killick-Kendrick, 1999).

Kelet-Afrikától a Közel-Keleten át Indiáig előforduló *L. donovani* (Lukes és mtsai., 2007), ill. az Afrikában jelen lévő *L. tropica* emberről-emberre terjed (Bañuls és mtsai., 2007). Ritkán kutyákban is diagnosztizálnak *L. tropica* okozta fertőzést, ám ezeknek az elszórt eseteknek járványtani jelentőséget nem tulajdonítanak (Dereure és mtsai., 1991).

A települések környezetében, az ún. peridomesztikus járványtani ciklusban terjedő leishmaniák leggyakrabban az emberek és a kutyák között okoznak fertőzéseket. Az Andok magashegyi, elszigetelt völgyeiben a *L. peruviana*, Dél- és Közép-Amerika alacsonyabban fekvő régióiban pedig a *L. chagasi* okoz megbetegedéseket. Mindkét faj rezervoár gazdája a házikutya és a kutyafélék (Gramiccia és Gradoni, 2005) Az Európában, a Közel-Keleten és Észak-Afrikában előforduló *L. infantum* (Lukes és mtsai., 2007) legfontosabb rezervoárjai is a kutyák (**4. ábra**) (Gramiccia és Gradoni, 2005).

A továbbiakban az Európában előforduló, köz- és állat-egészségügyi szempontból jelentős *L. infantum*-mal kapcsolatos ismereteket foglalom össze.

3.1.4. A kutya *L. infantum* okozta fertőződésével kapcsolatos ismeretek

3.1.4.1 A *L. infantum* átvitele és járványtani sajátosságai

A kutya a *L. infantum* leggyakoribb rezervoár gazdája, amely elsődlegesen a parazitát hordozó lepkeszúnyogok vérszívása útján fertőződik, de ismeretes a kutyák vérátömlesztéssel, harapással, spermával és kongenitális úton történő, közvetlen fertőzése is (Gaskin és mtsai., 2002; Rosypal és mtsai., 2005; Petersen és Barr, 2009). A kutyák közvetlen módon történő fertőződésének járványtani szerepét eltérően ítélik meg, a legtöbb szerző korlátozott jelentőségűnek gondolja, ami az esetek legfeljebb 4%-ában fordulhat elő (Maroli és mtsai., 2001; Gavgani és mtsai., 2002).

Az endémiás területeken élő kutyapopulációkban a klinikai tüneteket mutató ebek aránya ritkán haladja meg az 50%-ot (Gramiccia, 2011), de a lepkeszúnyogok a tünetmentes hordozóktól is fertőződhetnek (Molina és mtsai., 1994). A bántalom földrajzi előfordulására jellemző, hogy az endémiás térség kisebb-nagyobb, ún. fókuszterületein a legmagasabb a

fertőzések száma, míg ezek között csak elvétve találhatunk fertőzött állatokat (Gramiccia, 2011).

A *L. infantum*-mal fertőződött kutya hosszú hónapokon, éveken át tünetmentesen hordozhatja a leishmaniákat (Dujardin és mtsai., 2008). Emiatt a parazitát gyakran hurcolják be az endémiás régióban fertőződött kutyák utaztatása és kereskedelme révén olyan országokba, pl. Svédországba, Hollandiába, Nagy-Britanniába, Németországba, Ausztriába, ill. az USA-ba, ahol a parazitózis nem fordul elő (Slappendel és mtsai., 1999; Teske és mtsai., 2002; Petersen és Barr, 2009). Az ilyen esetek járványtani jelentőségét többnyire elhanyagolhatónak vélik, mivel ezekben az országokban nincsenek jelen a *L. infantum* vektorai (Teske és mtsai., 2002). Petersen és Barr (2009) ezzel szemben súlyosabban ítéli meg a nem-endémiás országokba behurcolt tünetmentesen fertőzött ebek járványtani jelentőségét. E szerzőpáros lehetségesnek tartja, hogy a *L. infantum* éveken keresztül közvetlenül terjedjen kutyáról-kutyára, lepkeszúnyog vektoroktól mentes országokban is. Elméletüket az USA északi és Kanada déli államaiban tartott kopótenyészetekben végzett szűrővizsgálat eredményeire alapozzák. Annak ellenére, hogy ezekben az államokban a parazita vektor-fajai nem fordulnak elő, a megvizsgált 12 000 kutya 8,9%-ának a vérében mutattak ki *Leishmania*-specifikus ellenanyagot. A parazitát vizsgálva megállapították, hogy az a MON1 zymodembe tartozik, ami igen gyakori Dél-Európában. Feltehetően innen hurcolták be az Újvilágba.

Európa lepkeszúnyog-mentes országai közül Svájcban (Schawalder, 1977), Angliában (Harris, 1994) és Hollandiában (Slappendel és Teske, 1999) találtak *L. infantum*-mal fertőzött kutyákat, amelyeknek a kórtörténete nem tartalmazott endémiás országba tett utazást, s így a fertőzés útja és forrása rejtve maradt.

Egyes szerzők a kutyák mellett a macskákat tekintik a parazita másodlagos rezervoárjának Európában. A macskák természetes ellenállását a kutyákénál erősebbnek tartják a parazitával szemben (Gramiccia és Gradoni, 2005), a tünetmentesen fertőzött állatok aránya helyenként akár az 59%-ot is elérheti. Azonban nem ismert, hogy vajon ezektől az állatoktól a lepkeszúnyogok képesek-e fertőződni a parazitával (Gramiccia és Gradoni, 2005).

3.1.4.2 A kutya leishmaniózis endémiás előfordulása Európában

A Földközi–tenger medencéjének európai, kis-ázsiai és észak-afrikai országaiban fordul elő a kutyák *L. infantum* fertőzöttsége endémiásan (Ready, 2010). A parazita okozta bántalom elterjedési területét a vektorként ismert lepkeszúnyogfajok elterjedése és

klimatikus hatások befolyásolják. Kimutatták, hogy a kutyák leishmanióziisa Európában a januári 5-10°C és a júliusi 20-30°C-os izotermák által határolt területen belül fordul elő, legfeljebb 4-600 m-es tengerszint feletti magasságban, legtöbbször a 45. szélességi fok alatt (Kuhn, 1999).

Délnyugat-Európa endémiás területein a *Leishmania*-ellenes antitesteket termelő, szeropozitív kutyák aránya a vizsgált populációkban 1,7 – 40% között változik (Deplazes és mtsai., 1998; Oliva és mtsai., 2006), míg molekuláris diagnosztikai módszerekkel kimutatták, hogy helyenként az ebek 80%-a fertőzött (Moreno és Alvar, 2002). Ezekre az adatokra alapozva az utóbbi szerzők kb. 2,5 millióra becsülték a tünetmentesen fertőződött ebek számát a térségben, ahol ezt a kórokozót tekintik a kutyák legjelentősebb közvetlen vagy közvetett halálozási okának.

A *L. infantum* a mediterrán térség keleti felében, a hazánkkal szomszédos Horvátországban (Bosnić és mtsai., 2006), Szerbiában (Miscovic és mtsai., 1998) és északabbra, Romániában is endémiás előfordulású (Ready, 2010). A jugoszláv utódállamok területén 1931 óta változatos módszerekkel (klinikai, közvetlen parazita kimutatás, szerológiai vizsgálat, PCR) gyűjtik az adatokat a kutyák *L. infantum* okozta fertőzöttségéről, melynek prevalenciája helyenként és vizsgálatonként 0% és 42,8% között változott (Bosnić és mtsai., 2006).

3.1.4.3 A kutya leishmaniózisának hazai előfordulása

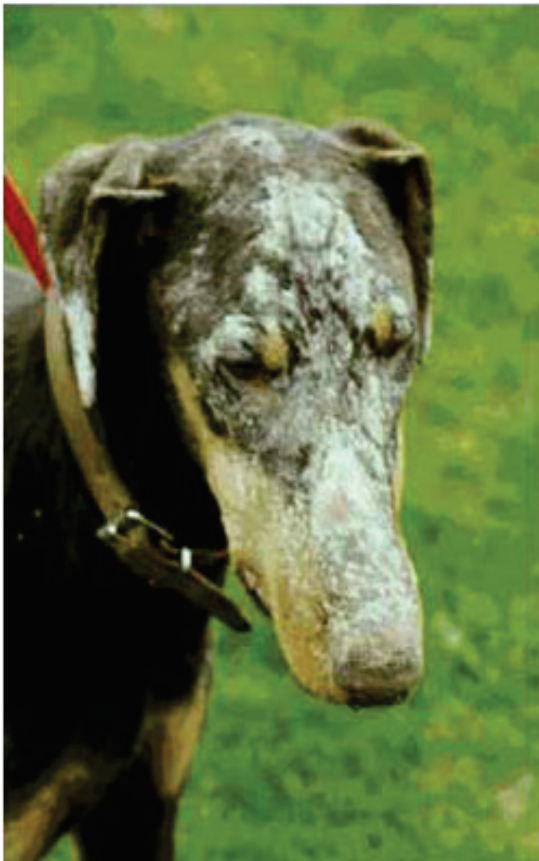
Kutatásaink megkezdéséig hazánkban csak egy kutyában diagnosztizáltak a bántalmat, amelyet *L. infantum* okozott. A korábban hosszabb időt Görögországban töltő doberman fajtájú eben részleges alopecia, testszerte a nyirokcsomók megnagyobbodása, továbbá főleg a fülön és a hátsó végtagokon noduláris, ulceratív bőrelváltozások mutatkoztak. A diagnózist szerológiai teszttel erősítették meg (Magdus, 2004). További két lehetséges esetről személyes közlés révén értesültünk (VetMedLab, Németország), amikor magyarországi menhelyről külföldre szállított kutyákban mutatták ki a *L. infantum* okozta fertőzöttséget PCR módszerrel, de ezeknek az állatoknak a fertőződési helyéről és forrásáról nem állt rendelkezésre információ.

3.1.4.4 Kórfejlődés és klinikai tünetek

A fertőződött kutyán gyakran csak hónapok, évek múltán jelentkeznek a parazitózis első tünetei (Dujardin és mtsai., 2008). A parazita virulenciája, a kutya fogékonysága, általános kondíciója és az immunológiai státusza befolyásoló tényezők (pl.

immunszuppresszív kezelés) mellett társfertőzések (pl. demodicosis, dermatophytosis, ehrlichiosis) is hatással lehetnek a bántalom klinikai tüneteinek kifejlődésére (Baneth és mtsai., 2008; Kontos és Koutinas, 1993; Bravo és mtsai., 1993; Ciaramella és mtsai., 1997).

A fertőzött ibizai kutyákban meglepő módon kivételesen ritkán jelentkeznek a betegség tünetei. Ebben a fajtában a parazitával szemben markáns sejt-közvetített immunválasz kifejlődését állapították meg (Solano-Gallego és mtsai., 2001). A CD4+ Th1 sejtek citokinjei (interleukin-2 [IL-2], gamma interferon [IFN- γ] és tumor nekrozis faktor-alfa [TNF- α]) aktiválják a makrofágokat, amelyek nitrogén-oxid termelésüket fokozva elpusztítják a lizoszómáikban sokasodó amasztigótákat (Holzmüller és mtsai., 2006). Az erőteljes sejt-közvetített immunválasz kifejlődése esetén **bőr leishmaniózis** alakulhat ki. A fertőzött lepkeszúnyog vérszívásának a helye körül 1-3 cm átmérőjű foltban a bőr gyulladása és szőr hullás jelentkezik, amit gyakran fehéres korpázás, exfoliatív dermatitisz és a közeli nyirokcsomók megnagyobbodása kísér. Idővel az elváltozás fekélyessé válhat. Az ilyen bőrterület gyakran a fejen található, nem viszket, nyomásra nem érzékeny, a tünetek 1-6 hónap múltán spontán megszűnhetnek (Ferrer 1999). Egyes kutatási eredmények arra



5. ábra A *L. infantum* okozta jellegzetes bőrelváltozások és szőrhullás kutya fején (Forrás: National Veterinary School of Lyon).

utalnak, hogy a kutyák amasztigótákkal szemben hatásos sejt-közvetített immunválaszának kialakulását a paraziták biológiailag aktív anyagaikkal képesek gátolni (Baneth és mtsai., 2008). Más fajtájú kutyákban a parazitával szemben legtöbbször humorális immunválasz alakul ki. A CD4+ Th2 helper sejtek citokinjei (IL4 és IL10) B-limfocitákat aktiválnak, amelyek a leishmaniákkal szemben hatástalan specifikus ellenanyagokat (IgG1 és IgG2) termelnek. A makrofágok lizoszómáiban az amasztigóták emésztése gátolt, így azok sokasodva a parazitózis több szervrendszert érintő, szisztémás változatát, a kutya **viscerális leishmaniózisát** okozzák (Baneth és mtsai., 2008).

Ennek ritkán tapasztalható heveny lefolyása lázzal és a nyirokcsomók megduzzadásával, és gyakran súlyos

veseelégtelenséggel jár, de bőrtünetek nem mutatkoznak (Blavier és mtsai., 2001). A változatos tünetekkel járó idült viscerális leishmaniózis hetek, hónapok alatt fejlődik ki. Gyakori a láz, az izomtömeg csökkenése, az étvágytalanság és a letargia (Ferrer 1999). A máj, a lép valamint kezdetben a popliteális, később a további nyirokcsomók szimmetrikusan megnagyobbodhatnak. A nyirokcsomókban, a bőrben megjelenő csomókban és a csontvelőben az amasztigoták intenzíven szaporodnak (Paltrinieri és mtsai., 2010). A paraziták közvetlen szövétkárosító hatására elváltozások jelentkezhetnek a szemeken (pl. uveitis, keratitis, előrehaladott stádiumban cataracta) (Peña és mtsai., 2000), szőrhiányos területek alakulhatnak ki a fejen és a test többi részén (**5. ábra**). Alkalmanként az orrtükrön fekély és depigmentáció mutatkozik, egy vagy kétoldali epistaxis tapasztalható (Jüttner és Rodriguez-Sanchez 2001). Gyakran figyelhető meg a körmök rendellenes túlnövekedése és elváltozása (onychogryposis, paronychia), valamint a lábujjak bőrének hiperkeratózisa (Koutinas és mtsai., 1999)

A bántalomban szenvedő kutya vérében az immunoglobulinok emelkedő szintje az albuminok és a vérelemezkek csökkenő mennyiségével párosul, és vérfogyottság jelentkezik (Noli 1999). A vesékben felhalmozódó ellenanyagok miatt vérvizelés és veseelégtelenség alakulhat ki (Ferrer 1999). A végtagok disztális ízületeiben lerakódó immunkomplexek a kutya fájdalmas sántaságát eredményezik (Ferrer 1992).

A kutyapopulációkon belül a leishmania specifikus ellenanyagokat termelő egyedek száma az idősebb korcsoportokban magasabb. Az 5-6 éves kutyák között fordulnak elő legnagyobb számban, míg az ennél idősebb korosztályokban arányuk csökken. Kanok esetében az ellenanyag szint gyakran magasabb, mint a szukák vérében, aminek a hátterében hormonális hatások, vagy a fertőzött vemhes állatok nagyobb mortalitása állhat (Ferrer 1999).

3.1.4.5 A kórjelzés módszerei

A fertőzött kutyákban a klinikai tünetek nem kórjelzők, mivel változatos összetételben, súlyossággal és eltérő időben jelentkezhetnek. Kizárólag ezek megfigyelésére nem lehet megbízható diagnózist alapozni, ehhez több vizsgáló módszerrel kapott eredmény együttes értékelése szükséges.

3.1.4.5.1 A parazita kimutatása

A parazitát közvetlenül kimutató módszerek specifitása 100%-os, ám alacsony érzékenységük miatt az eredmények értékelése során körültekintően kell eljárni (Noli, 1999).

A megnagyobbodott nyirokcsomókból és a csontvelőből, továbbá a bőrcsomókból vékonytű aspirációs technikával vett bioptátumokból May-Grünwald-Giemsa festéssel készített citológiai kenetek vizsgálhatóak. A vizsgálat érzékenysége csontvelő eredetű minták esetében 50-70% (Ciaramella és mtsai., 1997), míg a nyirokcsomókból vett minták értékelésekor csak kb. 30% (Saridomichelakis és mtsai., 2005). Az elváltozott szervek hematoxin-eozinnal vagy Giemsa-val festett szövettani metszetein csak nagyszámú parazita esetén valószínű ezek észlelése, de a módszer érzékenysége immunperoxidáz festéssel növelhető (Solano-Gallego és mtsai., 2004).

A kutyából vett bioptátumokat Novy-McNeal-Nicolle (NNN) médiumra, vagy ennek módosított változataira oltják és az oltványokat 3-5 nappal később vizsgálják. Az értékelésnél tekintettel kell lenni a módszer alacsony érzékenységére (Strauss-Ayali és mtsai., 2004).

3.1.4.5.2 Ellenanyagok kimutatása

Széles körben elterjedtek a kutyák vérében keringő leishmaniákkal szemben termelt ellenanyagokat kimutató szerológiai módszerek. Az ELISA, a direkt agglutinációs teszt (DAT), a Western-blot és az immunkromatográfia (Mettler és mtsai., 2005) mellett a leggyakrabban használt, és standardnak tekintett módszer az indirekt immunfluoreszcens ellenanyag teszt (IFAT) (Noli, 1999). A szerológiai vizsgálatok a tüneteket mutató kutyák 88-100%-ánál, de a tünetmentes fertőzötteknek csak 30-60 %-ában adnak pozitív eredményt (Solano-Gallego és mtsai., 2001), mivel az utóbbi állatokban a sejt-közvetített immunválasz dominál. Az eredmények értékelése során fontos szempont, hogy a bántalom korai szakaszában még nem termelődnek kimutatható ellenanyagok. Emiatt a fertőződés gyanúja esetén a szerológiai vizsgálatot pár hét, hónap elteltével meg kell ismételni.

3.1.4.5.3 Parazita DNS kimutatása (PCR)

A betegségnek az ellenanyagok termelődését megelőző szakában is kimutatható a parazita örökítőanyaga a fertőzött kutya véréből, és más érintett szerveiből (máj, lép, stb.). A polimeráz láncreakció (angolul: Polymerase Chain Reaction - PCR) vizsgálat csontvelőből 100% valószínűséggel mutatja ki a parazita DNS-ét. Alvadásában gátolt vérből és az ún. buffy coat-ból (a vérminta fehérvérsejteket tartalmazó frakciója) a parazita kimutatásának valószínűsége 17, ill. 60%, ami valószínűleg a kutyák vérében előforduló PCR reakciót gátló anyagok jelenlétével magyarázható (Lachaud és mtsai., 2002). A leishmaniák sejtmagjában lokalizált 40-200 másolatban előforduló rRNS-t kódoló szakaszt vizsgálva egy ml vérben 2-5

parazita a módszer észlelési határa. A több ezres kópiaszámú kinetoplaszt DNS (kDNS)-t kimutató PCR eljárás ennél érzékenyebb: 10^{-3} parazita/ml vér (Lachaud és mtsai., 2002).

3.1.4.6 Gyógykezelés és védekezés

Napjainkban a kutyák gyógykezelésére különféle hatóanyagokat, így pl. meglumin-antimonátot, amfotericin-B-t, aminosidint és allopurinolt, ill. ezeket kombinálva alkalmazzák (Noli, 1999). A legelterjedtebb a meglumin-antimonát, és az emberek kezelésére is használatos amphotericin B alkalmazása, de vesekárosító hatásuk, és a velük szemben a leishmaniákban gyakran kialakuló rezisztencia miatt különös körültekintést igényel (Alvar és mtsai., 2004). A gyakran több hónapig húzódó intenzív és igen költséges gyógyszeres kezelés sem biztosít parazita-mentességet, emiatt a bántalomból „kikezelt” kutyák körében pár hónapon, éven belül gyakori (kb. 75%) a bántalom kiújulása. Ezért hátralévő életükben a leishmaniózissal kezelt kutyák ellenanyag szintjét 3-6 havonta szükséges ellenőrizni (Slappendel és Teske, 1997). A hatóanyagok liposzómában történő adagolása és a kutya sejt-közvetített immunválaszát stimuláló eljárások várhatóan hatékonyabb kezelési módszerek kifejlesztését teszik lehetővé a jövőben (Noli, 1999)

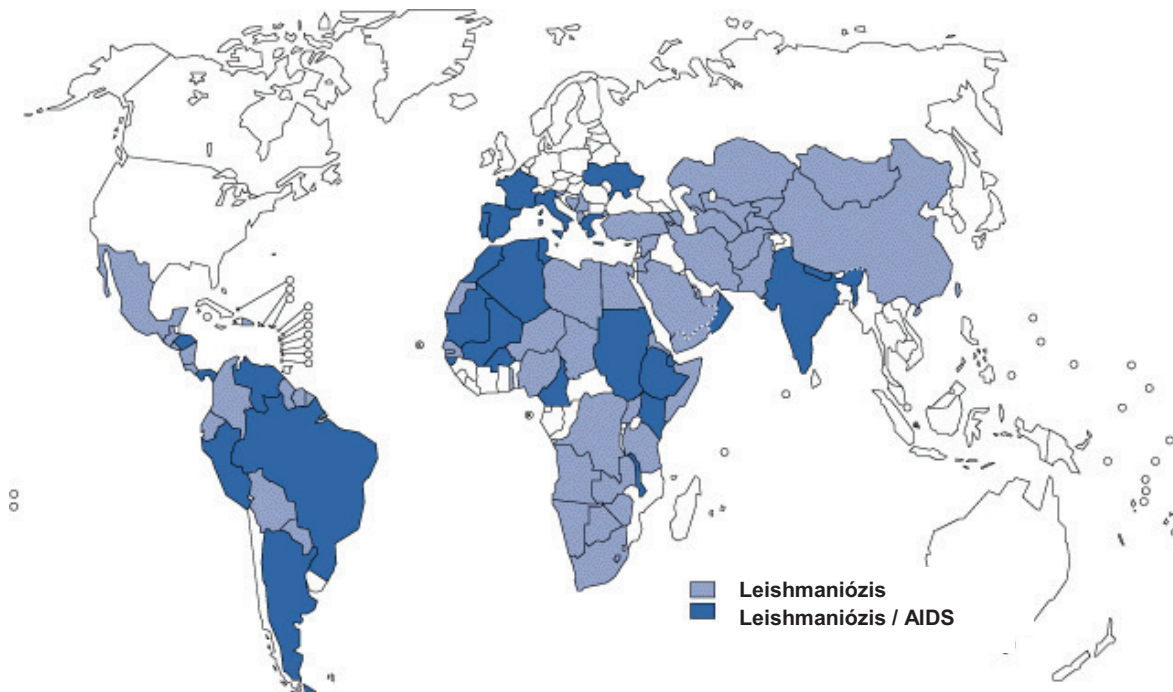
A megbetegedések számának csökkentésében és a bántalom terjedésének visszaszorításában a megelőzésnek kiemelt jelentősége van (Gradoni és mtsai., 2005). Dye (1996) a leishmaniózis elleni védekezésben alkalmazott stratégiákat matematikai eszközökkel elemezve úgy találta, hogy legkevésbé hatékony módszer a fertőzöttnek talált kutyák euthanáziája, amelyet Brazíliában alkalmaztak az ezredforduló táján. Az állatvédelmi szempontból is elfogadhatatlan gyakorlat egy retrospektív járványtani elemzésben ténylegesen hatástalannak bizonyult, mivel alkalmazási területén nem csökkent a fertőzött kutyák és emberek száma (Moreira és mtsai., 2004). A kutyák és az emberek védőoltása Dye (1996) szerint hatékonyabb eszközei a leishmaniózis visszaszorításának. Az emberek oltására kifejlesztett, legyengített leishmaniákat tartalmazó vakcinák a tesztelt kutyák kb. 50%-ában alakítottak ki védettséget a parazitákkal szemben. Ezért az 1990-es évektől kezdődően több kutatócsoport is kísérletezett második generációs, fehérje antigént tartalmazó kutya vakcinákkal, s ennek során a brazil Leishmune (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Brazília) és LeishTec (Hertape Calier Saúde Anima, Brazília), valamint az európai CaniLeish (Virbac, Carros, Franciaország) oltóanyagok kerültek kifejlesztésre (Palatnik-de-Sousa, 2012). Leishmune-nal oltott kutyákban a *L. infantum* fertőződés 98%-kal kisebb eséllyel alakult ki, mint a kontrollcsoportban, továbbá az immunizált kutyák vérszérumán nevelt lepkeszúnyogok leishmaniák iránti fogékonysága 74,3%-kal csökkent. A hagyományos kemoterápia mellett alkalmazva a vakcinát, a sejt-közvetített immunválasz

stimulációját tapasztalták, ami a fertőzött kutyák parazitamentes gyógyulásához vezetett (Borja-Cabrera és mtsai., 2008). A CaniLeish a beoltott kutyák 92%-ban alakított ki védettséget a *L. infantum* okozta fertőzéssel szemben, de ennek használata során immunprofilaktikus és terápiás hatást nem észleltek (Lemesre és mtsai., 2007). A jövőben a harmadik generációs rekombináns fehérje oltóanyagok fejlesztése mellett az olcsón előállítható DNS vakcinák elterjedése várható (Palatnik-de-Sousa, 2012)

Dye (1996) matematikai modellje értelmében a leishmaniák terjedését leghatékonyabban korlátozó stratégia a parazita terjesztéséért felelős lepkeszúnyogokkal szembeni védekezés, amelyet a lepkeszúnyogokkal foglalkozó részben tárgyalok részletesen.

3.1.5 Az ember *L. infantum* okozta fertőződésével kapcsolatos ismeretek

A WHO adatai szerint napjainkban az Ó- és Újvilág 88, többségében trópusi országában (6. ábra) kb. 350 millió ember él olyan területeken, ahol leishmaniákkal fertőződhet. Az évenkénti új fertőzések számát kb. 2,5 millióra, a leishmaniózissal összefüggésbe hozható halálesetek számát mintegy 60 ezerre becsülik (WHO 2002).



6. ábra A leishmaniózis és a HIV és leishmaniák okozta koinfekció előfordulása Földünk országaiban
(http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html)

A *L. infantum* évente becslések szerint 600-700 ember megbetegedését okozza a Földközi-tenger mellékén (Riera és mtsai., 2004). A bántalom súlyos, életveszélyes formája az ún. **viscerális leishmaniózis (VL) (7. ábra)**, ami a máj, a lép és a nyirokcsomók megnagyobbodásával, anaemiával, változó lázzal és súlyvesztéssel járó szisztémás megbetegedés. Kezelés hiányában gyakran halálos kimenetelű. A **bőr leishmaniózis (BL)** a nedvedző fekélyeket okozó, enyhébb formája a bántalomnak, mely gyakori gyermekekben, és rendszerint spontán, heget hagyva gyógyul **(7. ábra)** (Bañuls és mtsai., 2007).



7. ábra Bőr leishmaniózis tünete a fekélyes bőrelváltozás (balra). Viscerális leishmaniózisban szenvedő férfi hasfalát a bántalom hatására megnagyobbodott mája és lépe feszíti (jobbra)
(Forrás: CDC <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>)

A kialakuló tünetek súlyossági foka függ a fertőzött személy immunológiai státuszától és az esetleges társfertőzésektől. Európában a toxoplazmózis és a kriptokokkózis mellett a leishmaniózis a harmadik legjelentősebb oportunista fertőzés a HIV fertőzöttek körében (Desjeux és Alvar, 2003). A leishmaniózisból gyógyult betegeknél parazita-mentesség csak az esetek egy részében érhető el, emiatt a parazitahordozó egyéneknél, akár évek múltán ismét jelentkezhetnek a parazitózis tünetei. Endémiás területeken a tünetmentesen fertőzöttek aránya akár a 22%-ot is elérheti, akiknek jelentős szerepe lehet a parazita fertőzési ciklusának fenntartásában (Riera és mtsai., 2004).

A *Leishmania*-fajok átvitelében egyes lepkeszúnyogoknak van elsődleges szerepe, azonban feljegyezték az amasztigóták közvetlen átvitelét az emberek között szervátültetés,

vérátömlesztés, ill. kábítószer-élvezők közös túhasználata során (Ready, 2010). Ismeretes a leishmaniák anyáról magzatra történő átvitele is (Kollaritsch és mtsai., 1989).

Hazánkat *L. infantum*-mentes országnak tekintik. Egy tisztázatlan eredetű esettől eltekintve, amikor egy 4 éves budapesti kislány véréből mutatták ki a parazitát (Makara, 1942), a fertőzöttnek talált személyek külföldön fertőződtek (Várnai és mtsai., 1985). Az elmúlt évtizedben egy eset vált ismertté, amikor Horvátországban nyaralt egyénnél állapították meg a *L. infantum* okozta viscerális leishmaniózist (Fried és mtsai., 2003).

3.2 A lepkeshúnyogokkal kapcsolatos ismeretek rövid áttekintése

3.2.1 Elnevezés, rendszertan és földrajzi elterjedés

A lepkeshúnyognak (Diptera: Psychodidae) nevezett rovarok apró termetű kétszárnyúak, melyeket az angol nyelvű szakirodalom „phlebotomine sand fly”-nak nevez. A „phlebotomine” előtag alkalmazása fontos, mivel a száraz területeken élő bögölyöket, törpe- és púpos szúnyogokat is gyakran „sand fly”-nak nevezik szerte a világban, ami zavart okozhat (Killick-Kendrick, 1999).

A rovarok osztályán belül a kétszárnyúak (Diptera) rendjének fonalas csápúak (Nematocera) alrendjének lepkeshúnyogok (Psychodidae) családjába közel 800 fajt sorolnak (Lane 1993). Közülük számos szaprofita táplálkozású. Gerinces állatok vérére a fajok csaknem felének a nőstényei fogyasztják. E fajokat a Phlebotominae alcsalád 3 óvilági (*Phlebotomus*, *Sergentomyia* és *Chinius*) és 3 újvilági (*Brumptomyia*, *Lutzomyia* és *Warileya*) nemébe sorolják (Williams 1993). Köz- és állat-egészségügyi jelentősége a *Phlebotomus* (*P.*) Rondani & Berté, 1840, és a *Lutzomyia* (*Lu.*) França, 1924 nemeknek van (Ready, 2010). A *Phlebotomus* genusba tartozó közel 90 fajt tizenkét alnembe sorolják, melyek közül járványtani szempontból a *Larroussius*, a *Paraphlebotomus*, a *Phlebotomus* és a *Transphlebotomus* a legjelentősebbek (Rispaill és mtsai., 1998). Az Újvilág gazdag lepkeshúnyog faunáját alkotó közel 400 fajt a *Lutzomyia* nem 15 alneme foglalja magába (Young és Duncan, 1994).

A vérszívó lepkeshúnyogok az Óvilág és az Újvilág trópusi, szubtrópusi és meleg mérsékelt övezeteiben élnek (Lane, 1993). Elterjedésük határa Kanada déli (Young és Perkins, 1984), valamint Franciaország és Mongólia északi részéig, kb. az 50. (Lewis, 1982), míg a déli féltekén a 40. szélességi fokig nyúlik (Lane, 1993). Kevés fajuk él Nyugat-

Afrikában, Délkelet-Ázsiában és Ausztráliában (Service, 2002), míg Új-Zélandról és a csendes-óceáni szigetekről teljesen hiányoznak. E széles elterjedési területen belül, a Holt-tenger mélyföldjétől Afganisztán 3300m magas hegyeiig, minden élőhely típusnak és tengerszint feletti magassági régióknak megvan a jellegzetes lepkeszúnyog faunája (Killick-Kendrick, 1999; Lindgren és mtsai., 2004).

3.2.2 A leishmaniák vektoraiként ismert lepkeszúnyogok

A lepkeszúnyogoknak a leishmaniák terjesztésében betöltött szerepét elsőként a Sergent-fivérek 1921-ben publikált kísérletei bizonyították. Még ugyanabban az évtizedben újvilági fajok kapcsán is kiderült, hogy a *Leishmania*-fajok terjesztői. Kean vizsgálatai tették egyértelművé 1941-ben, hogy a parazita átvitele e rovarok vérszívása során történik (Cox, 2002). Napjainkig világszerte több mint 30 lepkeszúnyog fajt azonosítottak leishmaniák biológiai vektoraként (Killick-Kendrick, 1999).

A Közép- és Dél-Amerika nedves éghajlatú, erdős élőhelyein 15 *Lutzomyia*-faj terjeszti az ottani 14 *Leishmania*-fajt, de további 31 faj vektor szerepe valószínűsíthető. Az Óvilág trópusi, szubtrópusi, sivatagos és félsivatagos területein előforduló 16 *Phlebotomus*-faj öt *Leishmania*-faj terjesztésében játszik szerepet, és a kutatási eredmények arra utalnak, hogy további 13 fajnak lehet vektor jelentősége (Killick-Kendrick, 1999).

Számos *Leishmania*-faj fejlődése és átalakulása kizárólag egyetlen lepkeszúnyogfajban, a parazita, ún. specifikus vektorában mehet végbe, míg mások több, ún. permisszív vektorban is fejlődhetnek (Killick-Kendrick, 1999). Ismert permisszív vektor, pl. a közel-keleti elterjedésű *P. arabicus* (Volf és Myskova, 2007), amelyben a *L. tropica* mellett a *L. infantum* és a *L. major* fejlődése is végbemehet (Jacobson és mtsai., 2003). A permisszív vektorok járványtani szempontból igen jelentősek, mivel lehetővé teszik az élőhelyükre behurcolt, nem endémiás leishmaniák helyi átvitelét. Példaként említhető a *L. chagasi*, amelynek terjesztését 500 évvel korábbi behurcolása óta permisszív biológiai vektora, a *Lu. longipalpis* végzi Dél-Amerikában (Lukes és mtsai., 2007).

A Földközi-tenger medencéjében kb. 30 *Phlebotomus*-faj előfordulása ismert, a genus legnagyobb változatosságát ebben a régióban éri el (Lane, 1993). A *Laroussious* algenusba tartozó öt fajt a *L. infantum* specifikus biológiai vektoraként ismerünk Európában (1. táblázat) (Lindgren és mtsai., 2004). Délnyugat-Európa alacsony fekvésű területein a *P. ariasi*, míg a hegyvidékeken a *P. perniciosus* fordul elő. A mediterráneum keleti felében, Olaszországtól a Balkán félszigeten keresztül Kis-Ázsiáig van jelen az akár 1000m-es

magasságban is fellelhető *P. neglectus*, az alacsonyabb régiókat kedvelő, állatokon gyakran nagy tömegben táplálkozó *P. perfiliewi*, továbbá a *P. tobbi*. A Spanyolországtól a Balkán-félszigetig sporadikusan előforduló, északon egészen Belgiumig és Németországig elterjedt *P. mascitti* a *Transphlebotomus* algenusba tartozik, vektor szerepét számos szerző valószínűsíti, bizonyítani azonban még nem sikerült (Naucke és Schmitt 2004).

1. táblázat A *L. infantum*-ot terjesztő lepkeshúnyogfajok Európában (Lindgren és mtsai., [2004] nyomán)

Fajnév	Országok
<i>P. ariasi</i>	Franciaország, Olaszország, Portugália, Spanyolország
<i>P. perniciosus</i>	Franciaország, Németország, Olaszország, Málta, Portugália, Spanyolország, Ausztria
<i>P. neglectus</i>	Albánia, Görögország, Olaszország, Málta, Románia, volt jugoszláv köztársaságok, Ausztria
<i>P. perfiliewi</i>	Albánia, Görögország, Olaszország, volt jugoszláv köztársaságok, Románia
<i>P. tobbi</i>	Albánia, Ciprus, Görögország, Olaszország, volt jugoszláv köztársaságok

Európában a *L. infantum*-mal fertőzött lepkeshúnyogok aránya a teljes populáción belül jellemzően nem haladja meg az 1-2%-ot, ami jóval alacsonyabb a közel-keleti fajoknál tapasztalt akár 50%-os gyakoriságnál (Norton és mtsai., 1992)

Vektor jelentőségű más lepkeshúnyogfajok előfordulása ismert kontinensünkön, de ezeknek nincs szerepe a *L. infantum* terjesztésében. Ezek közé tartozik a Portugáliától, Olaszországon át, Görögországig előforduló *P. sergenti*, amely a *L. tropica* vektora. A Spanyolországtól hátsó Indiáig előforduló *P. papatasi* a *L. major* terjesztésében játszik szerepet. E *Leishmania*-fajok kontinensünkön csak behurcolt fertőzéseket okoznak, de vektoraik endémiás előfordulása miatt állandó járványtani kockázatot jelentenek (Gramiccia és Gradoni, 2005).

Hazánk szomszédságában, Horvátországban és Szerbiában a *P. neglectus*, a *P. perfilliewi* és a *P. tobbi* terjedt el (Bosnić és mtsai., 2006; Miscevic és mtsai., 1998). Az első két faj előfordulását korábban leírták Romániában is (Dancesco, 2008). Észlelési helyeik a magyar határhoz legközelebb, attól délre, ill. keletre esnek, több száz kilométeres távolságra (1. melléklet).

3.2.2.1 A lepkeszúnyogok hazai előfordulásával kapcsolatos ismeretek

Lőrincz és Szentkirályi (1933) 1931-32 nyarán hódmezővásárhelyi lakóházakban 110 vérszívó lepkeszúnyogot fogott, melyeket később a *P. macedonicus*-ként azonosítottak. Ezek gyűjtésére azért került sor, mert a környéken élőknél rovarcsípéssel kapcsolatos bőrtünetek jelentkeztek. A faj ma elfogadott tudományos neve *P. perfilliewi* (Adler, 1946). Ezt követően nem kutatták a lepkeszúnyogok hazai előfordulását. Szabó és Delyné Draskovits (1983) monográfiájában találunk csupán feljegyzéseket, amelyben személyes értesüléseikre hivatkozva megemlítik, hogy az 1960-as években Esztergomban, továbbá Budapesten, a Gellért-hegyi Sziklakápolnában, az akkori KÖJÁL munkatársai *P. perfilliewi* példányokat fogtak. Ezekből a gyűjtésekből azonban bizonyító példányok nem maradtak fenn.

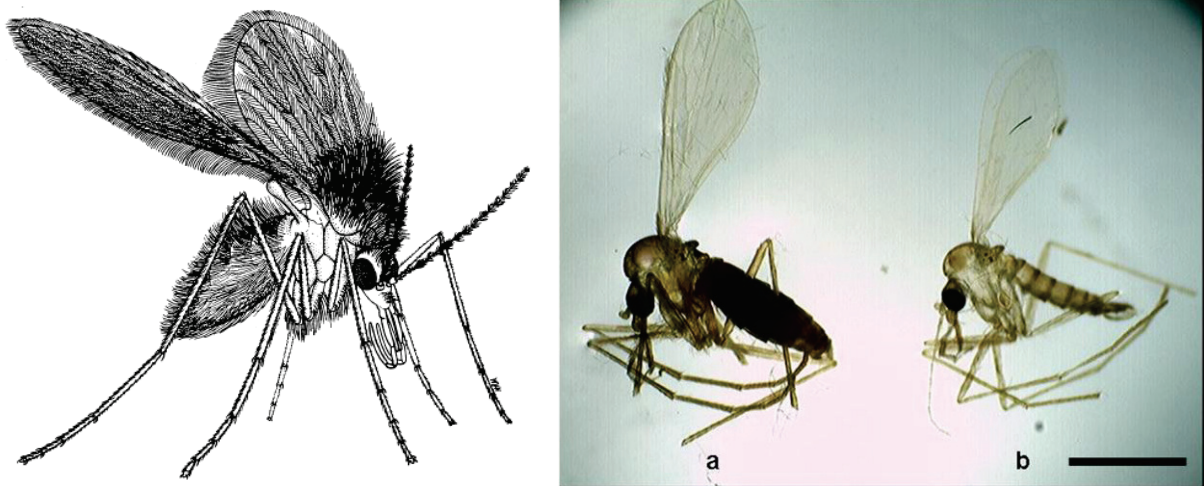
3.2.2.2 A lepkeszúnyog-fajok elterjedésének változásai napjainkban

A 20. század utolsó negyedében Európában és a világ trópusi térségeiben a lepkeszúnyogok földrajzi terjeszkedését figyelték meg. Ennek hátterében feltehetően a természetes növénytársulások bolygatása, a földhasználati szokások és az éghajlat globális megváltozásai állnak (Desjeux, 2001). Távoli, de jellemző példa, hogy Dél-Amerika egyes térségeiben a kiirtott esőerdők helyén létesített mezőgazdasági területeken és településeken, a megváltozott környezethez alkalmazkodó erdei *Lutzomyia*-fajok honosodtak meg (Brandao-Filho és mtsai., 1999). Kontinensünkön Dél-Olaszországban, az 1990-es években észak-afrikai eredetű *P. sergenti* (Gramiccia és Gradoni, 2005), míg Észak-Olaszország kontinentális területein a *P. neglectus* és a *P. perniciosus* terjedését állapították meg. Utóbbiak előfordulása korábban csak a tengermelléki területekről volt ismert (Maroli és mtsai., 2008). Az ezredfordulót követően az Alpoktól északra, a Rajna völgyében a *P. mascitti* és a *P. perniciosus* (Bogdan és mtsai., 2001; Koehler és mtsai., 2002) előfordulását írták le német kutatók. A lepkeszúnyogok utáni kutatást az ebben a térségben az emberek és állatok körében jelentkező, tisztázatlan eredetű leishmaniás esetek miatt kezdték el (Naucke, 2000).

3.2.3 A lepkészúnyogok biológiája

3.2.3.1. Morfológia

Az imágók apró termetűek, testhosszuk kb. 1,5-5 mm, színük a világossárgától a barnáig változhat. Testüket és szárnyaikat sűrű kitinszőrzet fedi, amitől megjelenésük apró molylepkére hasonlít. Toruk púposan kiemelkedik, lábaik hosszúak, törékenyek, összetett szemeik nagyok és sötétén pigmentáltak (**8. ábra**). Kis termetük miatt fajszintű azonosításuk csak mikroszkópos vizsgálattal lehetséges, a hímeknél a potroh utolsó ízeiből kialakult, bonyolult páرزszerv felépítése, a nőstényeknél a garat kitinfogazatának mintázata és az ondóhólyag morfológiája alapján (Szabó és Delyné Draskovits, 1983) (**8., 9., 10. melléklet**). A vérszívó fajok törékeny alkatúak és lándzsahegy alakú, keskeny szárnyaikat testük fölé emelik (**8. ábra**) (Lehane, 2005).



8. ábra Balra: vérszívó lepkészúnyogfaj nőstény imágója pihenő testhelyzetben (Killick-Kendrick, 1999). Jobbra: *Phlebotomus perfiliewi*: vérszívott nőstény (a) és hím példány (b) (mérce: 2mm)

3.2.3.2. Életmód

Az imágók kb. 2-3 hétig élnek. A bából történt kikelésük utáni első napokban magas cukortartalmú növényi nedveket, illetve mézharmatot fogyasztanak (Molyneux és mtsai., 1991). A növényi nedvek mellett ezt követően a nőstények rendszeresen fogyasztják gerinces állatok véréét is, amelynek fehérjetartalmát a tojások képzésekor hasznosítják

(Bates, 2007). Kétéltűek, hüllők, vad és házi madarak, továbbá emlősök és az ember külső élősködői (Service, 2002).

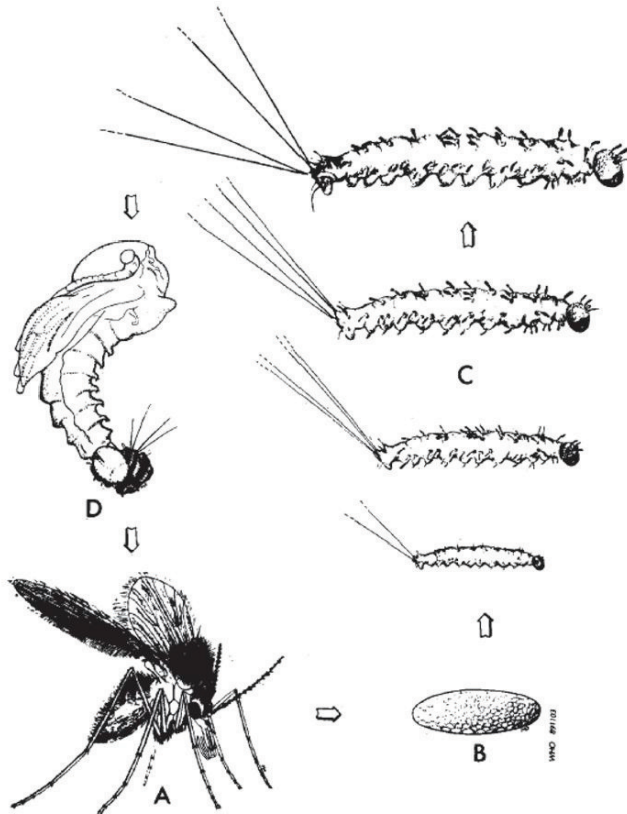
A legtöbb szerző a lepkeszúnyogok repülőképességét gyengének ítéli, és jelölés-visszafogás módszert alkalmazó kísérletekben úgy találták, hogy tenyésző/pihenő helyüktől ritkán távolodnak el 1km-nél nagyobb távolságra (Killick-Kendrick, 1999). Alkonyat után, szélcsendes időben a legaktívabbak, de egészen pirkadatig táplálkozhatnak. Pihenőhelyük pár száz méteres környezetében keresik fel az istállókat, baromfiókat, kutyás lakóházak udvarát (Service, 2002). Nappali pihenőhelyül kiegyensúlyozott mikroklímájú, mérsékelt meleg, magas relatív páratartalmú (kb. 60-75%) környezetet választanak (Lindgren és mtsai., 2004). A lepkeszúnyogok számára alkalmas helyet kínálnak a földet tartalmazó természetes és mesterséges sziklaüregek, kutak, út menti kőfalak, istállók, latrinák, trágyarakások, komposztdombok, rágcsálók üregei és a barlangok (Feliciangeli, 2004). Elterjedési területükön a fajok egy része a megfelelő pihenő és táplálkozási lehetőségeket biztosító emberi környezethez vonzódik (Bosnić és mtsai., 2006; Killick-Kendrick, 1999).

A gazdaállat által termelt hő, illatanyagok és a kilélegzett szén-dioxid érzékelésével találják meg a táplálékforrást (Ward és Hamilton, 2002), amelyet rövid, ugrásszerű repülések sorozatával közelítenek meg. A pázásra legtöbbször az emberen, kutyán, vagy más gazdaállaton kerül sor, ahol nagyszámú hím várja az éhes nőstényeket (Killick-Kendrick, 1999). Az állat és az ember rövid szőrrel borított, vékony bőrű részein (pl. fülek, orrtájék, fejbőr) kb. 0,5-1 percen keresztül táplálkoznak (Rogers és Bates, 2007), amit fajra jellemzően naponta többször, vagy néhány naponként megismételnek (Killick-Kendrick, 1999). A bőrön összetett szájszervükkel apró sebet ejtenek, és az ebből szivárgó vért szívják. A lepkeszúnyog nyálának értágító és véralvadásgátló komponensei növelik a seb vérhozamát (Bates, 2007), és a bőr napokig megmaradó helyi viszkető duzzanatát okozzák. A lepkeszúnyog nyálának komponenseivel szemben emberben késleltetett túlérzékenységi reakció (delayed type hypersensitivity, DTH) alakulhat ki (Belkaid és mtsai., 2000).

A lepkeszúnyogok melegigényesek, a legtöbb faj nem hagyja el pihenőhelyét, ha a környezet hőmérséklete 20°C alá esik. Néhány faj (pl. a *P. neglectus* és a *P. mascittii*) azonban akár 13°C-os hőmérsékleten is aktívan keresi a táplálékát (Lindgren és mtsai., 2004). Aktivitásuk a mérsékelt égövben szezonális váltakozást mutat: legnagyobb egyedszámban kora nyáron és kora ősszel fordulnak elő (Bosnić és mtsai., 2006; Toprak és Ozer, 2005).

3.2.3.3. Fejlődésmenet

A lepkeszúnyogok magas nedvesség- és szervesanyag-tartalmú helyeken bárhol képesek tenyészni. A nőtény a bomló szerves törmelék és a bakteriális anyagcseretermékek illatanyagai, valamint a korábban lerakott tojásokból származó feromonok alapján választja ki a tenyésző helyet, ahol kb. 50-100 tojást rak le egy, vagy több alkalommal (Ward és Hamilton, 2002). Egyedfejlődésükről kevés ismerettel rendelkezünk. A tojásokból kikelő világos színű lárvák, fejlett fejtokkal és rágószervekkel, továbbá testük végén két pár, hosszú kitin sörtével rendelkeznek (9. ábra). Bomló növényi és állati eredetű szerves anyagokkal táplálkoznak. Három vedlést követően kb. 6-8mm hosszúságú, negyedik stádiumú lárvává alakulnak, majd a táplálkozást befejezve mómia bábót képeznek (Desjeux, 2001). A környezet hőmérsékletétől függően a megtermékenyített tojásokból kb. 30-60 nap alatt fejlődnek ki az imágók. A mérsékelt égövi fajok a telet, a sivatagos területeken élők a száraz időszakokat 4-8 hónapon át tartó nyugalmi állapotban, negyedik stádiumú lárvaként vészelik át (Lindgren és mtsai., 2004).



9. ábra A lepkeszúnyogok fejlődési ciklusa: A – imágó, B – tojás, C – lárvastádiumok (L1-L4), D – mómia báb (Young és Duncan, 1994)

Populációik ott maradnak fenn, ahol az év folyamán legalább egy hónap középhőmérséklete meghaladja a 20°C-ot (WHO, 1984). A mediterráneum országaiban áprilistól november elejéig 2-4, elterjedési területük északi határán feltehetően ennél kevesebb generációjuk figyelhető meg évente (Ready és Croset, 1980).

3.2.3.4. A leishmaniák hatása a lepkeszúnyogra

A leishmaniák által termelt nyálka akadályozza az fertőződött lepkeszúnyogok táplálkozását, emiatt azok gyakrabban és több gazdaállatról szívnak vért, ami növeli a parazita átvitelének valószínűségét, miközben napokkal megrövidíti a vektor élettartamát (Rogers és Bates, 2007). Ward és Hamilton (2002) kutatási eredményei rávilágítottak arra, hogy a leishmaniák a vektor viselkedését is képesek befolyásolni. Kísérletükben a parazitát hordozó rágcsálók illatanyagai vonzóbbnak bizonyultak a lepkeszúnyogok számára, a nem fertőzött rágcsálók illatánál.

3.2.3.5. Lepkeszúnyogok által terjesztett más kórokozók

Számos lepkeszúnyogfaj terjeszthet a leishmaniák mellett vírusokat és baktériumokat. Dél-Amerikában az embert és a vendégízületes emlősöket megfertőző Orbivírusok (Reoviridae), a lovak és szarvasmarhák hólyagos szájgyulladását okozó vesiculovírusok (Rhabdoviridae), számos flavivírus, továbbá az Oroya láz/Verruga peruana/Carrion betegség kórokozója, a *Bartonella bacilliformis* vektorai is lepkeszúnyogok (Young és Duncan, 1994).

Az ún. „lepkeszúnyog láz” pár napos, enyhe lefolyású, lázzal járó emberi megbetegedések csoportja, amelyeket kb. 30 főleg rágcsálókat fertőző phlebovírus (Bunyaviridae) okoz. E vírusok Panamától Brazíliáig, a Földközi-tengertől Észak-Indiáig fordulnak elő. A bántalmat többnyire immunizálatlan emberek (pl. endemikus térségbe látogató turisták, ott állomásozó katonák) tömeges megbetegedése esetén diagnosztizálják (Service, 2002). A víruscsalád legismertebb tagja a Toscana vírus, mely Dél-Európában sok helyen az ember agyvelő- és agyhártyagyulladásának elsődleges okozója (Charrel és mtsai., 2005).

3.3. Lepkeszúnyogok elleni védekezés

A kutyák és emberek leishmaniával történő fertőződésének egyik leghatékonyabb módja a lepkeszúnyogok vérszívása elleni megelőző védekezés. Ennek egyik módja a lakó és állattartó helyek lepkeszúnyogokkal szemben hatásos inszekticidekkel történő permetezése, amit az 1950-es években Európában és számos trópusi országban napjainkban is alkalmaznak. Az ilyen kampányok hatékonyan csökkentik a lepkeszúnyogok mennyiségét, ami a leishmaniák okozta új esetek számának a csökkenésében is

megmutatkozik, de befejezésüket követően gyakran pár hónapon belül regenerálódnak a lepkeszűnyogok populációi (Killick-Kendrick, 1999). Hasonlóképp célravezető, de a környezetet kevésbé terhelő eljárás rovarpatogén baktériumok környezetbe juttatása (Schlein, 1987). Költséghatékony védekezési forma emberek esetében a speciális, sűrű szövésű, vagy repellens szerrel kezelt szűnyoghálók használata (Alexander és mtsai., 1995).

A kutyának, mint a parazita rezervoár gazdájának, tartós hatású piretroidokkal (deltametrin, permetrin) való védelme számos kutatás szerint hatékony módja a leishmaniosis visszaszorításának. A kutyákon alkalmazott repellens szerrel átitatott nyakörvet alkalmazva egy iráni faluban 50%-kal csökkent az új emberi megbetegedések (Gavvani és mtsai., 2002), míg egy dél-olaszországi faluban közel 90%-kal csökkent az újonnan fertőződött kutyák száma (Maroli és mtsai., 2008). Egy másik olaszországi kísérletben hasonlóan eredményesnek bizonyultak a spot-on formában alkalmazott repellens szerek (Otranto és mtsai., 2007).

4. Anyag és módszertan

4.1. A kutya leishmaniózis hazai vizsgálata

4.1.1. Kutyák szerológiai vizsgálata

Az ország 6 megyéjének 21 településén tartott 705 kutyától (**2. és 3. melléklet**) személyesen vagy a helyi állatorvosok segítségével szérumszövetekbe vérmintát gyűjtöttünk az ebek cephalo-antebrachialis vénájából. A kutyák fajtája, kora, neme, és életkörülményei feljegyzésre kerültek. A mintákat 10 percig 3000 x g-n centrifugáltuk és a felülúszó savót a további vizsgálatig -20°C-on tároltuk. Hat település mintáit Budapesten és Montpellier-ben, négyet Budapesten és Rómában, további négyet csak Montpellier-ben, végül 11-et csak Budapesten vizsgáltunk.

4.1.2. Állatorvosok körében végzett kérdőíves felmérés

Az ország 19 megyéjében társállatokkal foglalkozó 216 állatorvosi rendelőbe és klinikára egy kísérőlevéllel ellátott, a kutyák leishmaniózisával foglalkozó kérdőívet (**2. melléklet**) küldtünk postai úton 2008 májusában. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az állatorvosok találkoztak-e leishmaniával fertőzött kutyákkal, ha igen, milyen klinikai tüneteket

észleltek, milyen diagnosztikai vizsgálatok eredményeire alapozva állapították meg a fertőzöttséget. A kérdőív a fertőződés valószínű helyére, a fertőzött állatok gyógykezelésére és a kezelő állatorvos bántalommal kapcsolatos ismereteinek forrásaira vonatkozó kérdéseket is tartalmazott (**4/a melléklet**). A leishmaniózis hazánkban ritkán behurcolt betegségnek számít, ezért a kérdőívhez egy a kutyák leishmanioziséjáról szóló általunk összeállított tájékoztatót is csatoltunk (**4/b. melléklet**).

4.1.3. Egy paksi kennelben végzett vizsgálatok

Egy paksi kutyatenyésztő mopsz fajtájú, 4 éves nőstény kutyáját vizsgálta a helyi állatorvos 2007 októberében. A beteg állatnál szőrhullást, bőrfekélyeket, szemgyulladást, a körmök rendellenes túlnövekedését, a preszkapuláris és a popliteális nyirokcsomók megnagyobbodását állapította meg. A kutya állapota pár héttel korábban kezdett gyors ütemben romlani. A tulajdonos kérésére euthanáziát hajtottak végre az állaton. A boncolás során a lép megnagyobbodását állapították meg. Kenet készítés és szövettani vizsgálatok céljából mintát vettek a popliteális nyirokcsomókból, a lépből valamint a májból. A kutya vérmintáját egy külföldi diagnosztikai laboratóriumba (IDEXX VetMedLab, Ludwigsburg, Németország) küldték, ahol *Leishmania* specifikus ellenanyagok jelenlétét és a parazita DNS-ét mutatták ki. Értesülve az esetről 2008 májusában tett helyszíni látogatásunk során alvadásában gátolt (EDTA-s), és teljes vérmintákat gyűjtöttünk a kennelben tartott 2 csau-csau, 3 francia bulldog és 14 mopsz fajtájú kutyából, molekuláris és szerológiai vizsgálatok céljából. A tulajdonos elmondta, hogy az állatokat és azok szüleit születésük óta egyazon kennelben tartotta, amelyet időközben egyik kutya sem hagyott el, az elmúlt években új kutya nem került a kennelbe. Helyszíni vizsgálódásunk során az egyik mopsz popliteális nyirokcsomóit megnagyobbodottnak találtuk, amelyekből 2008 novemberében vékonytű aspirációs módszerrel biopátumot vettünk molekuláris biológiai vizsgálat elvégzése céljából. Az ősz folyamán az állatnál a fejbőr és a szem elváltozása, valamint a körmök rendellenes túlnövekedése jelentkezett (**5. melléklet**).

4.2. Vizsgálati módszerek

4.2.1. A fertőzöttség kimutatása Immunfluoreszcens Antitest Tesztel (IFAT)

A vizsgálatainkhoz a montpellier-i Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), és a római Istituto Superiore di Sanita (ISS) laborjában készített, továbbá a MegaScreen FluoLeish kit (MegaCor GmbH) márkanév alatt forgalmazott IFAT lemezeket használtunk.

A MegaScreen Fluoleish kítet a gyártói utasításoknak megfelelően, a mellékelt pozitív és negatív kontroll felhasználásával, a montpellier-i és a római lemezeket a következőkben leírt protokoll szerint használtuk. A lemezek PBS oldattal végzett mosását és szárítását követően a vizsgált savók 1:80 hígításaiból 10-10 µl-t cseppentettünk a lemezek „érzékenyített” helyeire, majd harminc percen keresztül nedves kamrában, 37°C-os hőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a lemezeket háromszor mostuk PBS oldatban, majd anti-*Leishmania* kutya konjugátum és PBS 1:100 arányú Evans Blue-val festett elegyből 10-10 µl-es mennyiségeket cseppentettünk a lemez amasztigóttákkal bevont helyeire. Nedves kamrában 37°C-os hőmérsékleten 30 percig tartó újabb inkubálást követően, majd háromszori PBS oldatos mosás után a lemezeket megszáritottuk, és Jenamed SH-50 típusú mikroszkóppal 490nm hullámhosszúságú gerjesztő megvilágítás és 400x-os nagyítás mellett értékeltük. Pozitív kontrollként egy leishmaniás római kutya savóját, negatív kontrollként PBS oldatot használtunk. Vizsgálataink során az OIE által javasolt 1:80 küszöbértéket fogadtuk el a pozitivitás határaként (Gradoni and Gramiccia, 2004).

4.2.2. A parazita kimutatása hisztológiai és immunhisztokémiai módszerekkel

A paksi kennelben elsőként megbetegedett kutya májából és megnagyobbodott lépéből vett minták szövettani vizsgálatát dr. Biksi Imre a SZIE ÁOTK Üllői Nagyállatklinikájának munkatársa végezte el. A szövetmintákat formalinnal fixálták és paraffinba ágyazták. A 4 µm vastagságú metszeteket vizsgálata haematoxin–eosin festést követően fénymikroszkóp alatt, 400x nagyítással történt.

A léppreparátum immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatát dr. Szeredi Levente az MgSzH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának munkatársa végezte. A paraffinos lépminták előkészítése Tafuri és mtsai., (2004) módszere szerint történt. A minták paraffinmentesítését követően 10 percig 3% H₂O₂, majd 20 percig 2%-os sovány tejpor oldatban áztatták. Ezt egész éjszakás 4°C-os inkubálás követte monoklonális egér anti-*Leishmania* lipofoszfo-glikán ellenanyag (klón: CA7AE; Cedarlane Laboratories, Canada) 1:2000 hígítású oldatában. Az ellenanyag kötődését egy torna-peroxidázzal jelölt polimerrel (EnVisionTM+ Kit; Dako, Glostrup, Denmark) mutatták ki. Negatív kontrollként a lépminta foszfát pufferben inkubált metszet-sorozata és szopornyica miatt elpusztult kutya lépmintája szolgált.

4.2.3. A parazita DNS-ének kimutatása molekuláris biológiai módszerekkel

4.2.3.1. Vizsgálati minták

Az elaltatott kutya máj, lép és nyirokcsomó keneteinek, a klinikai tüneteket mutató második kutya nyirokcsomó bioptátumának és alvadásában gátolt vérmintájának, valamint a paksi kennelben élő további 18 kutya alvadásában gátolt vérmintájának DNS tartalmát vontuk ki. Az alvadásában gátolt vérmintákból előbb, ún. *buffy-coat*-ot (BC) készítettünk és ebből vontuk ki a DNS-t. A BC a vér centrifugálással (10 percig 2500 x g) nyert fehérvérsejtekben és DNS-ben gazdag frakciója.

4.2.3.2. DNS kivonása

A minták DNS-tartalmának kinyerésére a QIAamp DNA Mini Kitet (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) használtuk. A BC-k esetében a gyártó által előírt vérhez és teszfolyadékokhoz („Blood and bodyfluid”), a máj, lép és nyirokcsomó kenetek, ill. a bioptátum esetében a szövetminták („Tissue”) feldolgozásához javasolt protokollt alkalmaztuk. A DNS extraktumokat feldolgozásig -20°C-on tároltuk.

4.2.3.3. Kinetoplast DNS (kDNS) specifikus PCR reakció

Az alkalmazott PCR eljárás a *L. donovani* sensu lato fajkomplexbe tartozó leishmaniák kinetoplast DNS-ének 5' végén egy 145 bp méretű DNS szakasz felszaporítását végzi az RV1 (5'- CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G -3') és RV2 (5'- CAC CTG GCC TAT TTT ACA CCA -3') primerek segítségével (Lachaud és mtsai., 2002). A premix összeállítása során GoTaq Green Buffer 1x-es, MgCl₂ oldat 2mM és a dNTP keverék 0,2 mM-os koncentrációját állítottuk be, 25 µl végső reakció térfogatban (GoTaq PCR Core System I., Promega, Madison, WI, USA). A primereket 25-25pmol mennyiségben mértük be a reakcióelegybe, melyhez legvégül 5 µl kivont DNS oldatot adtunk. A reakcióhoz szükséges hőprogramot egy Biometra T-personal (Biometra GmbH, Göttingen, Németország) készülék biztosította a következők szerint: 4 perc 94°C-os bevezető denaturálást követően 40 cikluson keresztül váltotta egymást egy 30 mp-es 94°C-os denaturálási, egy 30 mp-es 59°C-os kapcsolódási (anellációs) és egy 30 mp-es 72°C-os kiterjesztési (elongációs) lépés. A hőprogram egy 10 perces 72°C-os végső elongációs lépéssel zárult. Negatív kontrollként DNS-mentes desztillált vizet és egészséges kutya véreből kivont DNS oldatot, pozitív kontrollként, pedig *L. infantum* promastigóták tenyészetéből (IPT-1) kivont DNS oldatot használtunk. A reakció termékek észlelése és elemzése 1,5%-os agaróz gélen Kodak Edas 290 (Rochester, NY, USA) típusú vizualizáló berendezéssel történt.

4.2.3.4. A riboszomális kis alegységre (ssu rRNS) specifikus nested PCR reakció

A nested PCR vizsgálatokat a római ISS laborjában végeztük. Az első reakció során 10 µl DNS oldatot adtunk 40 µl PCR Master Mix-hez (Promega, Madison, WI, USA), amibe 50-50 pmol-t mértünk a R221 és R332, a kinetoplastidák ssuRNS lokuszára specifikus primerpárból (van Eys és mtsai., 1992). A második lépésben az első reakció termékéből 3 µl-t adtunk 22 µl PCR Master Mixhez (Promega, Madison, WI, USA), ami 3-3 pmól *Leishmania*-specifikus R223 és R333 primert tartalmazott (van Eys és mtsai., 1992). A nevezett szerzők közleményében leírt hőprogramot alkalmaztuk változtatás nélkül. DNS-mentes és egészséges kutya BC-ját tartalmazó negatív kontrollt alkalmaztunk a reakcióban. Pozitív kontrollként *L. infantum* promasztigóták tenyészetéből (IPT-1), és egy leishmaniás kutya BC-jából készített pozitív kontrollt szolgált. A reakció termékek észlelése és elemzése 1,5%-os agaróz gélen történt.

4.2.3.5. PCR termékek szekvencianálízise

A PCR termékek nukleotid szekvenciáját a MacroGen Inc. dél-koreai laborjában végeztettük. A National Institutes of Health (USA) honlapján elérhető Basic Local Alignment Tool (BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) szolgáltatás használatával kerestük a termékeinkéhez hasonló referencia szekvenciákat az összes eukarióta (taxid: 2759) nukleotid szekvenciáját tartalmazó adatbázisban.

4.3. A lepkeszúnyogok hazai előfordulásának vizsgálata

4.3.1. A csapdázási helyek kiválasztása

Magyarország nyolc megyéjében 46 helyszínen végeztünk csapdázásokat 2006 és 2010 között (4. táblázat). Elsősorban olyan helyeket választottunk, amelyeket szubmediterrán klímájuk miatt a meleget kedvelő lepkeszúnyogfajok számára kedvező élőhelyet biztosíthatnak (Mersich és mtsai., 2003; Lindgren és mtsai., 2004). Számos helyszínt Csongrád és Baranya megyében jelöltünk ki, mivel földrajzilag ezek esnek legközelebb a lepkeszúnyogok ismert horvátországi, szerbiai és romániai előfordulási helyeihez (Miscovic és mtsai., 1998; Bosnić és mtsai., 2006; Dancesco 2008). Lőrincz és Szentkirályi (1933) vizsgálatainak a helyszínén, Hódmezővásárhelyen is végeztünk csapdázásokat. Pest és Komárom-Esztergom megyei csapdázási helyeink kiválasztásánál Szabó és Delyné Draskovits (1983) beszámolóit is figyelembe vettük.

Májustól szeptemberig helyeztük ki a csapdákat, ugyanis Ready és Croset (1980) vizsgálatai szerint Európa endémiás részein ilyenkor észlelhető az imágók aktivitása. A csapdákat a lepkeszúnyogok tipikus szaporodási és pihenő helyein, ill. kedvelt gazdaállataik (kutya, baromfi) néhány méteres környezetében alkalmaztuk (Feliciangeli, 2004).

4.3.2. Alkalmazott csapdázási módszerek

4.3.2.1. Ragacsos lap

A „ragacsos lap” (angolul: sticky paper) csapda ricinusolajjal bevont A4-es méretű papírlap. Ezeket a lepkeszúnyogok nappali pihenő, szaporodó és táplálkozó helyeinek közelében, így pl. útszéli kőfalak, házfalak repedéseibe, vagy az állattartó helyeken a falakon, ajtókon kiakasztva használják. A táplálkozni, vagy tojásaikat lerakni induló lepkeszúnyogok a repedésbe helyezett vagy falra akasztott lapokra leereszkedve ráragadnak és elpusztulnak. A ragacsos lapokat kihelyezésüket követően 3-4 nap múlva gyűjtöttük össze és áteső fényben vizsgálva kerestük a lepkeszúnyogokat. Megtalálásuk esetén a ragacsos felszínről alkoholba mártott, finom sertéjű ecsettel emeltük le ezek példányait és egyedi jelölésű, 96%-os alkoholt tartalmazó csövekbe helyeztük. A csapdatípus előnye olcsósága, és hogy alkalmazása nem igényel felügyeletet. Hátránya, hogy nem gyakorol vonzó hatást a lepkeszúnyogokra, ezért nagy tömegben kell telepíteni a lehetséges pihenő és tenyésző helyekre. A ragacsos lapokból egy-egy alkalommal 4-96 darabot helyeztünk ki országszerte található 40 helyszínen 2006 és 2009 között (**6. melléklet**).

4.3.2.2. CDC Miniature Light Trap

A CDC Miniature Light Trap (John W. Hock Company, Florida, USA <http://www.johnwhock.com/products/512.htm>) a világ számos pontján az entomológiai kutatások széles skáláján alkalmazott, fehér fényvel működő csapdatípus (**10. ábra**). A csapda esővédő teteje alatt, középen egy beépített izzó található, amelynek a fehér fénye vonzza az éjszakai rovarokat, s ezeket az izzó alatt helyeződő ventilátor egy rácson keresztül egy cserélhető szövetzsákba szippantja. A gyűjtés befejeztével a gyűjtőzsák száját elkötve akadályozható meg a csapdázott rovarok kiszabadulása. Előnye, hogy nagy területről vonzza a rovarokat, amelyek élve találhatóak a csapdában. Hátránya, hogy válogatás nélkül gyűjti a pozitív fototropizmust mutató fajokat (pl. éjjeli lepkéket), amelyek kárt tehetnek a törékeny testű lepkeszúnyogokban. Irodalmi adatok egyes lepkeszúnyogfajok

(pl. *P. papatasi*) fénykerülő viselkedéséről tesznek említést, ami korlátozhatja a csapdatípus használhatóságát (Milutinovic és mtsai., 1992).



10. ábra CDC Miniature Light trap fénycsapda (balra) és MMX csapda (jobbra) egy baromfiudvarban.

4.3.2.3. Mosquito Magnet X

A Mosquito Magnet X, röviden MMX (American Biophysics Corp.) szén-dioxiddal működő csapdatípus (**10. ábra**). A hosszúkás, henger alakú szerkezet alsó nyílásán kiáramló gáz vonzza a csapda belsejébe a vérszívó rovarokat. Egy szárazjeget tartalmazó hőszigetelt tartályból a szublimáló CO₂-ot egy cső a csapdatest felső nyílása fölé vezeti, ahonnan nagysebességű ventilátor juttatja tovább az alsó nyíláshoz, amin át a szabadba jut.

4.3.2.4. A csapdák alkalmazása

A helyi terepviszonyoktól, állatok és állattartó házak számától függően egy vagy több CDC és MMX csapdát üzemeltettünk párhuzamosan (**7. melléklet**), amelyek kihelyezése este 8 és 9 óra között, begyűjtése reggel 8-9 óra között történt.

2006 és 2010 között májustól szeptemberig terjedő időszakban hazánk nyolc megyéjének 41 településén 44 gyűjtési helyen alkalmaztuk a CDC és MMX csapdákat összesen 320 éjszakán keresztül (**7. melléklet**). Pakson, 2008 és 2009 augusztusában a fertőződött állatoknak otthont adó kennelben, továbbá két közeli baromfiudvarban kíséreltük meg a lepkeszúnyogok gyűjtését. Összesen 83 ragacsos lapot helyeztünk ki. A kennelben és egy baromfiudvarban, 2008-ban a CDC csapdát 24, az MMX csapdát 21 éjszakán keresztül üzemeltettük. Egy évvel később a korábbiak mellett egy további baromfiudvart vontunk be kísérletünkbe, és három helyszínen összesen 32 éjszakán keresztül, egy-egy CDC csapdát üzemeltettünk.

4.3.3. Lepkeszúnyogok faji szintű határozása

A vérszívó lepkeszúnyogok faji szintű meghatározása során első lépéseként sztereómikroszkóp alatt szétválogattuk a hím- és nőivarú egyedeket. A hímek esetében a potroh utolsó szelvényeiből az egyedfejlődés során kialakuló genitális potrohfüggelékek és a páرزószerv (hipopígium és édeágusz) morfológiájának megfigyelése teszi lehetővé az egyedek faji hovatartozásának megállapítását. A belső ivarutak egyes elemei (spermatéka), továbbá az ún. cibárium kitenfogzatának morfológiája alapján történik a nőstények faji azonosítása (Lewis, 1982).

A lepkeszúnyogok külső kitenváza legalább 24 órán át történő 40°C-os klorál-laktofenol oldatban történő inkubálást követően válik kellőképpen áttetszővé a belső struktúrák mikroszkópos vizsgálatához, így először ezt az előkezelést végeztük el. Az oldatot két rész trikloro-acetaldehidből és egy-egy rész fenolból, ill. tejsavból készítettük a római ISS központ munkatársai által adott leírásnak megfelelően. Az inkubálást követően legfeljebb 5-6 egyedet egy-egy tárgylemezen szétterített viszkózus fenol-balzsam (fenol és kanada-balzsam 1:1 arányú keveréke) ágyra helyeztük oldalukra fektetve. A nőstények garat-tájának vizsgálatához fejüket óvatosan lemetsztük és a test mellé helyeztük. Ezt követően a preparátumokat fedőlemezzel lefedtük és binokuláris mikroszkópon 100x-os nagyítással vizsgáltuk. A határozáshoz a Lewis (1982) által közölt határozókulcsot használtuk (**8., 9., 10. melléklet**). Az elkészített preparátumok fénytől védett szobahőmérsékletű tárolókba kerültek elhelyezésre. A kezdetben viszkózus fenol-balzsam pár óra alatt megszilárdul. Tapasztalatok szerint az így beágyazott preparátumok évtizedeken keresztül vizsgálható állapotban őrzik meg a rovarokat.

4.3.4. A csapdázott lepkeszúnyogok filogenetikai vizsgálata

4.3.4.1. Vizsgált lepkeszúnyogok

A vizsgálatainkhoz négy külföldi laboratóriumból kértünk lepkeszúnyogokat. Macedóniából, Törökországból és Kréta szigetéről származó *P. neglectus*, valamint Macedóniából, Olaszországból és Törökországból küldött *P. perfilliewi* példányokat használtunk a Villányban, Törökbálinton, továbbá Földeákon fogott példányok mellett.

4.3.4.2. DNS kivonása

Az etanolban tárolt lepkeszúnyogok közül országonként 3-3 nőstény példányt előbb csapvízben, azután desztillált vízben mostunk. Ezt követően tárgylemezen, sztereómikroszkóp alatt választottuk el a tort a fejtől és a potrohtól egy szikepenge segítségével. Utóbbiakat beágyazva végeztük el a faji azonosítást. Az egyes példányok feldolgozása között lánggal sterilizáltuk a tárgylemezt és a pengét. A rovarok torából végeztük a DNS kivonását a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) „Tissue” protokollja szerint. A protokollt úgy módosítottuk, hogy a Proteináz-K enzimmel történő emésztés egy egész éjszakán keresztül történt.

4.3.4.3. PCR reakció

A lepkeszúnyogok filogenetikai vizsgálata során a *P. neglectus* és *P. perfilliewi* sejtmagban lokalizált 18S rRNS Internal Transcribed Spacer (ITS2) DNS szakaszainak összehasonlító nukleotid-szekvencia analízisét végeztük el. Ennek a lokusznak a nukleotid szekvenciáiban mutatkozó eltérések a populációk izolációját követően folyamatosan növekszik. Az eltérések mértékéből becsülhető a vizsgált lepkeszúnyog-populációk elkülönülésének időtartama, továbbá kimutathatóvá válik a populációk keveredése (Latrofa és mtsai., 2011).

Az ITS2 lókuszok nukleotid szekvenciájának meghatározásához először e DNS szakasz specifikus PCR reakcióval történő felszaporítását végeztük el a JTS3 ('5-CGC AGC TAA CTG TGT GAA ATC-'3) és C1a ('5-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC T-'3) primerpárral (Latrofa és mtsai., 2011). A premix összeállításakor a GoTaq PCR Core System I. (Promega, Madison, WI, USA) elemeit használtuk 25 µl-es végtérfogat mellett a következő koncentrációkban: GoTaq Green Buffer, 1x; MgCl₂, 2mM; dNTP mix, 0,2 mM. A reakcióelegyhez végül 25-25pmol mennyiségben primereket és 5 µl kivont DNS oldatot adtuk. A reakcióhoz szükséges hőprogramot egy T-personal (Biometra GmbH, Göttingen,

Németország) készülék biztosította, amely a bevezető 12 percig tartó, 94°C-os denaturálást követően 35 alkalommal ismételt meg egy ciklust. Ebben 1 perces, 94°C-os denaturálást, 30 mp-es, 64°C-os kapcsolódási (anellációs), majd egy 1 percen át tartó 72°C-os kiterjesztési (elongációs) szakasz követte egymást. A ciklikus szakaszt követően a hőprogram egy 10 perces 72°C-os végső elongációs lépéssel zárult. A PCR termékek képződését 1,5%-os agaróz gélen ellenőriztük egy Kodak Edas 290 (Rochester, NY, USA) típusú vizualizáló berendezéssel.

4.3.4.4. Szekvenciaelemzés és a génfa szerkesztése

A PCR termékek tisztítását és a nukleotid szekvencia meghatározását a MacroGen Inc. koreai laboratóriumában végeztettük. A kapott szekvenciákról először a BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) programmal eltávolítottuk a bizonytalan bázisokat tartalmazó végződéseket (quality value [QV]<20), majd az NCBI online BLAST szolgáltatása segítségével vetettük össze a GenBank adatbázisban tárolt *Latrofa* és *mtsai*. (2011) elemzésében is vizsgált referencia szekvenciákkal (*P. perfiliewi*: AF205527, JF729350.1, JF729351.1; *P. neglectus*: AF205524, JF729348.1, JF729349.1). A szekvenciaillesztéssel megerősítettük a vizsgálatban felhasznált példányok korábbi, morfológia alapon történt faji meghatározását. A génfa szerkesztéséhez a Washingtoni Egyetemen fejlesztett PHYLIP programcsomagot (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), ún. „Maximum Likelihood” algoritmussal, 1000 ún. „bootstrap” ismétlést beállítva használtam. A nukleotid szubsztitúciós mátrixot a programcsomagba foglalt DNADIST program számolta ki, amely a Jukes-Kantor, Kimura 2 paraméteres valamint a Jin és Nei modelleket veszi figyelembe. A törzsfák gyökerének megkeresése céljából a *Phlebotomus*-okkal közeli rokon *Sergentomyia minuta* lepkeshúnyogfaj, mint ún. outgroup homológ szekvenciáit használtam.

5. Eredmények

5.1. A kutyák leishmaniosisának hazai előfordulásával kapcsolatos vizsgálatok

5.1.1. Szerológiai vizsgálatok

2006 novembere és 2008 szeptembere között, hazánk 21 településén 705 háznál tartott kutyától gyűjtött vérminta IFAT módszerrel végzett vizsgálta során a következőket

találtuk (**2. és 3. melléklet**). A Montpellier-ben végzett vizsgálataink során két Baranya megyei eb 1:80 hígítású szérumban *L. infantum* ellenes immunoglobulinok jelenlétét mutatta ki a teszt (**3. melléklet**). Mindkét kutya tünetmentes volt, és a lakóhelyüül szolgáló települést korábban nem hagyta el. Az egy évvel később Budapesten MegaScreen FluoLeish kittel elvégzett ellenőrző vizsgálatok mindkét eb esetében negatív eredményt adtak. Az említett két Baranya megyei kutya kivételével valamennyi állat vérmintájának a vizsgálati eredménye negatív volt(**3. melléklet**).

5.1.2. A paksi kennelben végzett vizsgálatok

5.1.2.1. Az elaltatott kutya mintáinak vizsgálatai

5.1.2.1.1. Vérvérvizsgálat

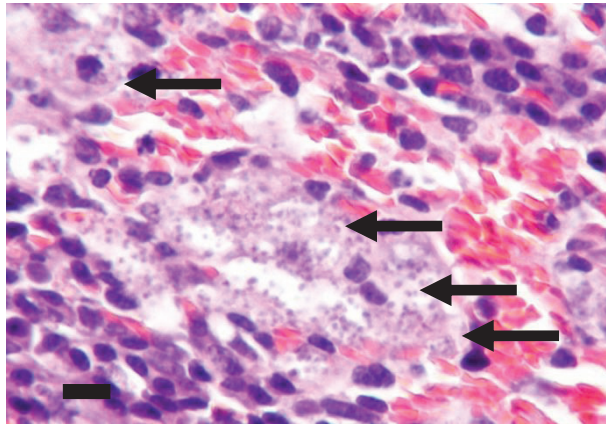
Az elaltatott kutya (P01) vérvizsgálata nem-regeneratív anémiát, polikromáziát, gyulladásra utaló emelt fehérvérsejt számot, továbbá emelkedett globulin és csökkent albumin szintet mutatott ki (**2. táblázat**). A szérumfehérjék elektroforézise a poliklonális gammaglobulinok erőteljes, az alfa2 és béta globulinok mérsékelten növekedett szintjét jelezte.

2. táblázat: Az elaltatott kutya vérvérvizsgálati paramétereit.

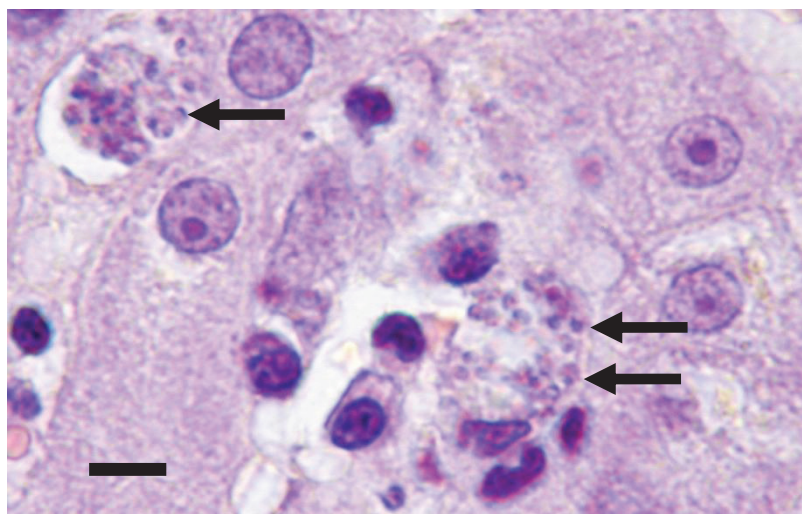
Véralkotó	Érték	ref. tart
Vörös vérsejt	4,05 e/l	6-9 e/l
Hemoglobin	90,5 g/l	150 - 190 g/l
Sejttérfogat	28%	38 - 55%
Neutrofil granulocita	0,48 G/l	< 0,3 G/l
Fehérvérsejt	89 G/l	15-35 G/l
Albumin	20 g/l	32 - 47 g/l
gamma globulin	56,9 g/l	5 - 18 g/l
alfa2 globulin	8,3 g/l	5 - 8 g/l
beta globulin	20,8 g/l	8 - 18 g/l

5.1.2.1.2. Szöveti és immunhisztokémiai vizsgálat

Az állat lépének szövettani metszetén jelentős számban makrofágok, kis és közepes méretű limfociták, valamint plazma-sejtek, és kis számban neutrofil granulociták voltak láthatóak (**11.ábra**). A makrofágokban 1–3 μm átmérőjű, erősen bazofil festődésű, kerek magvú, pálcikaszerű kinetoplasztot tartalmazó képletek helyeződtek, amelyek morfológiailag a *Leishmania* spp. amasztigótáihoz voltak hasonlóak (**11. és 12. ábra**).



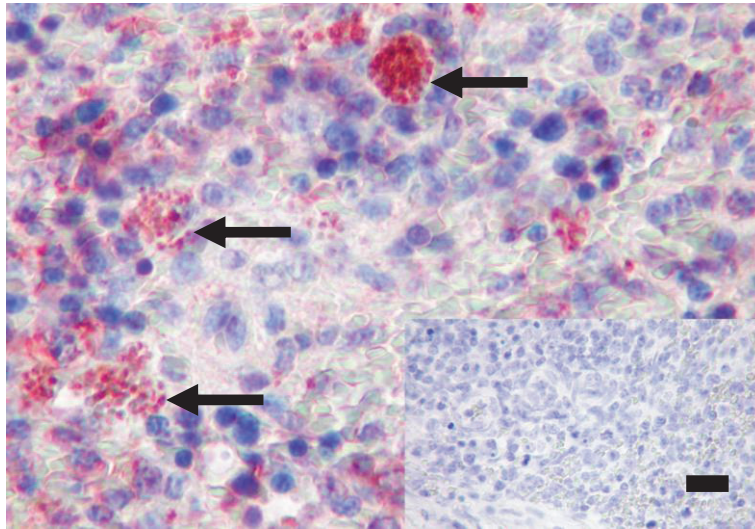
11. ábra: Az elaltatott kutya (P01) lépének metszetében *Leishmania* amasztigóták (nyilak) látszanak a vörös pulpa makrofájaiban. Hematoxilin–eozin festés (Dr. Biksi Imre felvétele). Mércse = 12.5 μm .



12. ábra: Az elaltatott kutya (P01) májának metszetében *Leishmania* amasztigóttal (nyilak) telített makrofágokból, plazmasejtekből és limfocitákból álló intralobuláris granuloma képződése figyelhető meg. Hematoxilin–eozin festés (Dr. Biksi Imre felvétele). Mércse=12,5 μm

Az immunhisztokémiai jelölést követően a lép szövettani metszetén a makrofágokban az amasztigóták csekély háttér mellett erősen festődtek, ami növelte

észlelhetőségüket a csak haemotoxilin-eozinnal festett preparátummal összevetve (**13. ábra**). A negatív kontrollként alkalmazott, szopornyica-fertőzésben elpusztult kutya lépének metszetein amasztigóták immunfestődése nem volt észlelhető.



13. ábra: Az elaltatott kutya (P01) lépének metszetén számos immunfestett *Leishmania* amasztigóta tűnik fel a makrofágokban. A kisebb képen a kontrollként használt szopornyicás kutyából származó lépmetszeten amasztigóták immunfestődése nem látható. Torma-peroxidázzal jelölt polimer eljárás (Dr. Szeredi Levente felvétele). Mércse =12,5µm.

5.1.2.2. Szerológiai és PCR vizsgálatok

Az elaltatott kutya (P01) máj, lép és nyirokcsomó keneteinek PCR vizsgálata során, kb. 145 bp hosszúságú termékeket észleltünk (**14. ábra, 3. táblázat**).

A kennelben élő többi kutya vérmintáival végzett IFAT vizsgálatok során további három eb (P10, P17 és P20) vérében *Leishmania*-specifikus ellenanyagot (titer=1:80 - 1:160) mutatott ki a teszt. Két eb (P10 és P14) BC mintájában a parazita DNS-ét ssu rRNS reakcióval észleltük (**3. táblázat**).

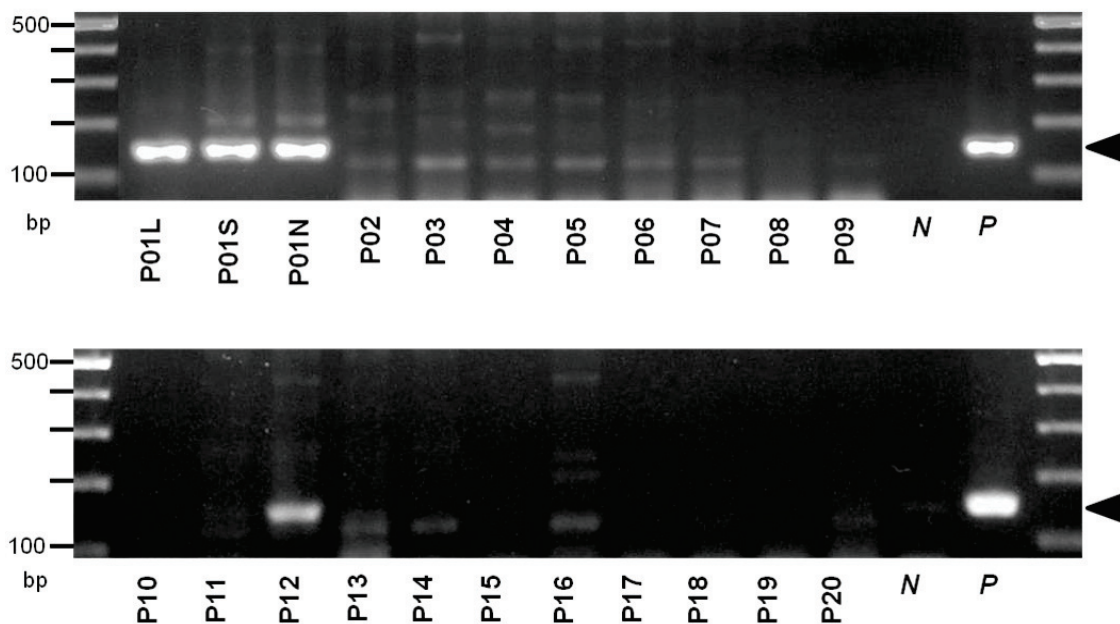
A másodikként megbetegedett kutya (P12) vérmintáját a római és a FluoLeish IFAT kittel vizsgálva egyformán magas, 1:5200 titerű leishmania specifikus ellenanyag pozitivitást észleltünk. A kutya BC mintájának és nyirokcsomó bioptátumának kDNS és ssu rRNS specifikus PCR vizsgálata pozitív eredményt mutatott (**14. ábra, 3. táblázat, 11. melléklet**).

3. táblázat. A paksi kutyák IFAT és PCR vizsgálatainak eredményei

Jele	MegaScreen Fluoleish	Római IFAT	PCR	
			kDNS	ssu rDNS nested
P01	pozitív ¹	pozitív ¹	pozitív ²	pozitív ²
P10	neg	pozitív (1:80)	neg (BC)	pozitív (BC)
P12	pozitív (1:5120)	pozitív (1:5120)	pozitív (BC, nycs.)	pozitív (BC, nycs.)
P14	neg	neg	neg	pozitív (BC)
P17	neg	pozitív (1:80)	neg (BC)	neg (BC)
P20	neg	pozitív (1:160)	neg (BC)	neg (BC)

neg= negatív; BC= buffy-coat.; nycs.= nyirokcsomó ¹ IDEXX-VetMedLabor-ban (Ludwigsburg, Németo.)

elvégzett vizsgálat: pozitív, 1:3200; ² A máj, a lép és a nyirokcsomó kenetéből kivont DNS mintákban



14. ábra A paksi kennel kutyáinak buffy-coat mintáin végzett kineoplaszt DNS specifikus PCR reakció termékei (P01 kutya máj (L), lép (S) és nyirokcsomó punktatum (N). *N* = negatív, *P* = pozitív kontroll)

5.1.2.3. A *Leishmania* specifikus PCR termékek szekvencia analízise

Az elaltatott kutya (P01) máj, valamint a második tüneteket mutató kutya (P12) BC mintáival végzett kDNS specifikus PCR reakció termékeinek nukleotidsorrendjét összehasonlítottuk a GenBank adatbázisban található referencia szekvenciákkal. Ennek során úgy találtuk, hogy a P01 májmintájából nyert kDNS specifikus PCR termékek szekvenciái 96%-os hasonlóságot mutattak több *L. infantum* szekvenciával (EU370893.1, EU370895.1, EU370899.1 and Z35272.1). Az egyezés 94%-os volt egy *L. donovani* (EU370885.1), továbbá egy *L. major* (EU370908.1) referencia szekvenciával. A P12 jelű kutya BC mintájából készült PCR termék nukleotid szekvenciáját elemezve 95%-os egyezést találtunk egy *L. infantum* (EU370893.1) és egy *L. donovani* (EU370885.1) referencia szekvenciával.

5.1.3. Az állatorvosok körében végzett kérdőíves felmérés

A megkeresett 216 állatorvosi praxis közül 67 (31%) küldte vissza a kitöltött kérdőívet (**2. melléklet**). A válaszadó állatorvosok az egyetemi kurzusokat jelölték meg a kutyák leishmanioziséval kapcsolatos ismereteik forrásaként. Három budapesti és egy siófoki rendelőből összesen nyolc leishmaniás kutya előfordulását jelentették 1999-ig visszamenőleg. A nyolc állat mindegyike hosszabb-rövidebb időt endémiás területen (Görögország, Horvátország, Portugália, Olaszország, Málta, Franciaország és Spanyolország) töltött a betegség kialakulását megelőző hónapokban/években. Hét esetben a bántalmat külföldön diagnosztizálták, és az állatok Magyarországra érkezése előtt megkezdték a gyógykezelésüket. Egy kutya *L. infantum* fertőzöttségét Siófokon diagnosztizálták klinikai tünetei (anémia, onikogrifózis, fekélyes bőr- és szemelváltozások) és az elvégzett MegaScreen® FluoLeish IFAT teszt pozitív eredménye alapján (HEMO-VET Kft., Budapest).

5.2. A lepkeszúnyogok hazai előfordulásával kapcsolatos vizsgálatok

5.2.1. A csapdázások eredményei

5.2.1.1. Ragacsos lapokkal végzett gyűjtés

A ragacsos lapokkal 2006-2007 folyamán, a Baranya megyei Nagyharsány katolikus temploma melletti kőfal üregeiben, ill. a közeli szoborparkként üzemelő, korábbi kőbánya területének a sziklaüregeiben a *P. neglectus* hét egyedét csapdáztuk. 2008-ban egy alkalommal a *P. mascittii* faj hét példányát a Veszprém megyei Kapolcsról kivezető út mentén található, kőből épült támfal esővíz elvezető nyílásaiba helyezett ragacsos lapokkal gyűjtöttük (4. táblázat, 6. melléklet).

4. táblázat. Magyarország két megyéjében ragacsos lapokkal végzett lepkeszűnyog-gyűjtések eredményei

Megye, legközelebbi település	Kihelyezés ideje	lapok száma	<i>P. neglectus</i> (H, N)	<i>P. mascittii</i> (H, N)
Veszprém Kapolcs	2008. 08. 13 - 15.	19	0	4, 3
Baranya Nagyharsány	2006. 07. 15 - 18.	5	1, 2	0
„	2007. 07. 05 - 07.	20	1, 0	0
„	2007. 07. 05 - 07.	10	0, 1	0
„	2007. 08. 07 - 09.	7	2, 0	0
Total (H, N)			7 (4, 3)	7 (4, 3)

H = hím; N = nőstény

5.2.1.2 CDC Miniature Light Trap és MMX csapdákkal végzett gyűjtések

A CDC és MMX csapdákkal nagyobb számban gyűjtöttük a lepkeszűnyogokat, mint a ragacsos lapokkal. Pest megyében, 2007 júliusában két hím *P. neglectus* és egy nőstény *P. mascittii* került a fénycsapdába egy törökbálinti kertés ház udvarán (5. táblázat, 7. melléklet). Később ezen és más közeli gyűjtési helyeken, hét alkalommal sikertelenül próbáltunk 2008 és 2009 nyarán lepkeszűnyogokat csapdázni (7. melléklet). A Baranya megyei Villánykövesden három baromfiudvarban 2006, 2008 és 2010 nyarán összesen 4 hím és 6 nőstény *P. neglectus*, továbbá egy nőstény *P. mascittii* példányt gyűjtöttünk (4.5. táblázat). Összességében 220 (134 hím és 96 nőstény) *P. neglectus*-t gyűjtöttünk Baranyában, legnagyobb számban a Nagyharsányi Szoborparkban (4.5. táblázat). Csongrád megyében, 2009 és 2010 nyarán a lepkeszűnyogok gyűjtésére tett kísérleteink három helyszínen vezettek eredményre. Maroslele község peremén, a mezőgazdasági

földek szomszédságában fekvő két baromfiudvarban, valamint Földeák mellett, a helyi vadásztársaság fácánnevelő telepén a *P. perfiliewi* összesen 367 (132 him és 235 nőtény) példányát gyűjtöttük. Az egyik maroslelei baromfiudvarban 2009-ben a *P. papatasi* egy nőtény példány fordult elő (5. táblázat, 7. melléklet).

5. táblázat Hazánkban CDC és MMX csapdákkal történt gyűjtés eredményei

Csapdázási módszer ¹	Csapdázás ideje	<i>P. neglectus</i> (H, N)	<i>P. perfiliewi</i> (H, N)	<i>P. mascittii</i> (H, N)	<i>P. papatasi</i> (H, N)
Törökbálint - Pest megye					
CDC K	2007. 06. 05 – 06.	2, 0	0	0, 1	0
Nagyharsány - Baranya megye					
MMX KB	2007. 08. 27 – 28.	1, 5	0	0	0
CDC KB	2008. 08. 01 – 03.	35, 25	0	0	0
MMX KB	2008. 08. 01 – 03.	28, 36	0	0	0
CDC / MMX KB	2010.07.09.	52, 16	0	0	0
CDC / MMX KB	2010. 08. 23 – 26.	1, 5			
Villánykövesd - Baranya megye					
CDC ÁH	2006. 07. 16 – 17.	1, 2	0	0	0
CDC / MMX ÁH	2008. 08. 01 – 03.	3, 4	0	0, 1	0
CDC ÁH	2010.07.09.	0, 1	0	0	0
MMX ÁH	„	1, 2	0	0	0
Földeák - Csongrád megye					
CDC FT	2009. 08. 12 – 14.	0	89, 182	0	0
CDC FT	2010. 08. 11-13.	0	2, 6	0	0
Maroslele – Csongrád megye					
CDC ÁH	2009. 08. 12 – 14.	0	37, 46	0	0, 1
CDC ÁH	2010. 08. 11-13.	0	4, 1	0	0
Total (H, N)		220 (124, 96)	367 (132, 235)	2 (0, 2)	1 (0, 1)

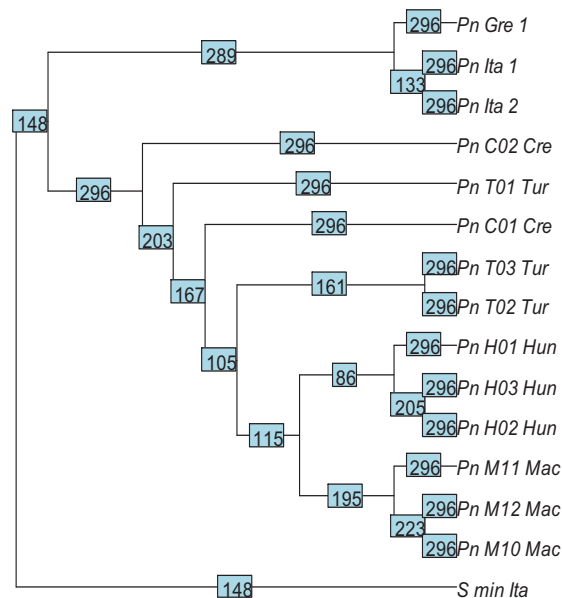
¹ÁH = állattartó hely; K = kert; FT = fácánnevelő telep; KB = Kőbánya

5.2.1.3. A paksi kenneiben és környékén végzett csapdázások

A paksi kenneiben és környezetében végzett lepkeszűnyog gyűjtési kísérleteink mindkét évben eredmény nélkül zárultak (6. melléklet. 7. melléklet)

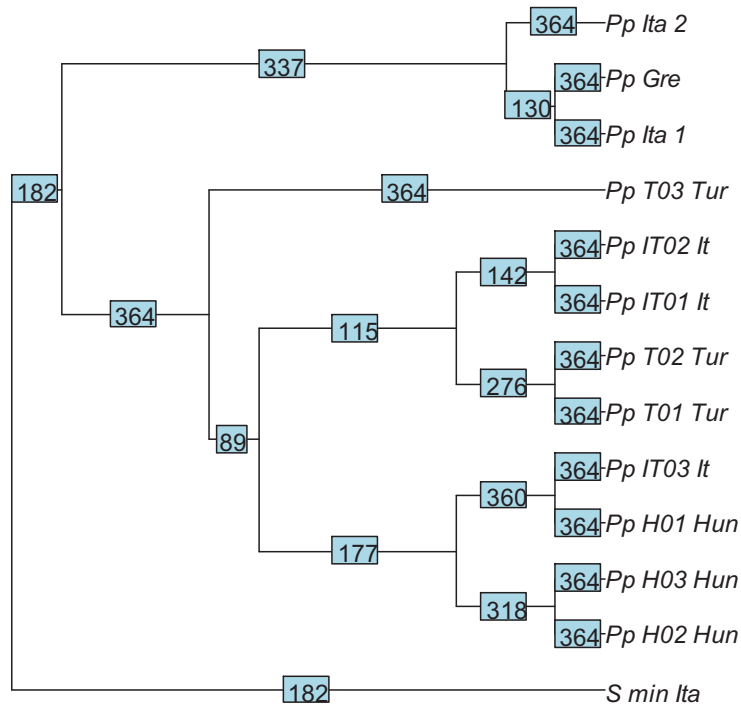
5.2.2. Hazánkban csapdázott lepkeszűnyogok filogenetikai vizsgálata

A külföldről kapott és hazánkban gyűjtött *P. neglectus* példányok ITS2 DNS szakaszának nukleotid szekvenciáit összehasonlítva azt találtuk, hogy ezek országokként eltérő mértékben elkülönülő csoportokba sorolhatóak. A GenBank görög és az olasz mintái élesen elkülönülő csoportot képeznek, a hazai és a macedón lepkeszűnyogok szekvenciái a krétai és a törökországi lepkeszűnyogokkal rokon, de különálló alcsoportokat alkotnak. (15. ábra).



15. ábra *Phlebotomus neglectus* ITS2 szekvenciák hasonlóságait tükröző konszenzus génfa. Cre= Kréta, Gre = Görögország., Ita=Olaszország, Hun= Magyarország Mac= Macedónia, Tur= Törökország. PnGre1, Pn Ita1, PnIta2: GenBank.

A hazai és külföldi *P. perfiliewi* példányok ITS2 szekvenciáinak összehasonlító elemzése során földrajzilag elkülönülő hasonlósági csoportokat találtunk. A hazai és a törökországi lepkeszűnyogok szekvenciái egymástól és a többi ország populációjától különálló csoportokat képeznek, de mindkét csoportban találunk egy-egy olasz eredetű szekvenciát. A GenBank adatbázisból vett olasz és görög szekvenciák egymással alkottak hasonlósági csoportot (16. ábra).



16 ábra *Phlebotomus perfiliewi* ITS2 szekvenciák hasonlóságait tükröző konszenzus génfa. Gre= Görögország, Ita és. IT =Olaszország, Hun = Magyarország Mac = Macedónia, Tur = Törökország. PnGre1, PnIta1, PnIta2: GenBank.

6. Megbeszélés

2006 és 2010 között végzett vizsgálataink során hazánkban vagy külföldön a *L. infantum*-mal fertőződött ebek és emberek, valamint a parazita vektoraiként ismert lepkeszúnyogfajok előfordulását kutattuk Magyarországon. Ezt megelőzően ilyen kutatások hazánkban nem történtek, és a vonatkozó ismereteink kisszámú, véletlenszerű megfigyelésen alapultak. Egy külföldön fertőződött kutya és tucatnál alig több importált emberi leishmaniózis esetet ismertünk, de autochton fertőződésről nem volt tudomásunk az országban. Hazánkból származó két ebet ugyan *L. infantum*-mal fertőzöttnek találtak külföldön (Dr. Rankli Éva szóbeli közlés), de e menhelyi kutyák fertőződésének helye bizonytalan. A bántalomra jellemző hosszú lappangási idő és a kórjelzés nehézségei miatt nem lehettünk biztosak abban, hogy hazánkban nincs olyan kutya, amely fertőzött, de tünetmentes. Az ilyen állatok képesek átadni a parazitát vektorok közvetítésével (Molina és mtsai., 1994), ritkán közvetlenül is (harapással, spermával, kongenitálisan) fogékony kutyáknak és embereknek (Rosypal és mtsai., 2005). Az 1930-as években

Hódmezővásárhelyen történt sikeres gyűjtések (Lőrincz és Szentkirályi, 1933), továbbá Szabó és Delyné Draskovits (1985) által közölt, illetve személyes értesülésekből származó leírásai alapján, egy vagy több lepkeszúnyogfaj előfordulását valószínűnek tartottuk az ország szubmediterrán klímájú, déli területein.

A háznál tartott kutyák körében, hat megyében végzett szerológiai vizsgálatunk során *L. infantum*-mal fertőződött állatot nem találtunk, ami szerint úgy tűnik, hogy a bántalom esetleg csak elvétve fordulhat elő a hazai kutyapopulációban. A kérdőívünket kitöltő állatorvosok 1999-ig visszamenőleg összesen csak 8 olyan kutyával találkoztak, amelyek külföldön fertőződtek. Ezek között egy olyan eset fordult elő, amelyben a parazitózist hazai laboratóriumban állapították meg (Farkas és mtsai., 2011). Az elmúlt öt évben további két olyan esetről értesültünk, amikor a kutyák külföldön fertőződtek. Ezek az esetek arra utalnak, hogy fertőzött kutyákkal hazánkba érkező külföldiek révén, valamint nyaralási és kiállítási célból külföldre vitt és ott fertőződött kutyák hazahozatala kapcsán fordulhat elő a *L. infantum* behurcolása (Teske és mtsai., 2002). Az ilyen esetek gyakorisága a jövőben várhatóan emelkedni fog (Desjeux, 2001).

A kutyák utaztatása mellett vad kutyafélék, róka (*Vulpes vulpes*), aranysakál (*Canis aureus*), és farkas (*Canis lupus*) endémiás balkáni területekről hazánkba vándorló egyedek is behurcolhatják a parazitát (Criado-Fornelio és mtsai., 2000; Mohebbi és mtsai., 2005). Az aranysakál napjainkban invazív fajként terjedőben van Magyarországon (Szabó és mtsai., 2007).

A parazita behurcolásának másik lehetséges módja a külföldön fertőződött emberek beutazása. A hazánkba leishmaniákat behurcoló emberek vizsgálata nem képezte kutatásunk tárgyát, de megkeresés alapján 2010-ben részt vettünk egy eset kórjelzésében. Egy felnőtt férfi beteg csontvelő mintájában mutattuk ki a *L. infantum* kDNS-ét, aki Horvátország endémiás területén töltött nyaralása során fertőződött a parazitával (Péterfi és mtsai., 2010). Míg korábban többnyire közel-keleti tartózkodásukról hazatérő személyekben állapították meg valamely trópusi *Leishmania*-fajjal történt fertőzést (Várnai és mtsai., 1985), addig az ezredfordulót követően a szomszédos Horvátország endémiás területein szerzett fertőzések tűnnek jellemzőnek hazánkban (Fried és mtsai., 2003; Péterfi és mtsai., 2010). Ennek hátterében a Horvátországba irányuló turisztikai célú utazások növekvő száma állhat. Említést érdemel még, hogy napjainkban számos menekült érkezik Magyarországra leishmania-endémiás, pl. közép-ázsiai és afrikai országokból, akik között, pl. *L. major*-ral, vagy *L. tropica*-val tünetmentesen fertőzöttek is előfordulhatnak (Desjeux, 2001; Dereure és mtsai., 1991).

Az országba érkező, leishmaniákkal fertőződött kutyák és emberek állat- és/vagy közegészségügyi szempontból veszélyt jelentenek, mivel a hosszantartó tünetmentes fertőzöttség ideje alatt a környezetükben előforduló vektorok közvetítésével a parazita tovább terjedhet (Molina és mtsai., 1994; Riera és mtsai., 2004). A kezelés alatt álló fertőzött kutyáktól és emberektől is fertőződhetnek a vektorok a leishmaniákkal, mivel a napjainkban elterjedt terápiás eljárások csak tünetmentességet biztosítanak, parazita-mentességet nem (Noli, 1999).

A parazita ritkán, egyik kutyáról a másikra, vagy emberre közvetlen módon is terjedhet, ám ennek jelentőségét különböző szerzők eltérően ítélik meg. Teske és mtsai., (2002) Hollandiába behurcolt kutya leishmaniózist tanulmányozva a parazita közvetlen átvitelét nem tapasztalták, s ezért az állatok és emberek fertőződésének kockázatát vektoroktól mentes környezetben elhanyagolhatónak ítélték. Petersen és Barr (2009) a parazita közvetlen átvitelének szerepét jelentősebbnek vélik, mert úgy gondolják, hogy a fertőzött kutyákkal Európából behurcolt *L. infantum* közvetlen átviteli utakon terjedhetett el az USA és Kanada lepkeszúnyogoktól mentes államainak számos kopótenyészetében.

A *L. infantum*-nak a fertőződött kutyáról a fogékonyra vagy emberre történő átjutásában legjelentősebbnek a vektor lepkeszúnyogokkal történő átvitelt tartják. Csapdázási kísérleteink során négy lepkeszúnyogfaj hazai előfordulását állapítottuk meg, melyek közül hármát előttünk nem gyűjtöttek az ország területén (Farkas és mtsai., 2011). Ezek közül kettő, a *P. perfiliewi* és a *P. neglectus* ismert vektorai a *L. infantum*-nak, a *P. papatasi* a *L. major* átvitelében játszik szerepet (Killick-Kendrick, 1999), a *P. mascitti* vektor szerepe még tisztázatlan (Naucke és Schmidt, 2004).

A *P. perfiliewi*-t korábbi gyűjtési helyein, Hódmezővásárhely belterületén (Lőrincz és Szentkirályi, 1933) végzett csapdázási kísérleteink nem vezettek eredményre. Három, közeli helyszínen viszont sikeresen gyűjtöttük e faj példányait. Valószínű, hogy a *P. perfiliewi* populációja az 1930-as évek óta folyamatosan előfordult az országnak ebben a részében. További vizsgálatok szükségesek annak megválaszolására, hogy miért nem találtuk meg a *P. perfiliewi* egyedeit a hasonló klimatikus adottságú békési és baranyai, ill. a klimatikusan eltérő, de Szabó és Delyné Draskovits (1985) által a faj előfordulási helyeként jelzett Pest megyei helyszíneken. A *P. perfiliewi* jelentős lehet a fertőződött kutyák/emberek által az országba behurcolt *L. infantum* helyi vektoraként. A hazai populáció eredetét vizsgáló filogenetikai elemzésünkben az itthoni és más országokból kapott egyedek csak részben elkülönülő hasonlósági csoportokba sorolódtak. Eredményeink a populációk nagy földrajzi távolságokon átívelő, gyakori keveredésére engednek következtetni. Ennek hátterében

valószínűleg e lepkeszúnyogfaj emberi közvetítéssel történő terjedése állhat, melynek módjait később tárgyalom.

A *L. infantum* másik fontos vektorát, a *P. neglectus*-t elsőként gyűjtöttük Magyarország területén. Több Baranya megyei településen fogtuk a faj példányait, és a jövőben elvégzendő kutatások hivatottak tisztázni, miért nem jártunk sikerrel számos közeli, hasonló klimatikus és környezeti adottságokkal rendelkező helyszínen. A *P. neglectus* egyedeit Pest megyében, egy törökbálinti ház kertjében egyetlen alkalommal fogtuk 2007 júniusában. Ez a faj valaha feljegyzett legészakibb előfordulási helye (Farkas és mtsai., 2011). A *P. neglectus* hazai előfordulása kiemelt jelentőségű a behurcolt leishmaniák belföldi terjesztése szempontjából, mivel e faj hidegtűrő képességével kitűnik a lepkeszúnyogok közül (Lindgren és mtsai., 2004). Valószínű, hogy hazánk mediterrán országokénál hűvösebb éghajlatát jobban tűri a rokon fajoknál, s emiatt a jövőben nem zárható ki szélesebb körű elterjedése. A *P. neglectus* a mediterrán országokban 300-1000m-es tengerszint feletti magasságban fordul elő (Lindgren és mtsai., 2004), de hazánkban alacsonyabb fekvésű, 100-180m tengerszint feletti magasság közé eső helyeken gyűjtöttük, ami vélhetően a faj hűvösebb éghajlathoz való alkalmazkodásának következménye. Filogenetikai elemzésünk a magyarországi és macedóniai lepkeszúnyogokat a törökországi populációból leszármazó, kisebb genetikai variációjú leánypopulációinak mutatta, amelyek egymástól és a törökországi populációtól is elszigetelten fejlődtek.

A *P. papatasi* egyetlen nőtény példányát az országban elsőként fogtuk Maroslele egyik baromfiudvarán. E fajnak járványtani jelentősége nem a *L. infantum*, hanem az embereket és rágcsálókat fertőző *L. major* terjesztésében van. Kontinensünkön e fajjal kapcsolatban aggodalmakat ébresztenek azok a vizsgálati eredmények, melyek szerint a *L. infantum* és *L. major* fajok embereket fertőző, természetes hibridjei a *P. papatasi*-ban képesek fertőzőképes promasztigotákká fejlődni (Volf és mtsai., 2007).

Magyarországon elsőként fogtuk Pest, Baranya és Veszprém megyében a *P. mascitti* néhány példányát. E faj, hasonlóan a *P. neglectus*-hoz, jól tolerálja a hűvös időjárást, az északi szélesség 50. fokáig terjedően, Belgiumtól Németországon át számos európai országban sporadikus előfordulású (Lewis, 1982; Naucke és Pesson, 2000). A *P. mascittii* leishmania-vektor szerepét több kutató valószínűsíti, elsősorban tisztázatlan eredetű autochton leishmaniózis esetekkel kapcsolatban, de bizonyítani eddig még nem sikerült (Killick-Kendrick, 1999)

A lepkeszúnyogok hazai populációinak eredetét kutatva figyelemmel kell lennünk kontinensünk éghajlatának múltbéli változásaira is. Igen valószínű, hogy Európa korábbi

felmelegedési periódusaiban (pl. a kora középkorban) a lepkeszúnyogok előfordulási területe a napjainkban tapasztalhatóhoz hasonlóan északi irányba terjedt ki (Naucke és Schmidt, 2004; Maroli és mtsai., 2008). Az éghajlat később bekövetkezett lehűlésével (pl. középkori „kis jégkorszak”) ezeknek a rovaroknak az elterjedési területe is visszahúzódhatott, és eközben a számukra kedvező klímájú kisebb-nagyobb térségben, egymástól elszigetelődött helyi populációk maradhettek hátra.

A lepkeszúnyogok jövőbeni elterjedését az éghajlat változásaival összefüggésben vizsgáló modellek e fajok fokozatos északi irányú terjeszkedését valószínűsítik Közép-Európában (Fischer és mtsai., 2011), ahol a szárazabbá és melegebbé váló klíma a jelenleginél kedvezőbb életfeltételeket biztosít majd e fajok számára. Az előrejelzések szerint Magyarország éghajlatában hasonló változások várhatóak a 21. sz folyamán (HREX jelentés 2011), ezért a vérszívó lepkeszúnyogok szélesebb körű elterjedésével, évtizedes távlatokban vizsgálódva hazánkban is számolni kell.

A *P. perfiliewi* és a *P. neglectus* magyarországi előfordulásáról eddig összegyűjtött adataink a *L. infantum* belföldi átvitelének lehetőségére figyelmeztetnek, de a járványtani veszély becslését nem teszik lehetővé. Ezzel kapcsolatosan csupán a lepkeszúnyogok előfordulásának hazai tapasztalatait az endémiás országokból származó ismeretekkel összevetve formálhatunk képet. Csapdázásaink alkalmával mindkét faj egyedeit csak csekély számban fogtuk az endémiás országokban leírt gyűjtési mennyiségekhez viszonyítva, ami a hazai populációk alacsony egyedsűrűségét valószínűsíti. Európa endémiás országaiban a lepkeszúnyogok magas egyedsűrűsége mellett kisszámú parazitát hordozó kutya is elegendő a *L. infantum* fertőzési ciklusának fenntartásához (Maroli és mtsai., 2008). A mediterrán térségben e lepkeszúnyogfajok imágói május elejétől, október végéig foghatóak, amely időszakban becslések szerint 2-4 generációjuk fejlődik ki teljesen (Ready és Croset, 1980). Magyarország területén ezzel szemben csak június eleje és augusztus vége között sikerült lepkeszúnyogokat fognunk, ami miatt valószínű, hogy hazánkban csak egy, legfeljebb két generációjuk fejlődhet ki egy évben, a vektorok számára alkalmas időjárás esetén. A vektorok előfordulása és aktivitása mellett a parazita fejlődését és földrajzi elterjedését meghatározó legfontosabb tényező a környezet hőmérséklete (Kuhn, 1999). Ez Európa mediterrán országaiban a bántalom előfordulását a tengerszint feletti 4-600 méteren (Lindgren és mtsai., 2004), hazánk hűvösebb éghajlatán minden valószínűség szerint, ennél alacsonyabb magasságban korlátozza. Mindezek alapján igen valószínű, hogy hazánkban a lepkeszúnyogok a fertőzött kutyával behurcolt *L. infantum*-ot fogékony ebre vagy emberre csak az évnek egy rövid, a nyár második felére eső szakaszában (július vége – augusztus eleje), elsősorban Dél-Magyarország alacsony fekvésű (tengerszint feletti

200m-nél alacsonyabb [?] helyein vihetik át. Ezért az ország déli megyéiben a nyár folyamán szabad ég alatt éjszakázó kutyákat veszélyezteti leginkább a leishmaniák terjedése. A parazita átvitelének esélyét minimálisra lehet csökkenteni a térségben élő kutyák éjszakára történő lepkeszúnyog-mentes helyre való bezárásával és/vagy repellens szert tartalmazó nyakörvvel való ellátásával (Gavvani és mtsai., 2002). Endémiás területekkel határos hazánkban a parazita terjedésének egy kevésbé megszokott módja is lehetséges. Hendrickx és mtsai., (2008) a lepkeszúnyogokhoz hasonlóan gyenge repülőképességűnek tartott törpeszúnyogokról mutatták ki, hogy a körülmények „szerencsés” együttállása esetén életképes imágóikat a szárazföld felett akár 400 km-es távolságra is elsodorhatják a troposzférikus szelek. Az endémiás dalmát tengerparton előforduló fertőzött *P. neglectus* imágók hasonló léptékű észak-nyugati irányú sodródással elérhetik Magyarország dél-nyugati és középső részét, ami a *L. infantum* közvetlen behurcolásának és fogékony kutyákba vagy emberekbe történő beoltásának lehetőségét veti fel. Szerbia határainkhoz közel eső, endémiás területein élő *P. perfiliewi* populációk leishmania-hordozó egyedei széllel hasonló utat megtéve, elsodorhatnak hazánk legészakibb pontjáig. Európában nem példa nélküli, hogy egyes lepkeszúnyogfajok jelentős földrajzi akadályokon kelnek át. Szicíliában például olyan *P. sergenti* egyedeket gyűjtöttek, amelyek az ITS2 elemzés alapján észak-afrikai populációk egyedével mutatnak rokonságot (Gramiccia és Gradoni, 2005). A lepkeszúnyogok szél általi passzív terjedési lehetőségének mérlegelésénél ugyanakkor figyelembe kell vennünk, hogy e vérszívók legtöbbször a talaj felett legfeljebb 1-2 méterrel repülnek, ami a ma használatos, talaj feletti 10m-es magasságra fejlesztett sodródási modellek használhatóságát korlátozza (Fischer és mtsai., 2011). A lepkeszúnyogok terjedését véletlenszerű események is elősegíthetik. Más parazitákhoz hasonlóan ezek esetében is számolnunk kell azzal a lehetőséggel, hogy az imágók vagy a lárvák emberi segítséggel (pl. járművekben) is terjedhetnek. A lárvák pl. termőfölddel történő szállításának közvetlen járványtani jelentősége nincs, mivel ezek nem hordozhatják az egysejtű parazitát. A leishmaniák nem-endémiás országba történő közvetlen behurcolásában csak a fertőződött imágók terjedésének lehet jelentősége.

A kutatómunkánk során a paksi kennelben tapasztalt kutya leishmaniózis esetek vizsgálatának központi kérdései voltak, hogy milyen forrásból származott a fertőzéseket okozó *L. infantum*, és hogy milyen módon került be a kutyaállományba. A kutyatenyésztő úgy tájékoztatott minket, hogy a vizsgált ebeket, ill. azok szüleit születésüktől fogva ugyanabban a kennelben tartotta, amit az állatok életük folyamán nem hagytak el, és transzfúziót korábban egyik kutya sem kapott. Ezért a kennelben tapasztalt *L. infantum* okozta fertőzésekről kijelenthetjük, hogy minden valószínűség szerint autochton eredetűek. Oliva és mtsai., (2006) kritériumainak figyelembe vételével megállapítható, hogy a paksi

kennelben a leishmaniózis egy jellegzetes ún. „fókuszpontját” tapasztaltuk. E „fókuszpontok” közös jellemzői, hogy az egy helyen tartott ebeknek, egy időben kevesebb, mint a fele fertőződik leishmaniákkal (a paksi kennelben: $6/20=30\%$), továbbá, hogy ezeknek csak egy része (a paksi kennelben: $2/6$) mutat kórfejlődést, míg a többi kutyában (a paksi kennelben: $4/6$) a kór szubklinikai formában lappang. A fókuszpontokban a parazita vektorokkal és közvetlen módon is terjedhet.

A fertőzések forrásának és ebek közti parazita-átvitel módjának megállapítása céljából a kennelben és közeli baromfiudvarokban folytatott csapdázások során lepkeszúnyogot nem találtunk. Emiatt nem sikerült bizonyítanunk, hogy a parazita vektorok közvetítésével jutott a kennelbe és terjedt a kutyák között. Hasonló, tisztázatlan eredetű esetek nem példa nélküliek Európában. Ausztriában (Kollaritsch és mtsai., 1989), Németországban (Naucke és Schmitt, 2004) és Hollandiában (Slappendel és mtsai., 1999) egy vagy több, *L. infantum*-mal fertőzött kutyát, lovat vagy embert amely/aki korábban nem járt endémiás területen és környezetében nem sikerült tünetmentes parazita-hordozót, sem lepkeszúnyogok előfordulását kimutatni. Észak-Amerikában kennelben tartott kopók járványszerű *L. infantum* okozta fertőzéseit írták le lepkeszúnyog-mentes környezetben (Gaskin és mtsai., 2002; Petersen és Barr, 2009).

A lepkeszúnyogok szerepe a leishmaniák helyi átvitelében annak ellenére sem zárható ki Pakson, hogy csapdázási kísérleteink eredménytelenül zárultak. Ezeket ugyanis 2008 és 2009 nyarán végeztük, a kutyákon a bántalom tünetei ezt megelőzően 2007 októberében és 2008 májusában jelentkeztek. A bántalom hosszú lappangása miatt (Dujardin és mtsai., 2008) valószínű, hogy a kutyák fertőzése évekkorábban, de legkésőbb 2007 nyár végén történhetett, amikor a lepkeszúnyogok még jelen lehettek a kennel környezetében. A vérszívók számát ezt követően, rövid idő alatt drasztikusan csökkenthette a Pakson nyaranta 5-6 alkalommal elvégzett földi és légi kémiai szúnyoggyérítés. Ennek kivitelezését a vizsgálataink előtt két évvel, 2006-ban vette át a város önkormányzatától és napjainkig saját protokolljai szerint végzi egy magáncég (DC Dunakom Kft., személyes közlés). Paks környékén a *L. infantum* vektoraként a *P. neglectus* fordulhat elő, amelyet baranyai lepkeszúnyog-gyűjtéseink során a paksi kenneltől számítva kevesebb, mint 100 kilométeres távolságban fogtunk. Paks térségére 10°C éves és 20°C feletti júliusi, ill. augusztusi középhőmérséklet jellemző (Mersich és mtsai., 2003), ami megfelel a *P. neglectus* éghajlati igényeinek (Lindgren és mtsai., 2004).

A közeli horvátországi és szerbiai endémiás területekről (Bosnic és mtsai., 2006, Miscevic és mtsai., 1998) a parazita fertőzött lepkeszúnyogokkal véletlenszerűen, pl. gépjárműben behurcolva, vagy troposzférikus szelekkel sodródva eljuthatott a térségbe. A

parazita átvitelének lehetséges forrását jelenthetik a városba, vagy azon átutazó fertőzött emberek, vagy házi/vadászkutyák, valamint a határtól délre fekvő endémiás területről a környékre vándorló fertőzött kutyafélék (rókák, aransakálok, farkasok) (Criado-Fornelio és mtsai., 2000, Mohebal és mtsai., 2005).

Kutatásaink eredményeit összegezve Magyarországot a kutyák leishmaniózisának elterjedése szempontjából jelenleg nem tekinthetjük endémiás országnak. A parazitát ugyanakkor, sok más, nem endémiás európai országhoz hasonlóan, fertőződött kutyákkal és emberekkel egyre fokozódó mértékben hurcolják be, ami különösen a nyári hónapokban veszélyes járványtani helyzetet teremthet a *P. neglectus* és a *P. perfilliewi* hazai populációinak elterjedési területén (Farkas és mtsai., 2011). A paksi kennelben tartott kutyák között előforduló *L. infantum* okozta fertőzödések az első hazai autochton eseteknek tekinthetjük, annak ellenére, hogy ezek forrását és az átvitel módját nem sikerült azonosítani (Tánczos és mtsai., 2012).

Konklúzió

A közelmúlt kutatásai fényében ma úgy látjuk, hogy a kontinensünk éghajlatában, szociális, gazdasági és ökológiai rendszereiben végbement változások a *Leishmania*- és lepkeszúnyog-fajok szélesebb körű elterjedéséhez vezettek Európában. Ezek a folyamatok a jövőben a kutya *L. infantum* okozta fertőzöttségének endémiássá válását eredményezheti korábban leishmania-mentes országokban, így hazánkban is. Eddigi vizsgálataink alapvető információkat szolgáltatnak a kutya *L. infantum* okozta fertőzöttségének és a parazita vektorainak hazai előfordulásával kapcsolatosan, amelyek kiindulási alapul szolgálnak jövőbeni kutatásainkhoz. A hazai kutyák eddigi szerológiai vizsgálata csupán hat megyére terjedt ki. A jövőben az ország többi megyéjében, nagyobb számú kutyát megvizsgálva pontosabb képet kaphatunk a lappangó fertőzések esetleges hazai előfordulásáról. A lepkeszúnyogok hazai előfordulásával összefüggő járványtani veszélyhelyzet pontosabb megismerése céljából további vizsgálatok szükségesek a vérszívók földrajzi elterjedési határainak, valamint aktivitási időszakának pontos meghatározásához. Vizsgálataink mellett feladatunk az ország déli felében dolgozó állatorvosok, továbbá az itt élő kutyatartók figyelmét felhívni a lepkeszúnyogok jelenlétével összefüggő járványtani veszélyre, és a megelőző intézkedések kiemelt jelentőségére. Az endémiás területre utazott vagy ilyen helyről hazánkba telepített kutyák által képviselt járványtani veszélyre, és ezek mérséklésének lehetőségeire az ország más részein élő állatorvosok és kutyatulajdonosok figyelmét is rá kell irányítanunk.

7. Új tudományos eredmények

A négy éven át végzett laboratóriumi és terepvizsgálatok során kapott adatok értékelése alapján az alábbiakban foglalhatóak össze az új eredmények.

1. Véletlenül kiválasztott, 705 hazai kutya szerológiai vizsgálatakor *L. infantum* okozta fertőzöttséget nem találtunk. Ez alapján úgy tűnik, hogy hazánkban még azokon a déli területen sem fordul elő endémiásan a kutyák leishmaniózisa, ahol megtaláltunk a parazita vektoraként ismert lepkeszúnyog fajokat. Az állatorvosoknak kiküldött kérdőívre adott válaszok, valamint a személyes tapasztalataink alapján előfordulnak külföldön fertőződött ebek az országban, amelyek a parazita életsiklusában és átvitelében szerepet játszó vektorfaj(ok) jelenléte esetén járványtani veszélyt jelenthetnek a környezetükben élő kutyák és emberek számára.
2. Elsőként állapítottuk meg a kutyák leishmaniózisának autochton előfordulását. de a *L. infantum* kennelbe jutásának módja tisztázatlan maradt, mivel az állatok környezetében végzett csapdázásokkal lepkeszúnyogokat nem sikerült fogni.
3. Az ország különböző részein különféle csapdákkal végzett gyűjtések során négy vérszívó lepkeszúnyog faj kevés egyedeire leltünk. Ezek közül kettő, a *P. perfiliewi* és a *P. neglectus* a *L. infantum* vektoraként ismert. Az utóbbi vektorfaj, a vektorként még nem ismert *P. mascitti* valamint a *L. major* terjesztésében szerepet játszó *P. papatasi* példányait elsőként találtuk meg az országban. Megfigyeléseink szerint e fajok kis egyedszámmal, leginkább az ország déli, melegebb klímájú térségeiben fordulnak elő a nyári hónapokban.
4. Az általunk fogott és a külföldről kapott lepkeszúnyogok filogenetikai elemzése alapján valószínű, hogy a *P. neglectus* és a *P. perfiliewi* populációi részleges izolációban élnek hazánkban, de egyik fajnál sem lehet kizárni annak lehetőségét, hogy a *L. infantum* a közeli endémiás területekről fertőzött lepkeszúnyogokkal is bejuthat az országba.

8. Irodalom

Adler, S.: **The sandflies of Cyprus (Diptera)**, Bull. Entomol. Res., 36. 497–511, 1946.

Alexander, B, Usma, M., Cadena, H., Quesada, B.L., Solarte, Y., Roa, W., Travi, B.L.: **Evaluation of deltamethrin-impregnated bednets and curtains against phlebotomine sandflies in Valle del Cauca, Colombia**, Med. Vet. Entomol., 3. 279-283, 1995.

Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J.: **Canine leishmaniasis**, Adv. Parasitol.; 57. 1-88, 2004.

Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L.: **Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one**, Trends Parasitol. 24 (7). 324-330, 2008.

Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F.: **Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans**, Adv. Parasitol., 64. 1-109, 2007.

Bates, P.A.: **Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies**, Int. J. Parasitol.; 37(10). 1097-1106, 2007.

Belkaid, Y., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., Rowton, E., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M.: **Delayed-type hypersensitivity to Phlebotomus papatasi sand fly bite: An adaptive response induced by the fly?**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97. 6704–6709, 2000.

Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadoré, J.L., Bourdoiseau, G.: **Atypical forms of canine leishmaniosis**, Vet. J., 162(2). 108-120, 2001.

Bogdan, C., Schönian, G., Bañuls, A.L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Röllinghoff, M., Mertens, R.: **Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: Case report and review of the literature**, Clin. Infect. Dis, 32. 302-306, 2001.

Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Bauer, F.S., Parra, L.E., Menz, I., Morgado, A.A., Soares, I.S., Batista, L.M., Palatnik-de-Sousa, C.B.: **Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil**, Vaccine, 26(39). 4991-4997, 2008

Bosnić, S., Gradoni, L., Khoury, C., Maroli, M.: **A review of leishmaniasis in Dalmatia (Croatia) and results from recent surveys on phlebotomine sandflies in three southern counties**, Acta Trop., 99(1). 42-49, 2006.

Brandão-Filho, S.P., Campbell-Lendrum, D., Brito, M.E., Shaw, J.J., Davies, C.R.: **Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil**, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 5. 488-494, 1999.

Bravo, L., Frank, L.A., Brenneman, K.A.: **Canine leishmaniasis in the United States**. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet., 15. 699-708, 1993.

Chang, P.C.: **The ultrastructure of *Leishmania donovani***, J. Parasitol.; 42(2). 126-136, 1956.

Charrel, R.N., Gallian, P., Navarro-Mari, J.M., Nicoletti, L., Papa, A., Sánchez-Seco, M.P., Tenorio, A., de Lamballerie, X.: **Emergence of Toscana virus in Europe**, Emerg. Infect. Dis., 11. 1657-1663, 2005.

Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A.: **A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum***, Vet .Rec.; 141. 539-543, 1997.

Cox, F.E.: **History of human parasitology**, Clin. Microbiol. Rev., 15(4). 595-612, 2002.

Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E., Roldan-Soriano, M.A., Diaz-Sanchez, M.A.: **A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain**, Vet. Parasitol.; 20. 92(4). 245-251, 2000.

Dancesco, P.: **Les espèces de phlébotomes (Diptera: Psychodidae) de Roumanie, certains aspects de leur écologie et nouvelles stations de capture**, Trav. Mus. Natl. Hist. Nat. Grigore Antipa, 51.185–199, 2008.

Deplazes, P., Grimm, F., Papaprodou, M., Cavaliero, T., Gramiccia, M., Christofi, G., Christofi, N., Economides, P., Eckert, J.: **Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1**, Acta Trop., 71. 169–178, 1998.

Dereure, J., Rioux, J.A., Gallego, M., Perières, J., Pratlong, F., Mahjour, J., Saddiki, H.: ***Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs**, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 85(5). 595, 1991.

Desjeux, P., Alvar, J.: **Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe**, Ann. Trop. Med. Parasitol., 97. Suppl 1. 3-15, 2003.

Desjeux, P.: **The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide**, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 95. 239–243, 2001.

Dujardin, J.C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y., Boelaert, M.: **Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe**, Emerg. Infect. Dis., 14(7). 1013-1018, 2008.

Dye, C.: **The logic of visceral leishmaniasis control**, Am. J. Trop. Med. Hyg., 55(2). 125-130, 1996.

van Eys, G.J., Schoone, G.J., Kroon, N.C., Ebeling, S.B.: **Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites**, Mol. Biochem. Parasitol., 51 (1). 133-142, 1992.

Farkas R, Tánczos B.: **Kutya leishmaniózis és jelentősége Európában**, Magyar Állatorvosok Lapja, 131. 304-312, 2009.

Farkas R., Tánczos B., Bongiorno, G., Maroli, M., Dereure, J. and Ready, P.: **First surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary**. Vector Borne Zoonotic Dis., 11. 1-12, 2010. [10.1089/vbz.2010.0186](https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0186)

Feliciangeli, M.D.: **Natural breeding places of phlebotomine sandflies**, Med. Vet. Entomol., 1. 71-80, 2004.

Ferrer, L.: **Leishmaniasis**, Kirk RW és Bonagura JD (szerk.): **Current Veterinary Therapy XI**. Saunders, Philadelphia, 266-270, 1992.

Ferrer, L.M.: **Clinical aspects of canine leishmaniasis**, Killick-Kendrick R. (szerk.): **Canine leishmaniasis: an update**, Proc. Int. Can. Leishm. Forum, Barcelona, Spain, 1999. Intervet Int., Boxmeer, Hollandia, 6-10, 1999.

Fischer D, Moeller P, Thomas SM, Naucke TJ, Beierkuhnlein C. **Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change**. PLoS Negl Trop Dis. (11):e1407. 2011

Fried, K., Todorova, R., Pintér E.: **Humán visceralis leishmaniózis megbetegedés Magyarországon**, Epiinfo, 10. 1, 2003.

Gaskin, A.A., Schantz, P., Jackson, J., Birkenheuer, A., Tomlinson, L., Gramiccia, M., Levy, M., Steurer, F., Kollmar, E., Hegarty, B.C., Ahn, A., Breitschwerdt, E.B.: **Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel**, J. Vet. Intern. Med., 16(1). 34-44, 2002.

Gavvani, A.S., Hodjati, M.H., Mohite, H., Davies, C.R.: **Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial**, Lancet, 360(9330). 374-379, 2002.

Gradoni, L., Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., De Luna, R., Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., Oliva, G.: **Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals**, Vaccine, 23 (45). 5245-5251, 2005.

Gradoni, L., Gramiccia, M.: **Leishmaniosis**. A következőben: **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, Párizs, Franciország : Office International des Epizooties (OIE). 2004. Elérhető még: http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/a_00050.htm

Gramiccia, M., Gradoni, L.: **The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control**, Int. J. Parasitol., 35(11-12). 1169-1180, 2005.

Gramiccia, M.: **Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis**, Vet. Parasitol., 181 (1). 23-30, 2011.

Harris, M.P.: **Suspected transmission of leishmaniasis**, Vet. Rec., 135. 339, 1994.

Hendrickx, G., Gilbert, M., Staubach, C., Elbers, A., Mintiens, K., Gerbier, G., Ducheyne, E.: **A wind density model to quantify the airborne spread of *Culicoides* species during north-western Europe bluetongue epidemic, 2006**. Prev. Vet. Med., 15. 87 (1-2). 162-181, 2008.

Holzmüller, P., Bras-Gonçalves, R., Lemesre, J.L.: **Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania***, Parasitology, 132. Suppl: S 19-32, 2006.

Jacobson, R.L., Eisenberger, C.L., Svobodova, M., Baneth, G., Sztern, J., Carvalho, J., Nasereddin, A., El Fari, M., Shalom, U., Volf, P., Votypka, J., Dedet, J.P., Pratlong, F., Schonian, G., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., Warburg, A.: **Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel**, J. Infect. Dis., 188(7).1065-1073, 2003.

- Jüttner, C., Rodríguez Sánchez, M., Rollán Landeras, E., Slappendel, R.J., Fragío Arnold, C.: **Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis**, *Vet. Rec.*, 149 (6). 176-179, 2001.
- Killick-Kendrick, R.: **The biology and control of phlebotomine sand flies**, *Clin. Dermatol.*, 17 (3). 279-289, 1999.
- Koehler, K., Stechele, M., Hetzel, U., Domingo, M., Schönian, G., Zahner, H., Burkhardt, E.: **Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum***, *Vet. Parasitol.*, 109. 9-17, 2002.
- Kollaritsch, H., Emminger, W., Zaunschirm, A., Aspöck, H.: **Suspected autochthonous kala-azar in Austria**, *Lancet*, 1. (8643). 901-902, 1989
- Kontos, V.J., Koutinas, A.F.: **Old World Canine Leishmaniasis**, *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 15. 949-959, 1993.
- Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K.G.: **Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)**, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 35 (5). 376-383, 1999.
- Kuhn, K.G.: **Global warming and leishmaniasis in Italy**, *Trop. Med. Int. Health*, 7 (2). 1–2, 1999.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P.: **Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis**, *J. Clin. Microbiol.*, 40 (1). 210-215, 2002.
- Lakatos M, Szépszó G, Bihari Z, Krüzselyi I, Szabó P, Bartholy J, Pongrácz R, Pieczka I, Torma Cs. **Éghajlati szélsőségek változásai Magyarországon: közelmúlt és jövő**. OMSZ 2012. http://www.met.hu/doc/IPCC_jelentes/HREX_jelentes-2012.pdf
- Lane, R. P.: **Sandflies (Phlebotominae)**. A következőben: Lane, R.P., Crosskey, R.W. (szerk.): **Medical Insects and Arachnids**, Chapman and Hall, London, 78-119, 1993.
- Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Tarallo, V.D., Parisi, A., Traversa, D., Otranto, D.: **Multilocus molecular and phylogenetic analysis of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Italy**, *Acta Trop.*, 119 (2-3). 91-98, 2011.

Lehane, M.J.: **The Biology of Blood-Sucking in Insects**, Cambridge University Press, 235-237, 2005.

Lemesre, J.L., Holzmüller, P., Gonçalves, R.B., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleyra, M., Papierok, G.: **Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial**, *Vaccine*, 25 (21). 4223-4234, 2007.

Lewis, D.J.: **A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae)**, *Bull. Br. Mus.*, 45. 121–209, 1982.

Lindgren, E., Naucke, T., Menne, B.: **Climate variability and visceral leishmaniasis in Europe**, A következőben: **Report of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis**, Geneva, Switzerland, 88-93, 2–4 February, 2004.

Llanos-Cuentas, E.A., Roncal, N., Villaseca, P., Paz, L., Ogusuku, E., Perez, J.E., Caceres, A., Davies, C.R.: **Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes**, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93. 15–20, 1999.

Lőrincz F., Szentkirályi Zs.: ***Phlebotomus macedonicus* előfordulása Magyarországon**, *Állattani Közlemények*, 3-4. 160-169, 1933.

Lukes, J., Guilbride, D.L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., Englund, P.T.: **Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure**, *Eukaryot Cell*, 1 (4). 495-502, 2002.

Lukes, J., Mauricio, I.L., Schönian, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F.J., Miles, M.A.: **Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104. 9375–9380, 2007.

Magdus M.: **A kutya leishmaniózis. (*Leishmaniózis canum*)**, *Állatorvosi Praxis*, 5. 5-9, 2004.

Makara Gy.: **Érdekes human-parazitológiai esetek. *Leishmania donovani* fertőzés hazánkban**, *Orvosi Hetilap*, 83. 562, 1942.

Maroli, M., Mizzon, V., Siragusa, C., D'Oorazi, A., Gradoni, L.: **Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy**, *Med. Vet. Entomol.*, 15 (4). 358-363, 2001.

Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L.: **The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors**, Trop. Med. Int. Health, 2. 256-264, 2008.

Mersich I., Práger T., Ambrózy P., Hunkár M., Dunkel Z.: **A nyári és a téli félév középhőmérséklete**. A következőben: **Magyarország éghajlati atlasza**, Magyar Meteorológiai Szolgálat, Budapest, 13-14, 2003.

Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P.: **Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs**, J. Clin. Microbiol., 43 (11). 5515-5519, 2005.

Miles, M.A., Pova, M.M., de Souza, A.A., Lainson, R., Shaw, J.J.: **Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi***, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 74. 243–252, 1980.

Milutinovic, M., Bisevac, L.J., Miscevic, Z.: **Sand flies (Diptera, Phlebotomidae) of endemic foci of visceral leishmaniasis in Serbia, with emphasis on the species *Ph. perfiliewi* Parrot, 1930**, Acta Vet., 42. 21-28, 1992.

Miscevic, Z., Milutinovic, M., Ivovic, V.: **Fauna and distribution of sand flies (Diptera, Phlebotomidae) in Yugoslavia, Croatia, Macedonia and their role in the transmission of parasitic and viral diseases**, Acta Vet. (Beogr.), 48. 163–172, 1998.

Mohebbali, M., Hajjarian, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Naeini, K.M., Avizeh, R., Fakhar, M.: **Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran**, Vet. Parasitol., 15. 129 (3-4). 243-251, 2005.

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J.: **Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus***, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 88 (4). 491-493, 1994.

Molyneux, D. H., Moore, J., Maroli, M.: **Sugars in sandflies**. Parassitologia, 33 Suppl: 431-436, 1991.

- Moreira, E.D., Jr, Mendes de Souza, V.M., Sreenivasan, M., Nascimento, E.G., Pontes de Carvalho, L.: **Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission**, Vet. Parasitol., 122(4). 245-252, 2004.
- Moreno, J., Alvar, J.: **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model**, Trends Parasitol., 18 (9). 399-405, 2002.
- Naucke, T. J., Schmitt. C.: **Is leishmaniasis becoming endemic in Germany?** Int. J. Med. Microbiol., 293 Suppl 37. 179-181, 2004.
- Naucke, T.J., Pesson, B.: **Presence of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 (Diptera:Psychodidae) in Germany**, Parasitol. Res., 86. 335-336, 2000
- Noli C.: **Canine leishmaniasis**, Waltham Focus, 9. 16-24, 1999.
- Norton, S.A., Frankenburg, S., Klaus, S.N.: **Cutaneous leishmaniasis acquired during military service in the Middle East**, Arch. Dermatol, 1. 83-87, 1992.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T., Gradoni, L.: **Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons**, J. Clin. Microbiol., 44. 1318–1322, 2006.
- Orndorff, G.R., Cooper, B.A., Smith, W., Ryan, J.R.: **Canine visceral leishmaniasis in Sicily**, Mil. Med., 165 (1). 29-32, 2000.
- Otranto, D., Paradies, P., Lia, R.P., Latrofa, M.S., Testini, G., Cantacessi, C., Mencke, N., Galli, G., Capelli, G., Stanneck, D.: **Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area**, Vet. Parasitol.,144(3-4). 270-278, 2007.
- Palatnik-de-Sousa, C.B.: **Vaccines for canine leishmaniasis**, FrontImmunol., 3. 69, 2012.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, G., Zatelli, A., Zini, E.: **Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs**, J. Am. Vet. Med. Assoc., 236. 1184–1191, 2010.
- Peña, M.T., Roura, X., Davidson, M.G.: **Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998)**, Vet. Ophthalmol., 3 (1). 35-41, 2000.

Péterfi Z, Nemes Z, Vigvári S, Szomor A., Kereskai L, Kucsera I, Tánczos B, Ternák G.: **Visceral leishmaniasis in an immunocompetent Hungarian adult patient**, Health, 3. 1-5, 2011.

Petersen, C.A., Barr, S.C.: **Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized?** Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract., 39 (6). 1065-1074, 2009.

Ready, P.D., Croset, H.: **Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus newstead* and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera, Psychodidae) from Southern France** Bulletin of Entomological Research, 70. 511-523, 1980.

Ready, P.D.: **Leishmaniasis emergence in Europe**, Euro Surveill, 15(10).19505, 2010. Mar 11.

Riera, C., Fisa, R., Udina, M., Gállego, M., Portus, M.: **Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods**, Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg., 98 (2). 102-110, 2004.

Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perie`res, J.: **Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification**, Ann. Parasitol. Hum. Comp., 65. 111–125, 1990.

Rispail, P., Léger, N.: **Numerical taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 1. Considerations of morphological characters in the genus *Phlebotomus* Rondani & Berté 1840**, Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 93(6). 773-785, 1998.

Rogers, M.E., Bates, P.A.: ***Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission**, PLoS Pathog, 6. 91. 2007.

Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Frank, G., Lindsay, D.S. : **Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle**, J. Parasitol., 91 (4). 970-972, 2005.

Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L.S., Koutinas, A.F., Billinis, C., Kontos, V.I.: **Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs**, Am. J. Trop. Med. Hyg., 73 (1). 82-86, 2005.

Schawalder, P. : **Leishmaniose bei Hund und Katze**, Kleintierpraxis, 22. 237-246, 1977.

Schlein, Y.: **Marking of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) by feeding on sprayed, coloured sugar bait: a possible means for behavioural and control studies**, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 4. 599, 1987.

Service, M. W.: **The Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections of Man and Domesticated Animals**, CABI Publishing, 395-401, 2002.

Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K., Reiner, N.E.: ***Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells**, J. Immunol., 185 (9). 5011-5022, 2010.

Slappendel, R.J., Teske, E.: **The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial**, Vet. Q., 19 (1). 10-13, 1997.

Slappendel, R.J., Teske, E.: **A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas**, Killick-Kendrick, R. (szerk.): **Canine Leishmaniasis: An Update**. Hoechst. Roussel. Vet. Wiesbadepp., 54-59, 1999.

Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L.: **Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology**, J. Clin. Microbiol., 39(2). 560-563, 2001.

Solano-Gallego, L., Fernández-Bellon, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L.: **Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs**, J. Comp. Pathol., 130 (1). 7-12, 2004.

Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G.: **Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs**, J. Infect. Dis., 189(9). 1729-1733, 2004.

Szabó, J., Delyné Draskovits, Á.: **Lepkeszúnyogok – Redős szúnyogok**, Fauna Hungariae, 4/C. 13-16, 1983.

Szabó L, Heltai , Lanszki J, Szócs E. **An indigenous predator, the golden jackal (*Canis aureus* L.1758) spreading like an invasive species in Hungary**, USAMV-CN, 63 – 64, 2007.

Tafuri, W.L., Santos, R.L., Arantes, R.M., Gonçalves, R., de Melo, M.N., Michalick, M.S.,

- Tafari, W.L.: **An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues**, J. Immunol. Methods., 292 (1-2). 17-23, 2004.
- Tánczos B., Balogh N., Király L., Biksi I., Szeredi L., Gyurkovszky M., Scalone, A., Fiorentino, E., Gramiccia, M., Farkas R.: **First Record of Autochthonous Canine Leishmaniasis in Hungary**, Vector Borne Zoonotic Dis., (publikálás alatt) 2012.
- Teske, E., van Knapen, F., Beijer, E.G., Slappendel, R.J.: **Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands**, Acta Vet. Scand., 43(4). 195-201, 2002.
- Titus, R.G., Ribeiro, J.M.: **Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity**, Science, 239 (4845). 1306-1308, 1988.
- Toprak, S., Ozer, N.: **Sand fly species of Sanliurfa province in Turkey**, Med. Vet. Entomol., 1. 107-110, 2005.
- Várnai F, Fülöp É, Bánhegyi D.: ***Leishmania cutanea* magyar állampolgárok által importált esetei**, Orvosi Hetilap, 126. 2535, 1985.
- Volf, P., Benkova, I., Myskova, J., Sadlova, J., Campino, L., Ravel, C.: **Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids**, Int. J. Parasitol., 37(6). 589-593, 2007.
- Volf, P., Myskova, J.: **Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors**, Trends Parasitol., 23 (3). 91-92, 2007.
- Waitumbi, J., Warburg, A.: ***Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages**, Infect. Immun., 66(4). 1534-1537, 1998.
- Ward, R. D., Hamilton, J. G. G.: **Chemical and auditory signals in phlebotomine sand fly behaviour**, Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, 70-76, 2002.
- Williams, P.: **Relationships of phlebotomine sand flies (Diptera)**, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 88(2). 177-183, 1993.
- World Health Organization: **The Leishmaniases**, Technical Report Series No. 701. World

Health Organization, Geneva. 1984.

World Health Organization: **Weekly epidemiological record**, (77) 25. 210-212, 2002.

Young, D., Duncan, M.A.: **Guide to the Identification and Geographic Distribution of Lutzomyia Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae)**, Walter Reed Army Inst. of Research Washington DC, 887. 1994.

Young, D.G., Perkins, P.V.: **Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae) [Lutzomyia]**, Mosq. News, 44. 263-304, 1984.

van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Müller, A., Hölscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., Solbach, W., Laskay, T.: **Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 (37). 13837-13842, 2006.

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T.: **Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages**, J. Immunol., 173 (11). 6521-6525, 2004.

9. A doktori kutatás eredményeinek közlései

9.1 A témában megjelent tudományos publikációk

Tánczos B., Balogh N., Király L., Biksi I., Szeredi L., Gyurkovszky M., Scalone, A., Fiorentino, E., Gramiccia, M., Farkas R.: **First Record of Autochthonous Canine Leishmaniasis in Hungary**, Vector Borne Zoonotic Dis, 12(7):588-594, 2012. **IF: 2.437**

Péterfi Z., Nemes Z., Vigvári S., Szomor Á., Kereskai L., Kucsera I., **Tánczos B.**, Ternák G.: **Visceral leishmaniasis in an immunocompetent Hungarian adult patient**. Health, 3, 1-5, 2011. **IF: 0,62**

Farkas R., **Tánczos B.**, Bongiorno, G., Maroli, M., Dereure, J. and Ready, P.: **First surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary**. Vector Borne Zoonotic Dis., 11: 1-12, 2010. [10.1089/vbz.2010.0186](https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0186) . **IF: 2.733**

Tánczos B. és Farkas R. : **Lepkeszúnyogok (Diptera: Psychodidae) és járványtani jelentőségük**, Irodalmi áttekintés. Magyar Állatorvosok Lapja, 131. 411-416, 2009. **IF: 0.2**

Farkas R. és **Tánczos B.**: **A kutyák leishmaniosisa és jelentősége Európában**. Irodalmi áttekintés. Magyar Állatorvosok Lapja, 131, 304-312, 2009. **IF: 0.2**

Összes impakt faktor: 6,19

9.2. A témában tartott előadások

Farkas R., **Tánczos B.**, Király L., Dereure, J., Bongiorno, G., Maroli, M., Ready, P.D.: **Surveys for the presence and spatial distributions of canine leishmaniasis and its sandfly vectors (Diptera: Psychodidae) in Hungary**. International Conference EDEN, Montpellier, 10-12 May, 2010.p.39.

Farkas R, **Tánczos B**, Bongiorno G, Maroli M. **First record of autochthonous canine leishmaniasis and the sand fly vector *Phlebotomus neglectus* in Hungary**. 4th WorldCongress on Leishmaniasis. 03-07 February 2009, Lucknow, India. Abstract Book p. 88.

Farkas R, **Tánczos B**, Solymosi N, Király L, Bongiorno G, Dereure J, Maroli M, Ready P. **Exploratory surveys of canine leishmaniasis and its vectors in Hungary (2006- 2008)**. EDEN PhD and Annual Meeting. 12-16 January 2009, Marrakech, Morocco.

9.3. Egyéb közlemények referált folyóiratokban

Hornok S., Micsutka A., Fernández de Mera, I.G., Meli, M.L., Gönczi E., **Tánczos B.**, Mangold, A.J., Farkas R., Lutz H., Hofmann-Lehmann, R., de la Fuente, J.: **Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis**, Res. Vet. Sci., 92(1). 30-35, 2012. **IF: 1.649**

Demeter Z., Palade, E.A., Balogh E., Jakab Cs., Farkas R., **Tánczos B.**, Hornok S.: **Postmortem small babesia-like morphology of *Babesia canis* - short communication**, Acta. Vet. Hung., 59(4). 427-432, 2011. **IF: 0.673**

Hornok S, Hofmann-Lehmann R, Fernández de Mera IG, Meli ML, Elek V, Hajtós I, Répási A, Gönczi E, **Tánczos B**, Farkas R, Lutz H, de la Fuente J. **Survey on blood-sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection of *Anaplasma* and *Rickettsia* spp.** Veterinary Parasitology, 174: 355-358, 2010. **IF: 2.331**

Szénási Z, Marton S, Kucsera I, **Tánczos B**, Horváth K, Orosz E, Lukács Z, Szeidemann Zs. **Preliminary Investigation of the Prevalence and Genotype Distribution of *Giardia intestinalis* in Dogs in Hungary** . Parasitology Research Volume 101, Supplement 1. 2007. **IF: 1.473**

Szénási Z., Kovács A.H., Pampiglione, S., Fioravanti, M.L., Kucsera I., **Tánczos B.**, Tiszlavicz L.: **Human dirofilariosis in Hungary: an emerging zoonosis in central Europe**. Wien Klin Wochenschr. 120(3-4):96-102, 2008. **IF: 0.857**

Összes impakt faktor: 6,983

Teljes impakt faktor: 6,19 + 6,983 = 13,173

9.4. Egyéb poszter

Szénási Zs., Marton S., Kucsera I., **Tánczos B.**, Horváth K., Orosz E., Lukács Z., and Szeidemann Zs. (2007): **Preliminary Investigation of the Prevalence and Genotype Distribution of *Giardia intestinalis* in Dogs in Hungary**. From EPG to Genes. 21 th International Congress of WAAVP. 19-23 August 2007, Gent, Belgium. Proceedings 377. p.

10. Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek Dr. Farkas Róbertnek mondok köszönetet kutatómunkám anyagi, szakmai és infrastrukturális feltételeinek megteremtéséért. Tisztánlátásért, ami miatt tanácsait és találó, konstruktív kritikáját nagyra becsülöm. Köszönetet mondok a számos nagyszerű lehetőségért, amivel szakmai fejlődésemet mindig támogatni és gyorsítani igyekezett, végül el nem fogyó baráti jóindulatáért és türelméért, amivel botladozásaimat az úton viselte.

Köszönöm felbecsülhetetlen segítségét Gyurkovszky Mónikának, akinek mindig precíz és odaadó munkája nélkül e dolgozat eredményekben szegényebb és formailag rendezetlenebb lenne.

Köszönettel tartozom Kassai Tibor Professzor Úrnak bátorító szavaiért, és gazdag életében gyűjtött szakmai, emberi és előadói tapasztalatainak megosztásáért. Dr. Szénási Zsuzsannának, jóakarómnak, aki szakmai fejlődésemet jó szemmel fordította évekkel ezelőtt a ma is követett irányba. Köszönöm Balázs Istvánnénak mindig készséges segítségnyújtását.

Köszönöm támogató együttműködését az autochton leishmaniózis eset vizsgálataiban szerzőtársainknak, Dr. Király Lászlónak, Dr. Balogh Nándornak, Dr. Biksi Imrének és Dr. Szeredi Leventének.

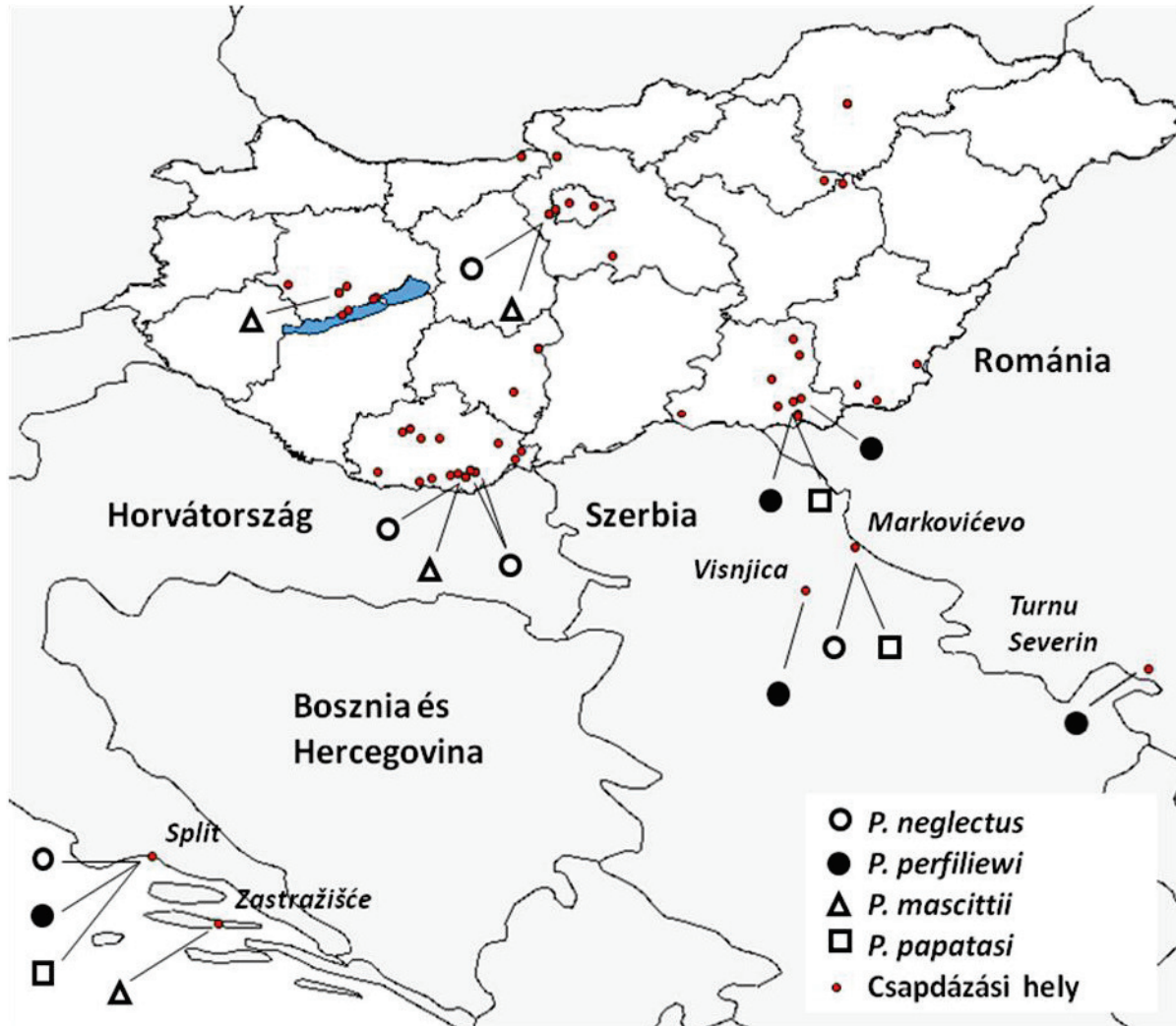
Köszönöm Marina Gramiccia-nak, Michele Maroli-nak, Gioia Bongiorno-nak, Aldo Scalone-nak, Jacquers Dereure-nek, Tatjana Zivicnjaknak, Paul Ready-nek és Yusuf Özbel-nek, hogy a lepkeszúnyogokkal és a kutyák leishmaniózisával kapcsolatos felbecsülhetetlen tapasztalataikat baráti természetességgel megosztották velünk, és hogy kutatómunkánkat tevőlegesen támogatták. Köszönet az EDEN (Emerging Diseases in a changing European eNvironment, GOCE-2003-010284) FP6-os program keretében kutatásainkhoz nyújtott anyagi támogatásért, és a tartalmas szakmai rendezvények megszervezéséért.

Köszönöm kitartó munkáját mindazoknak az állatorvosoknak, akik a kutyák vérmintáinak gyűjtésében segítségünkre voltak, és az együttműködését azoknak a kutyatulajdonosoknak, akik megengedték, hogy vérért vegyük féltett kedvenceiknek. Külön köszönet jár azoknak a bátor honfitársaiknak, akik, dacára ijesztő rovarfogó gépezeteinknek, nem féltek beengedni minket udvaraikba és istállóikba, s külön mindazoknak, akik még e csapdák szakszerű és lelkes kezelésében is kitüntették magukat.

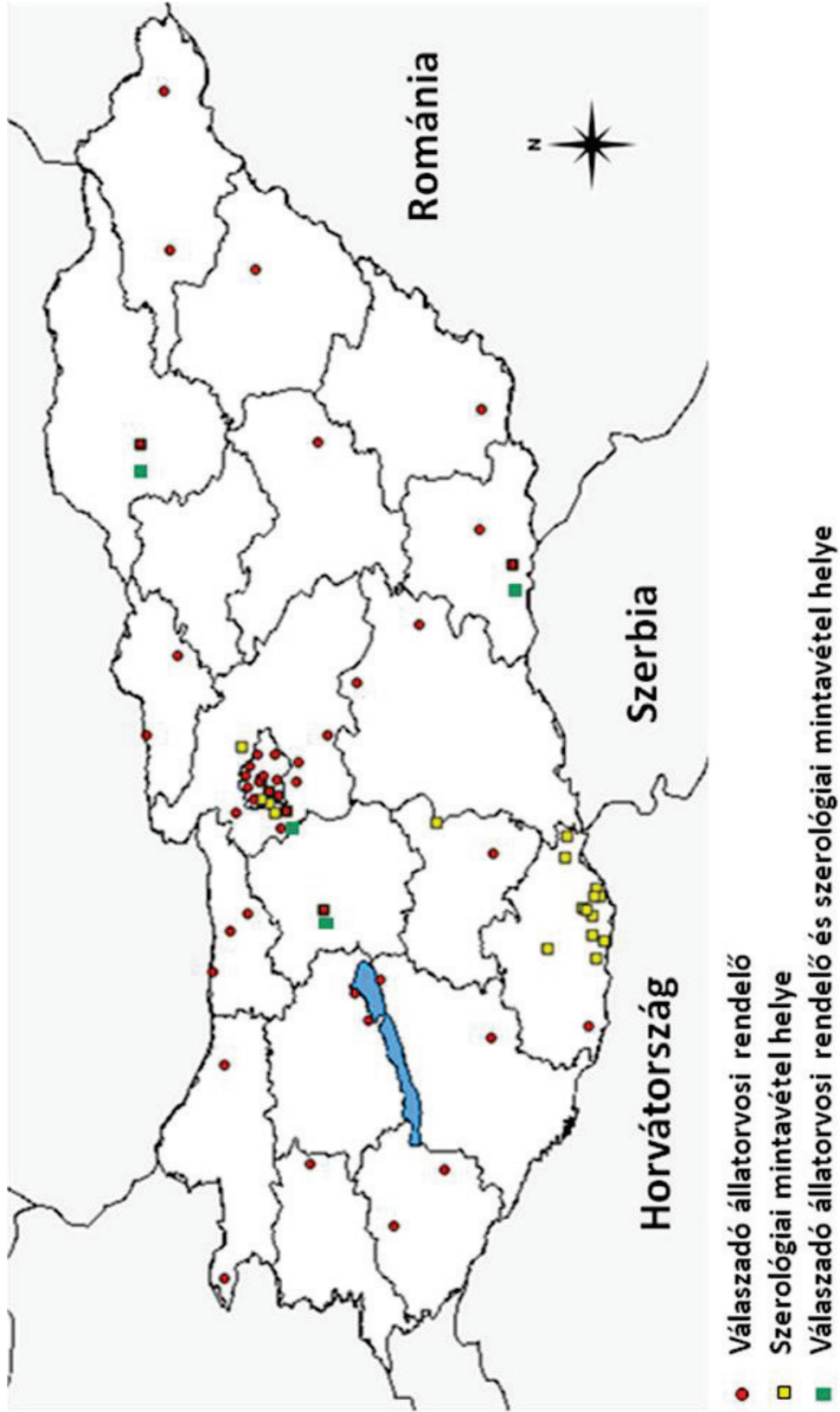
Végezetül, Családom tagjainak szeretném megköszönni, hogy munkám során mindvégig példás és szeretetteljes türelmet, (nemegyszer tevőleges) támogatást és kitartást nyújtottak. Szüleimnek és testvéremnek megköszönöm támogató szeretetüket, amivel választott hivatásomban megerősítettek, és amelyben, tudom, bármikor megbízhatok.

11. Mellékletek

1. melléklet Magyarországon folytatott entomológiai gyűjtések helyszínei, és az egyes helyszíneken csapdázott lepkeszúnyog fajok, továbbá e fajok elterjedésének északi határa a szomszédos országokban.



2. melléklet A magyarországi kutyák szerológiai vizsgálatának és a kutyák leishmaniózisával kapcsolatos kérdőíves felmérésnek a helyszíneit bemutató térkép.



3. melléklet Magyarország hat megyéjében elvégzett leishmania szerológiai vizsgálatok eredményei.

Megye	Helység	Mintagyűjtés ideje	Minta eredete ¹	Kutyák száma	IFAT pozitív kutyák száma ² (UM1, Franciaó.)	IFAT pozitív ² kutyák száma ² (SZIE, Budapest)
BAZ	Miskolc	2008. 06. 25.	klinika	12	NV	0
BAZ	Miskolc	2008. 08. 03.	menhely	31	NV	0
BAZ	Miskolc	2008. 08. 05.	menhely	24	NV	0
BAZ	Miskolc	2008. 08. 14.	menhely	50	NV	0
Pest	Budaörs	2008. 05. -	klinika	45	NV	0
Pest	Budaörs	2008. 09. -	klinika	23	NV	0
Pest	Budapest	2008. 07. 16.	menhely	15	NV	0
Pest	Budapest	2008. 11. 09.	klinika	87	NV	0
Pest	Bp. – ÁOTK ³	2008. 08. 07.	klinika	21	NV	0
Pest	Mogyoród	2007. 12. 10.	háznál	20	NV	0
Pest	Törökbálint	2008. 08. 08.	klinika	9	NV	0
Tolna	Paks	2008. 07. -	klinika	55	NV	0
Fejér	Székesfehérvár	2008. 09. 08.	menhely	20	NV	0
Pest	Érd	2008. 07. 01	menhely	30	NV	0

A 3. melléklet folytatása

Megye	Helység	Mintagyűjtés ideje	Minta eredete ¹	Kutyák száma	IFAT pozitív kutyák száma ² (UM1, Franciao.)	IFAT pozitív ² kutyák száma ² (SZIE, Budapest)
Baranya	Kovácskida	2007. 07. 05.	háznál	65	NV	0
Baranya	Homorúd	2006. 11. 17.	háznál	35	1 (2,85)	0
Baranya	Kisjakabfalva	2006. 11. 06.	háznál	5	0	0
Baranya	Kislippo	2006. 11. 03.	háznál	10	1 (10,00)	0
Baranya	Lapáncsa	2006. 11. 03.	háznál	10	0	NV
Baranya	Magyarbóly	2006. 11. 03.	háznál	15	0	NV
Baranya	Matty	2006. 11. 18.	háznál	16	0	0
Baranya	Mohács	2006. 11. 17.	menhely	46	0	0
Baranya	Nagyharsány	2006. 11. 06.	háznál	20	0	0
Baranya	Pécs	2006. 11. 15.	klinika	7	0	NV
Baranya	Siklós	2006. 11. 27.	klinika	11	0	0
Baranya	Villánykövesd	2006. 11. 06.	háznál	9	0	0
Csongrád	Szeged	2006. 11. 18.	klinika	14	0	NV

¹menhely = kutyamenhelyen, klinika= állatorvosi praxis, háznál= háznál vett vér; ² Pozitív = 1:80 vagy magasabb; NV = nem végeztük el.

³ÁOTK = Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Kisállatklinika

4./a melléklet A kutyák leishmaniózisával kapcsolatos kérdőív

KUTYÁK LEISHMANIOSISÁVAL KAPCSOLATOS KÉRDŐÍV

1. Állatorvos neve:

telefon:

mobil:

email:

Rendelő címe:.....

Hetente vizsgált kutyák átlagos száma

 1-10 11-20 21-30 >31

4. Előfordult-e olyan kutya, amelyet külföldről hoztak be, vagy külföldön tartózkodott hosszabb-rövidebb ideig?

 igen nem**Ha igen, ezek száma/év** 1-5 6-10 11-20 >21

Honnét hozták be?/Hol tartózkodott?

Görögország Olaszország Portugália Horvátország Franciaország Törökország Szerbia Spanyolország

Egyéb:.....

5. Felvetődött-e bármelyik kutyánál a *Leishmania-fertőzöttség* gyanúja az elmúlt években? igen nem**Ha igen, jelölje be, hogy mely tünet(ek) alapján gondolt erre?** anémia körülírt szőrhullás túlnőtt körmök fekélyek orrvérzés szemelváltozások lépmegnagyobbodás nyirokcsomók duzzanata egyéb:.....

6. A rendelőjében kezelt kutyák között diagnosztizáltak-e korábban leishmaniosist?

 igen nem**Ha igen,**

Hol?.....

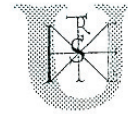
Mikor?.....

Milyen módszerrel?

Egyéb megjegyzések:

4/b. melléklet A kutyák leishmaniózisával kapcsolatos kérdőív

SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR



PARAZITOLÓGIAI ÉS ÁLLATTANI TANSZÉK

1078 Budapest, István u. 2
1400 Budapest, Pf. 2.

tel.: 478-4190
fax: 478-4193

Tisztelt Kolléganő/Kolléga!

A környezeti tényezők és az életmód változásával összefüggésben több európai országban izeltlábú vektorok terjesztette, eddig ismeretlen kórokozók jelentek meg, illetve az ismertek terjedése figyelhető meg, amelyek között számos állat- és közegészségügyi jelentőséggel bíró faj is előfordul. Ezzel magyarázható, hogy az EU anyagi támogatásával ilyen kórokozók intenzív kutatása folyik 25 országot magába foglaló projekt keretében. Az egyik alprogram a *Leishmania infantum* európai jelentőségét kutatja, amelyről tudott, hogy a Földközi-tenger melléki országokban élő kutyák és emberek körében régóta jelen van. E témakörrel foglalkozó kutatócsoport tagjaként itthon is vizsgálatokat végzünk annak kiderítésére, hogy vajon hazánkban is előfordulnak-e olyan lepkeszúnyog-fajok, amelyek az említett parazitafaj terjesztésében szerepet játszanak. Arra is választ keresünk, hogy tünetmentesen fertőzött kutya bekerülhet-e az országba, amely alkalmas vektor(ok) esetén a bántalom autochton megjelenéséhez és terjedéséhez vezet a hazai kutyák körében, és emiatt ezek környezetében élő emberek is fertőződhetnek.

A kutatási program keretében a résztvevő országokban kérdőíves felméréssel is vizsgáljuk a kutyák leishmaniosisát. **Tisztelettel arra kérek, hogy a mellékelt kérdőívet a legjobb tudásod szerint szíveskedjél kitölteni, és a válaszborítóban legkésőbb 2008. június 15-ig visszaküldeni.**

Amennyiben a bántalom gyanúja vetődik fel az általad kezelt kutyák között, úgy ingyenes szakmai segítségünket ajánlom fel. Előzetes egyeztetés után a beküldött EDTA-s vérminta, savó, nyirokcsomóból vagy bőrből vett bioptátum hagyományos parazitológiai, szerológiai és molekuláris biológiai vizsgálatával tudjuk segíteni munkádat.

Szakmai segítségedet ezúton is köszönve kollegiális tisztelettel:

(Dr. Farkas Róbert)

tanszékvezető egyetemi tanár

5 melléklet. A szem, a bőr és a körmök elváltozásai 4 éves nőtény mopszon (saját készítésű fényképek, 2008)



Megfigyelhetők a szem, az orrtükör és a stop bőrredőjének fekélyes elváltozásai (felül), továbbá a körmök rendellenes túlnövekedése a mellső lábakon (alul)

6. melléklet Magyarország öt megyéjében ragacosos lapokkal végzett lepkeszűnyog-gyűjtések eredményei

Megye	Legközelebbi település	Helyszín ^{1,2}	Kihelyezés ideje	Kihelyezett lapok száma	P. neglectus (H, N)	P. mascittii (H, N)
Komárom-Esztergom	Esztergom	Határ ÁH	2009.07.30-08.01.	8	0	0
Veszprém	Aszófó	Belül UF	2008.07.03-05.	4	0	0
"	Balatonszepezd	Belül UF	"	18	0	0
"	Kapolcs	Határ/ belső UF	2008.08.10-12.	38/ 46	0	0
"	"	Határ UF	2008.08.13-15.	38	0	4, 3
"	Örvényes	Belül UF	2008.07.03-05.	12	0	0
"	Pula	Belül UF	2008.08.10-12.	23	0	0
"	Révfülöp	Belül UF	2008.07.03-05.	10	0	0
Pest	Budaörs	Belül ÁH/ Határ KB	2008.09.04-06.	19/ 24	0	0
"	Budapest	Határ UF	2009.08.27-29.	96	0	0
"	Dabas	Belül ÁH	2009.08.30-09.03.	15	0	0
"	Visegrád	Határ ÁH	2009.05.02-05.	8	0	0
"	"	Határ E	2009.08.01-07.	8	0	0
Tolna	Paks	Belül / Határ ÁH	2008.08.29-09.03.	29/ 24	0	0
"	"	Belül ÁH	2009.08.14-29.	23	0	0
"	"	Határ UF	2009.08.05-10.	7	0	0

Megye	Legközelebbi település	Helyszín ^{1,2}	Kihelyezés ideje	Kihelyezett lapok száma	P. neglectus (H, N)	P. mascittii (H, N)
Baranya	Bükkösd	Határ ÁH	2006.07.15-18.	17	0	0
"	Hetvehely	Belül ÁH	2006.07.15-18.	15	0	0
"	Kölked	Belül UF	2007.07.04-08.	18	0	0
"	Kővágószőlős	Belül UF	2006.07.15-18.	6	0	0
"	Nagyharsány	Belül UF	"	15	1, 2	0
"	"	Belül UF	2007.07.05-07.	40	1, 0	0
"	"	Belül UF	2008.08.01-04.	21	0	0
"	"	Között KB	2007.07.05-07.	20	0, 1	0
"	"	Között KB	2007.08.07-09.	14	2, 0	0
"	"	Között KB	2008.08.01-04.	31	0	0
"	Nagytótfalu	Belül UF	2006.07.15-18.	6	0	0
"	Pécs	Belül UF	"	14	0	0
"	Riha	Között ÁH	2007.07.02-05.	5	0	0
"	Sellye	Belül UF	2007.07.04-08.	60	0	0
"	Siklós	Belül UF	2006.07.15-18.	11	0	0
"	Székelyszabar	Között ÁH	"	12	0	0
"	Villány	Között UF	"	8	0	0
Csongrád	Fábiánsebestyén	Határ/ Határ ÁH	2009.08.28-09.01.	11/8	0	0
"	Földeák	Között	"	20	0	0
"	Hódmezővásárhely	Belül / Belül / Határ ÁH	2009.08.12-14.	16/5/17	0	0

Megye	Legközelebbi település	Helyszín ^{1,2}	Kihelyezés ideje	Kihelyezett lapok száma	P. neglectus (H, N)	P. mascittii (H, N)
Csongrád	Makó	Belül ÁH	2009.08.12-14.	11	0	0
"	Makó-Igás	Között ÁH	2009.08.28-09.01.	9	0	0
"	Maroslele	Határ/ Határ ÁH	2009.08.12-14.	18/ 21	0	0
"	Nagymágocs	Belül ÁH	2009.08.28-09.01.	11	0	0
"	Ófőideák	Között ÁH	"	8	0	0
Total [H, N]				918 / 42	7	7
					[4, 3]	[4, 3]

¹ Településen **belül**, annak **határán**, vagy két település **között**. ² ÁH = állattartó hely; UF= útmenti fal; KB = kőbánya; E= erdő

7. melléklet Hazánk nyolc megyéjében CDC és MMX csapdákkal végzett lepkeszűnyog gyűjtések eredményei.

Megye	Legköze-lebbi település	Csapdázási módszer ¹	Helyszín ²	Csapdázás ideje	Csapdázási éjszakák száma ³	P. neglectus (H, N)	P. perfliewi (H, N)	P. mascittii (H, N)	P. papatasi (H, N)
Komárom-Esztergom	Esztergom	CDC ÁH	Határ	2009.07.30–08.01.	3	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH / ÁH	Határ/ Határ	2009.08.19–27.	9/9	0	0	0	0
Heves	Poroszló	CDC ÁH	Belül / Belül	2009.08.20–22.	3/3	0	0	0	0
BAZ	Miskolc	MMX KM	Határ	2008.08.11–13.	6	0	0	0	0
"	Kapolcs	CDC/ MMX ÁH	Határ	2008.08.13–15.	6/6	0	0	0	0
"	"	CDC/ MMX ÁH	Belül	2008.08.13–14.	1/1	0	0	0	0
"	Sümege	CDC ÁH	Határ	2009.08.01–09.04.	35	0	0	0	0
Pest	Budaörs	CDC / MMX KB	Határ	2008.09.04–06.	1/3	0	0	0	0
"	"	CDC/ MMX ÁH	Belül	"	3/3	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH	Belül	2009.07.30–31.	2	0	0	0	0
"	Budapest	CDC K	Belül	2009.08.08–10.	3	0	0	0	0
"	Dabas	CDC ÁH	Belül	2009.08.30–09.03.	5	0	0	0	0
"	Törökbálint	CDC K	Belül	2007.06.05–06.	2	2,0	0	0	0,1
"	"	CDC K	Belül	2008.08.19.	1	0	0	0	0
"	"	CDC/ MMX K	Belül	2008.09.05–06.	2/1				

A 7. melléklet folytatása									
Megye	Legközelebbi település	Csapdázási módszer ¹	Helyszín ²	Csapdázás ideje	Csapdázási éjszakák száma ³	P. neglectus (H, N)	P. perfliewi (H, N)	P. mascittii (H, N)	P. papatasi (H, N)
Pest	Törökbálint	CDC K	Belül	2009.07.04–08.02.	9	0	0	0	0
"	"	CDC K	Belül	2009.08.19–25.	3	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH	Belül/ Belül	2009.05.23–24.	1/3	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH	Belül	2009.06.09.	1	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH/ ÁH	Belül / Belül	2009.07.14–16.	1/2	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH/ ÁH	Belül / Belül	2009.08.01–05.	2/2	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH	Belül	2010.07.17-18.	2	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH	Belül	2010.07.23.	2	0	0	0	0
"	Visegrád	CDC ÁH/ K	Határ	2009.05.02–04.	3/3	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH/E	Határ	2009.07.30–08. 01.	6/3	0	0	0	0
"	"	CDC E	Kívül	2009.07.25.	1	0	0	0	0
"	"	CDC E	Kívül	2009.08.15–16.	2	0	0	0	0
"	"	CDC E	Kívül	2010.06.25-26.	6	0	0	0	0
Tolna	Paks	CDC/ MMX ÁH	Belül	2008.08.14–09.03.	18/ 15	0	0	0	0
"	"	CDC/ MMX ÁH	Határ	2008.08.29–09. 03.	6/6	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH	Belül/ Belül	2009.08.05–10.	5/5	0	0	0	0

A 7. melléklet folytatása									
Megye	Legközelebbi település	Csapdázási módszer ¹	Helyszín ²	Csapdázás ideje	Csapdázási éjszakák száma ³	P. neglectus (H, N)	P. perfliewi (H, N)	P. mascittii (H, N)	P. papatasi (H, N)
Tolna	Paks	CDC ÁH	Határ	2009.08.11–09.01.	22	0	0	0	0
"	Szekszárd	CDC KM	Határ	2009.08.05–10.	5	0	0	0	0
Baranya	Kovácskida	CDC ÁH	Belül	2007.07.03–04.	2	0	0	0	0
"	Nagyharsány	MMX KB	Kívül	2007.08.27–28.	2	1, 5	0	0	0
"	"	CDC KB	Kívül	2008.08.01–03.	6	35, 25	0	0	0
"	"	MMX KB	Kívül	2008.08.01–03.	6	28, 36	0	0	0
"	"	CDC / MMX KB	Kívül	2010.07.09.	1	52, 16	0	0	0
"	"	CDC / MMX KB	Kívül	2010.08.23–26.		1, 5			
"	Riha	CDC ÁH	Kívül	2007.07.02–03.	2	0	0	0	0
"	Szaporca	CDC ÁH	Kívül	2006.07.17–18.	2	0	0	0	0
"	Villánykövesd	CDC ÁH	Belül	2006.07.16–17.	4	1, 2	0	0	0
Baranya	Villánykövesd	CDC / MMX ÁH	Belül	2008.08.01–03.	3/3	3, 4	0	0, 1	0
"	"	CDC ÁH	Belül	2010.07.09.	1	0, 1	0	0	0
"	"	MMX ÁH	Belül	"	1	1, 2	0	0	0
Csongrád	Ásotthalom	CDC ÁH	Kívül	2010.08.11–13.	6	0	0	0	0

A 7. melléklet folytatása									
Megye	Legközelebbi település	Csapdázási módszer ¹	Helyszín ²	Csapdázás ideje	Csapdázási éjszakák száma ³	P. neglectus (H, N)	P. perfliewi (H, N)	P. mascittii (H, N)	P. papatasi (H, N)
Csongrád	Fábiánsebestyén	CDC ÁH	Határ / Határ	2009.08.28–09.01.	5/5	0	0	0	0
"	Földeák	CDC K	Belül	"	5	0	0	0	0
"	"	CDC FT	Kívül	"	10	0	89, 182	0	0
"	"	CDC FT	Kívül	2010.08.11-13.	9	0	2, 6	0	0
"	Hódmezővásárhely	CDC ÁH	Belül/ Belül/ Határ	2009.08.12–14.	3/ 3/ 3	0	0	0	0
"	Makó	CDC ÁH	Belül	"	3	0	0	0	0
"	Makó-Igás	CDC ÁH	Kívül	2009.08.28–09.01.	5	0	0	0	0
"	Maroslele - 1	CDC ÁH	Határ	2009.08.12–14.	3	0	37, 46	0	0, 1
"	Maroslele - 1	CDC ÁH	Határ	2010.08.11-13.	3	0	4, 1	0	0
"	Maroslele - 2	CDC ÁH	Határ	"	3	0	0	0	0
"	Nagymágocs	CDC ÁH	Belül	2009.08.28–09.01.	5	0	0	0	0
"	Óföldeák	CDC ÁH	Kívül	"	5	0	0	0	0
Békés	Mezőkovácsháza	CDC ÁH	Belül	2010.08.11-13.	6	0	0	0	0
"	Elek	CDC ÁH	Határ	"	6	0	0	0	0

A 7. melléklet folytatása									
Megye	Legközelebbi település	Csapdázási módszer ¹	Helyszín ²	Csapdázás ideje	Csapdázási éjszakák száma ³	P. neglectus (H, N)	P. perfliewi (H, N)	P. mascittii (H, N)	P. papatasi (H, N)
Békés	Battonya	CDC ÁH	Határ	2010.08.11-13.	6	0	0	0	0
"	"	CDC ÁH	Kívül	"	3	0	0	0	0
Total					370/ 52⁴	220	367	2	1
[H, N]					[124, 96]	[132,235]	[0, 2]	[0, 1]	

¹ CDC = CDC Miniature Light trap; MMX = Mosquito Magnet X; ÁH = állattartó hely; KM = kutyamenhely; K = kert; FT = fácánnevelő telep; KB = Kőbánya; E = Erdő; ² Településen **belül**, annak **határán**, vagy településen **kívül**. ³ Csapdázási éjszakák száma helyszínenként ⁴ csapdázási éjszakák száma / helyszínek száma

8. melléklet: Különböző fajú nőstény lepkeszúnyogok cibáriumának morfológiája (felül), és a hímek edeguszának szerkezete (alul) (Forrás: Lewis 1982 nyom.)

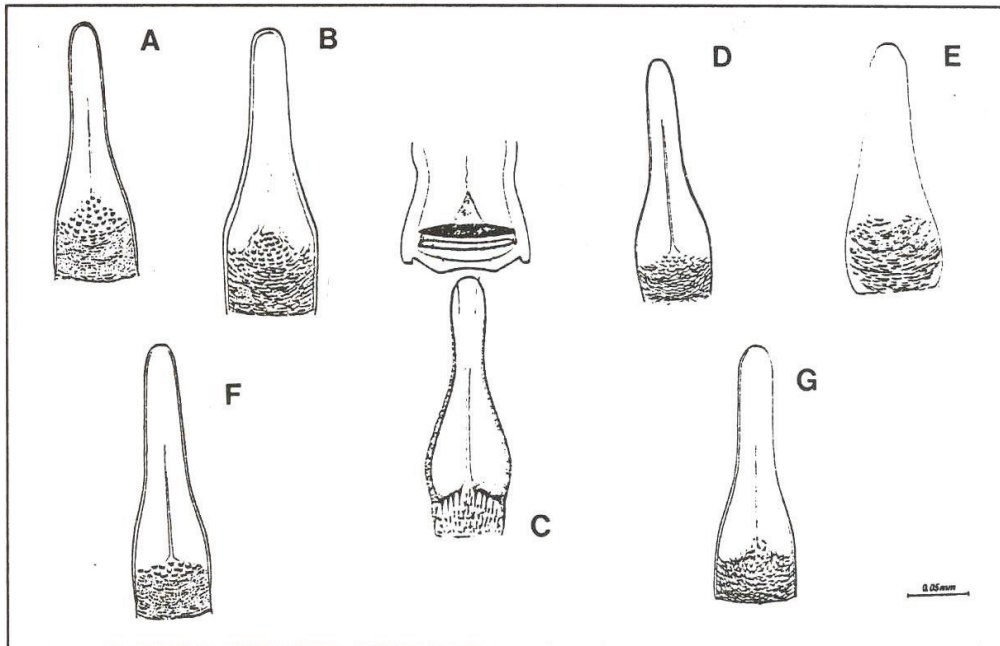


Fig. 11. Armatura faringea: A) *P. perniciosus*; B) *P. major*; C) *S. minuta*; D) *P. papatasi*; E) *P. ariasi*; F) *P. perfiliewi*; G) *P. mascittii*.

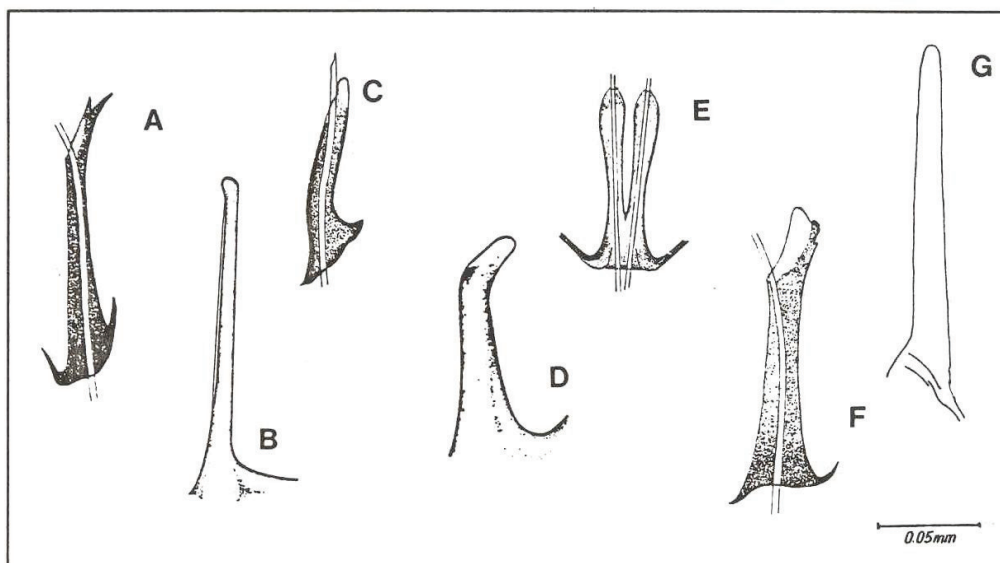


Fig. 12. Valve copulatrici delle specie italiane: A) *P. perniciosus*; B) *P. major*; C) *S. minuta*; D) *P. papatasi*; E) *P. ariasi*; F) *P. perfiliewi*; G) *P. mascittii*.

9. melléklet Különböző fajú nőstény lepkeszúnyogok ivarútjainak és spermatékájának alakulása (Forrás: Lewis 1982 nyomán)

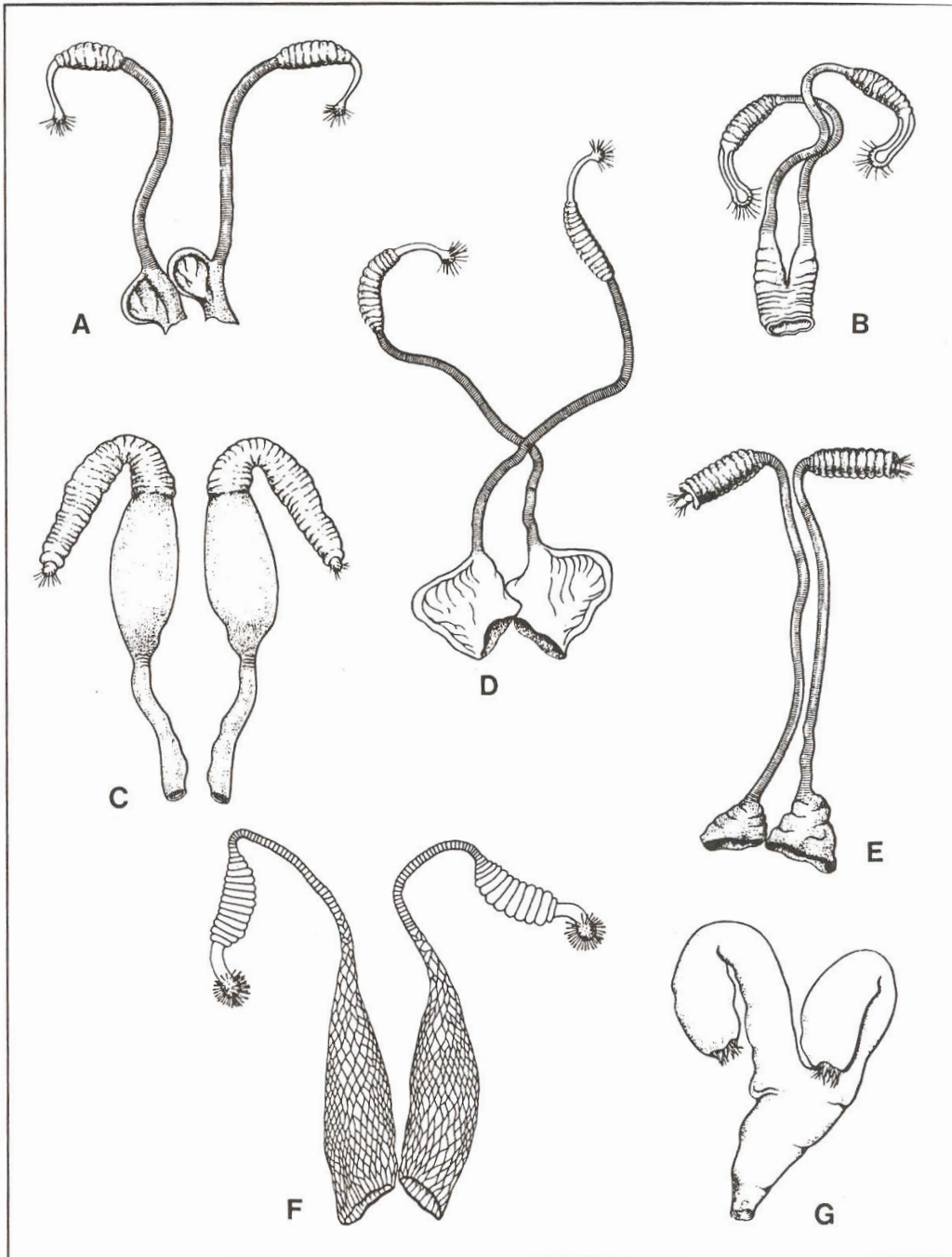


Fig. 13. Struttura delle spermateche: A) *P. perniciosus*; B) *P. major*; C) *P. mascittii*; D) *P. perfiliewi*; E) *P. papatasi*; F) *P. ariasi*; G) *S. minuta*.

10. melléklet Különböző fajú hím lepkeszúnyogok hipopigiumának morfológiája
(Forrás: Lewis 1982 nyomán)

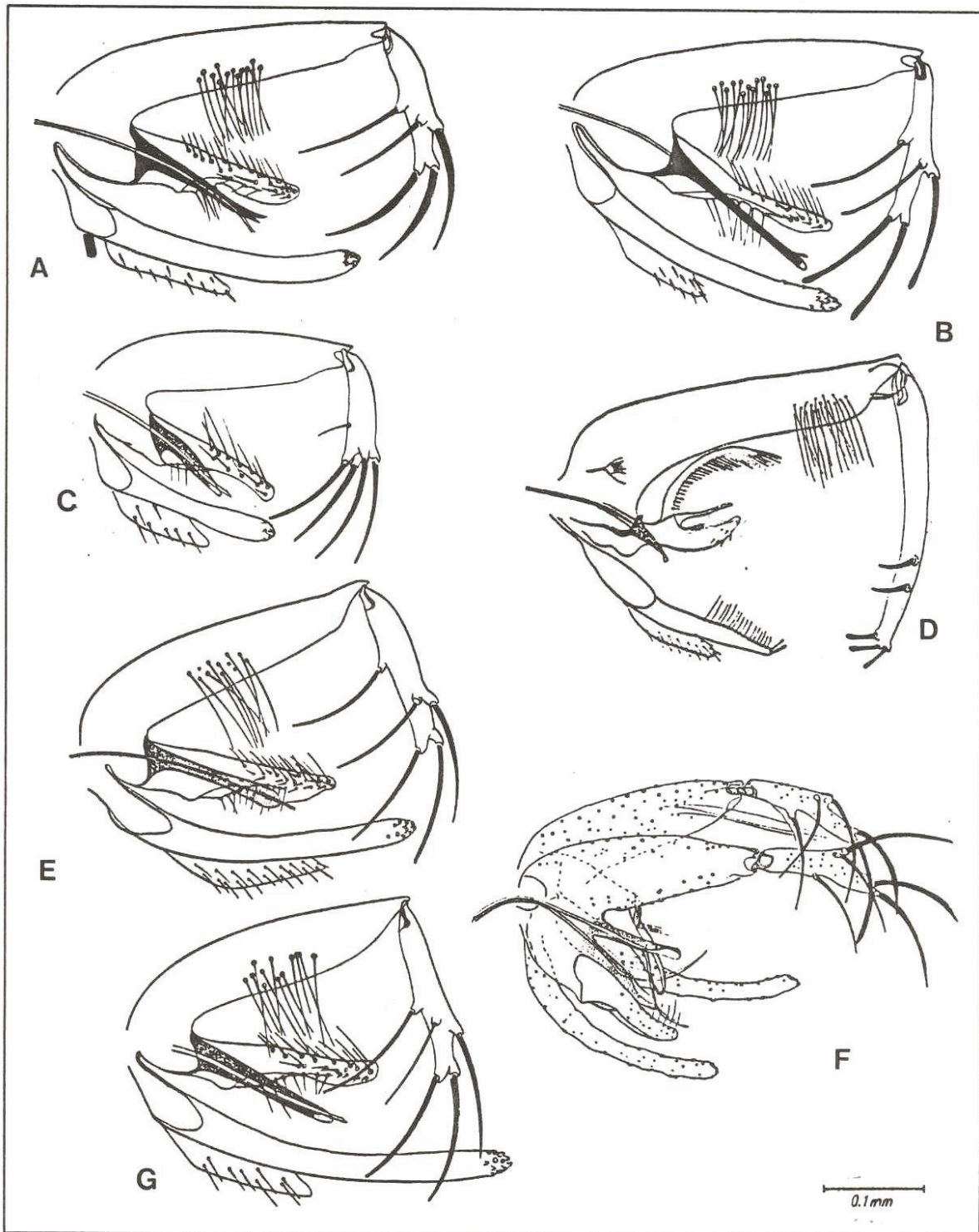


Fig. 14. Ipopigio delle specie italiane: A) *P. perniciosus*; B) *P. major*; C) *S. minuta*; D) *P. papatasi*; E) *P. ariasi*; F) *P. perfiliewi*; G) *P. mascittii*.

11. melléklet. A paksi kennek kutyaínak vizsgálataikor kapott eredmények

Kutya azonosítója	FluoLeish IFAT kit	Római ISS IFAT	kDNS PCR ¹	ssu rDNS n-PCR ¹
P01	NV*	NV*	pozitív (máj, lép, nycs. ²)	pozitív (máj, lép, nycs. ²)
P02	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P03	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P04	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P05	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P06	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P07	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P08	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P09	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P10	neg	pozitív (1:80)	neg (BC)	pozitív (BC)
P11	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P12	pozitív (1:5120)	pozitív (1:5120)	pozitív (BC, nycs.)	pozitív (BC, nycs.)
P13	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P14	neg	neg	neg (BC)	pozitív (BC)
P15	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P16	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P17	neg	pozitív (1:80)	neg (BC)	neg (BC)
P18	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P19	neg	neg	neg (BC)	neg (BC)
P20	neg	pozitív (1:160)	neg (BC)	neg (BC)

¹ kDNS PCR: kinetoplast DNS specifikus PCR; ssu rDNS n-PCR: A riboszomális kis alegység (angolul: small subunit) lokuszára specifikus nested PCR reakció; ² nycs.: nyirokcsomó; NV= nem vizsgált; neg=negatív; BC= blood buffy coat. * Az IDEXX-VetMedLabor-ban elvégzett IFAT vizsgálat: titer 1:3200

12. Summary

Leishmania (L.) infantum is a unicellular parasite causing systemic disease of dogs and humans in the European Mediterranean. In the endemic regions leishmaniasis is considered to be the main dog killer (Moreno and Alvar, 2002). Infected animals that can stay inapparent for years, are often imported into non-endemic countries (Molina et al., 1994). *Leishmania infantum* is transmitted by its biological vectors, the females of certain phlebotomine sandfly species. Geographical distribution of the parasite and its vectors is mainly affected by the climate and several minor environmental factors (e.g. landuse) (Ready, 2010). Recent changes in these factors are thought to take responsibility for the ongoing spread of *L. infantum* and vector sandflies to non-endemic countries on our continent (Naucke és Schmidt, 2004; Maroli et al., 2008). Hungary, traditionally regarded to be non-endemic, is threatened by the spread of the parasite and the vectors due to its position adjacent to endemic countries. Until recently a single case of imported canine infection (Magdus, 2004) and few dozen imported human cases (Várnai et al., 1985; Fried et al., 2003) were known in Hungary. Specimens of phlebotomine sand flies with leishmania-vector competence were trapped in the south-eastern part of the country in the early 1930' (Szentkirályi and Lőrincz, 1933) but since then no further investigations took place in this topic.

During our trials we were searching for the answer whether in-apparently infected dogs or vector phlebotomine sandflies were present in the country. We sampled and examined with *L. infantum* antigen specific serological tests the blood of 705 rural dogs in several counties, but we couldn't detect any infested animals. A questioner was prepared and sent to 216 Hungarian veterinary practitioners or clinics. In that we asked the colleagues for informations about imported cases of canine leishmaniasis that might occur in their praxis. Eight imported cases have been revealed that way. Different types of traps were applied to collect sandflies in several parts of the country. *Phlebotomus (P.) perfiliewi* was collected near to the historical capture sites, while an another species with vector competence, *P. neglectus* was detected for the first time in Hungary in a south-western county. Two additional sandfly species *P. mascitti* and *P. papatasi* have been collected for the first time in the country, but these are not the vectors of *L. infantum* (Farkas et al., 2011). By the comparative phylogenetic analysis of specimens of *P. perfiliewi* and *P. neglectus* collected by us and by cooperative researchers in foreign countries we demonstrated the partly isolated nature of Hungarian sandfly populations. Presence of leishmania-vector sandfly species in the country is of moderate epidemiological importance in our opinion, however, they are able to transmit imported parasites to naïve dogs and humans

In the course of our trials we recognized the first most probably autochthonous cases of canine leishmaniosis in Hungary, in the very center of the country, however the roots of infection remained unclear as we were unable to demonstrate the presence of phlebotomine sand fly species in the area (Tánczos et al., 2012).