

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS
ZOOLOGIJOS KATEDRA**

DIANA SINKEVIČIŪTĖ

Biologija

Baigiamasis bakalauro darbas

**KAI KURIŲ RŪŠIŲ SPARVŲ (DIPTERA: TABANIDAE) VAIDMUO LIGŲ
SUKĖLĖJŲ PERNEŠIME**

Leidžiama ginti _____
(parašas)

Studijų programos pirmininkas

(vardas, pavardė)

Studentas _____
(parašas)

Darbo vadovė doc. dr. Jurga Turčinavičienė

(parašas)

Darbo konsultantas doc. dr. Rasa Bernotienė

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Darbas įvertintas _____
(data, įvertinimo balas, komisijos pirmininko
parašas)

Vilnius, 2021

TURINYS

IVADAS	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA	5
1.1. Tabanidae šeimos sistematika	5
1.2. Tabanidae hematofagija ir ligų sukėlėjų pernešimas.....	8
1.3. Afrikinio kiaulių maro virusas.....	10
1.4. <i>Trypanosoma</i> genties protistai vabzdžiuose	12
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	15
2.1. Vabzdžių surinkimas	15
2.2. Tabanidae šeimos rūšių identifikavimo tyrimų metodika	15
2.3. DNR išskyrimas.....	16
2.4. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR).....	17
2.4.1. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) Afrikinio kiaulių maro viruso DNR nustatyti ..	17
2.4.2. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) <i>Trypanosoma</i> sp. DNR nustatymui.....	19
2.4.3. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) vabzdžių identifikavimo patvirtinimui.....	21
2.5. Gelio elektroforezė	21
2.5.1. Agarozės gelio ruošimas	22
2.5.2. Elektroforezė	22
2.5.3. Elektroforezės rezultatų gavimas	23
2.6. Sekų analizė.....	23
2.7. Statistinė analizė	23
3. REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ	24
3.1. Tabanidae šeimai priklausančių rūšių morfologinis identifikavimas	24
3.2. Tabanidae šeimos rūšių analizė	26
3.3. Afrikinio kiaulių maro viruso DNR Tabanidae šeimos vabzdžiuose analizė.....	28
3.4. <i>Trypanosoma</i> sp. DNR Tabanidae šeimos vabzdžiuose analizė	29
3.5. <i>Trypanosoma</i> sp. DNR sekų filogenetinė analizė	33
IŠVADOS	38
SANTRAUKA	39
SUMMARY	40
LITERATŪROS SĄRAŠAS	41

IVADAS

Nariuotakojai vaidina svarbų vaidmenį ligų sukėlėjų pernešime. Kraują siurbiantys, hematofaginiai nariuotakojai, maitinimosi metu perneša skirtingus virusus, bakterijas, pirmuonius ar nematodus. Ligų sukėlėjų pernašoje dalyvaujantys nariuotakojai yra vadinami vektoriais. Tokių nariuotakojų pernešamų patogenų išplitimas daro didžiulę įtaką naminių ir laukinių gyvūnų bei žmogaus sveikatai (Hurd, 2019; Berenger, Parola, 2017), nes pasaulyje didėja nariuotakojų platinamų ligų skaičius. Per pastaruosius dešimtmečius vektorių pagalba geografiškai toli nuo savo endeminių regionų išplito įvairus ligų sukėlėjai. Kai kurios ligos kelia problemas tik tam tikruose, specifiniuose regionuose, tačiau kitos, plačiau išplitusios – laikomos globaliomis, visuotinėmis problemomis (Gratz, 1999). Siekiant kovoti su ligų sukėlėjų keliamomis problemomis, sustabdyti jų plitimą, yra ypač svarbu identifikuoti ligas sukeliančius patogenus ir juos pernešančius vabzdžius – vektorius.

Dauguma Tabanidae šeimos vabzdžių (angl. *horseflies*, *deerflies*) yra kosmopolitai, paplitę beveik visuose pasaulio žemynuose, prisitaikę gyventi įvairiomis aplinkos sąlygomis. Visa tai suteikia galimybę šiems vabzdžiams platinti patogenus. Tabanidae šeimos vabzdžių patelės yra kraujasiurbės ir gali atlikti įvairių ligų sukėlėjų mechaninių arba biologinių vektorių vaidmenį. Maitinimosi metu šios musės gali pernešti ligų sukėlėjus nuo užsikrėtusių, sergančių šeiminių į naujus, sveikus, bet ligoms imlius šeiminius (Sasaki, 2001; Baldacchino *et al.*, 2014; Chainey, 1993).

Potencialus ligų sukėlėjai, kuriuos galėtų pernešti Tabanidae šeimos atstovai, yra Afrikinio kiaulių maro (AKM) virusas ir *Trypanosoma* genties protistai. Yra atlikta nemažai tyrimų, kurie patvirtina Tabanidae šeimos vaidmenį *Trypanosoma* sp. atstovų pernešime (Baldacchino *et al.*, 2014). Nors ir nėra atlikta tyrimų, kurie patvirtintų Afrikinio kiaulių maro viruso pernešimą Tabanidae vabzdžių pagalba, vis didesni šio viruso keliamos ligos protrūkiai skatina nagrinėti kraujasiurbių vabzdžių, kaip potencialių vektorių, vaidmenį viruso platinime (Olesen *et al.*, 2018).

Šio darbo metu pasitelkus morfologinius ir molekulinės biologijos metodus buvo identifikuotos Tabanidae šeimos rūšys ir įvertintas skirtingų šios šeimos vabzdžių rūšių vaidmuo pernešant Afrikinio kiaulių maro virusą ir *Trypanosoma* sp. protistus Lietuvos Respublikos teritorijoje.

Darbo tikslas – Nustatyti Tabanidae šeimai priklausančių vabzdžių vaidmenį kai kurių ligų sukėlėjų pernešime.

Darbo tikslui pasiekti išsikelti **uždaviniai**:

1. Išanalizuoti literatūros šaltinių duomenis apie Afrikinio kiaulių maro viruso ir *Trypanosoma* genties parazitų paplitimą Tabanidae šeimos vabzdžiuose;
2. Panaudojant morfologinius ir molekulinės biologijos metodus, apibūdinti vabzdžius iki rūšies lygmens;

3. Nustatyti Afrikinio kiaulių maro viruso DNR Tabanidae šeimos vabzdžiuose;
4. Nustatyti *Trypanosoma* sp. DNR Tabanidae vabzdžiuose ir palyginti gautas sekas su duomenų bazėje esančiomis sekomis;
5. Įvertinti analizuojamų ligų sukėlėjų paplitimą skirtingose Tabanidae šeimos rūšyse.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei doc. dr. Jurgai Turčinavičienei už pagalbą, naudingus patarimus, pastabas bei suteiktas žinias rengiant šį baigiamąjį bakalauro darbą. Taip pat norėčiau padėkoti doc. dr. Rasai Bernotienei už pagalbą, patarimus ir konsultavimą atliekant morfologinius tyrimus darbo rengimo metu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Tabanidae šeimos sistematika

Tabanidae šeima yra plačiai paplitusi Diptera būrio vabzdžių šeima, susidedanti iš daugiau nei 4400 rūšių, pasiskirsčiusių 144 gentyse. Tai bene daugiausiai aprašytų rūšių turinti kraują siurbiančių Diptera vabzdžių šeima. Brachycera musių grupei priklausančios šios šeimos vabzdžiai yra kosmopolitai, t.y. paplitę beveik visame pasaulyje, prisitaikę prie skirtingų klimato, gamtos sąlygų, kolonizavo įvairias buveines, tokias kaip miškai, ganyklos ar pelkes, teritorijas skirtinguose aukščiuose. Šeimos atstovai aptinkami visuose pasaulio žemynuose, išskyrus Antarktidą (Mullens, 2019; Baldacchino *et al.*, 2017). Visgi, nepaisant plataus geografinio šios šeimos išplitimo, ekonominės ar medicininės svarbos, Tabanidae taksonomija, filogenija nėra galutinai aiški, vieninga.

Nors tai ir viena didžiausia įvairovę pasižyminti kraujasiurbių vabzdžių šeima, visgi, Tabanidae filogenija nebuvo labai išsamiai ištirta naudojant molekulinis duomenis (Morita *et al.*, 2016). Šiais laikais nagrinėjant ir skirstant Tabanidae šeimos individus, dažniausiai yra pritaikoma, remiamasi zoologo Ian Murray Mackerras klasifikacija (Mackerras, 1954). Pagal šią klasifikaciją Tabanidae šeima suskirstoma į 3 pošeimius ir kiekvienam pošeimiui priklausančias tribas: Tabaninae (Diachlorini, Haematopotini, Tabanini), Pangoniinae (Pangoniini, Philolichini, Scionini) ir Chrysopsinae (Bouvieromyiini, Chrysopsini, Rhinomyzini) (Mackerras, 1954; Mullens, 2019; Mackerras, 2008). Kai kuriuose šaltiniuose sutinkamas ir ketvirtasis kiek kontraversiškas pošeimis – Sceptidinae, anksčiau įvardijamas ir I. M. Mackerras'o klasifikacijoje. Visgi, šis pošeimis buvo panaikintas 1959 ir daugumos mokslininkų bei tyrėjų nėra vartojamas (Fairchild, 1969). Mackerrass'o Tabanidae rūšių suskirstymas paremtas morfologiniais suaugusių individų išoriniais požymiais (Mackerras, 1954). Žinoma, tai nėra vienintelis siūlomas šios šeimos individų suskirstymas. Egzistuoja ir kitos, skirtingų autorių sudarytos klasifikacijos, kuriose siūlomas kiek kitoks rūšių skirstymas pošeimių ar kitų, žemesnių taksonų, rangų lygmenyje (Morita *et al.*, 2016).

Problema kyla dėl rūšių apibūdinime naudojamų morfologinių požymių. Daugelis išorinių požymių susijusių su vabzdžio kūno ar akių spalvomis, naudojamų Tabanidae šeimos rūšių klasifikacijoje keičiasi atsižvelgiant į tai, kaip buvo renkami ir iki būdinimo laikomi individai, taip pat tai priklauso ir nuo vabzdžio amžius jo surinkimo metu. Nors naudojama nemažai ir struktūrinių požymių padedančių identifikuoti individus, visgi, daugelis akcentuojamų, skiriamųjų požymių yra susiję su tam tikrais raštais ir spalvomis, kurie gali pakisti ar išblukti (Mackerras *et al.*, 2008). Didžioji dalis Tabanidae visų rūšių bruožų yra antriniai lytiniai požymiai padedantys identifikuoti tik vienos ar kitos lyties atstovą (Morita *et al.*, 2016).

Lietuvos teritorijoje yra aptinkami Tabanidae šeimos vabzdžiai, priklausantys Chrysopsinae ir Tabaninae pošeimiams. Pangoniinae pošeimio atstovai Lietuvoje taip ir nėra aptinkami. Trijose tribose – Chrysopsini (priklauso Chrysopsinae pošeimiui), Haematopotini ir Tabanini (šios dvi tribos priklauso Tabaninae pošeimiui), pasiskirstę vabzdžiai sudaro 39 Lietuvoje sutinkamas, Tabanidae šeimai priklausančias rūšis (Pakalniškis *et al.*, 2006) (1 lentelė).

1 lentelė. Lietuvoje aptinkamų Tabanidae šeimos porūšių, tribų, genčių ir rūšių sąrašas (šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis Pakalniškis *et al.*, 2006)

Taksonas			
Pošeimis	Triba	Gentis	Rūšis*
Chrysopsinae	Chrysopsini	<i>Chrysops</i>	<i>Chrysops (Chrysops) caecutiens</i> (Linnaeus, 1758) = <i>C. caecutiens caecutiens</i> (Linnaeus, 1758) <i>C. (C.) divaricatus</i> (Loew, 1858) <i>C. (C.) nigripes</i> (Zetterstedt, 1838) <i>C. (C.) parallelogrammus</i> (Zeller, 1842) <i>C. (C.) relictus</i> (Meigen, 1820) <i>C. (C.) rufipes</i> (Meigen, 1820) <i>C. (C.) sepulcralis</i> (Fabricius, 1794) <i>C. (C.) viduatus</i> (Fabricius, 1794) = <i>Chrysops pictus</i> (Meigen, 1820)
		<i>Silvius</i>	<i>Silvius alpinus</i> (Scopoli, 1763) = <i>S. vituli</i> (Fabricius, 1805)
Tabaninae	Haematopotini	<i>Haematopota</i>	<i>Haematopota crassicornis</i> (Wahberg, 1848) <i>Haematopota italica</i> (Meigen, 1804) <i>Haematopota pluvialis</i> (Linnaeus, 1758) <i>Haematopota subcylindrica</i> (Pandellé, 1883)
		<i>Heptatoma</i>	<i>Heptatoma pellucens</i> (Fabricius, 1776)
	Tabanini	<i>Atylotus</i>	<i>Atylotus fulvus</i> (Meigen, 1804) = <i>Atylotus fulvus fulvus</i> (Meigen, 1804) <i>Atylotus latistriatus</i> (Brauer, 1880) <i>Atylotus plebeius</i> (Fallén, 1817) <i>Atylotus rusticus</i> (Linnaeus, 1761) <i>Atylotus sublunaticornis</i> (Zetterstedt, 1842)
		<i>Hybomitra</i>	

			<i>Hybomitra arpadi</i> (Szilády, 1923) <i>H. bimaculata</i> (Macquart, 1826) <i>H. borealis</i> (Fabricius, 1781) = <i>H. lapponica</i> (Wahlberg, 1848) <i>H. ciureai</i> (Séguy, 1937) = <i>H. solstitialis</i> (Meigen, 1820) <i>H. distinguenda</i> (Verrall, 1909) <i>H. lundbecki</i> (Lyneborg, 1959) = <i>H. lundbecki lundbecki</i> (Lyneborg, 1959) <i>H. lurida</i> (Fallén, 1817) <i>H. montana</i> (Meigen, 1820) <i>H. muehlfeldi</i> (Brauer, 1880) <i>H. nigricornis</i> (Zetterstedt, 1842) <i>H. nitidifrons</i> (Szilády, 1914) = <i>H. nitidifrons confiformis</i> (Chvála et Moucha, 1971) <i>H. tarandina</i> (Linnaeus, 1758)
		Tabanus	<i>Tabanus autumnalis</i> (Linnaeus, 1761) = <i>T. autumnalis autumnalis</i> (Linnaeus, 1761) = <i>T. autumnalis brunescens</i> (Szilady, 1914) <i>T. bovinus</i> (Linnaeus, 1958) <i>T. bromius</i> (Linnaeus, 1958) = <i>T. bromius bromius</i> (Linnaeus, 1958) <i>T. cordiger</i> (Meigen, 1820) <i>T. glaucopis</i> (Meigen, 1820) <i>T. maculicornis</i> (Zetterstedt, 1842) <i>T. miki</i> (Brauer, 1880) = <i>T. miki miki</i> (Brauer, 1880) <i>T. sudeticus</i> (Zeller, 1842) = <i>Tabanus sudeticus sudeticus</i> (Zeller, 1842)

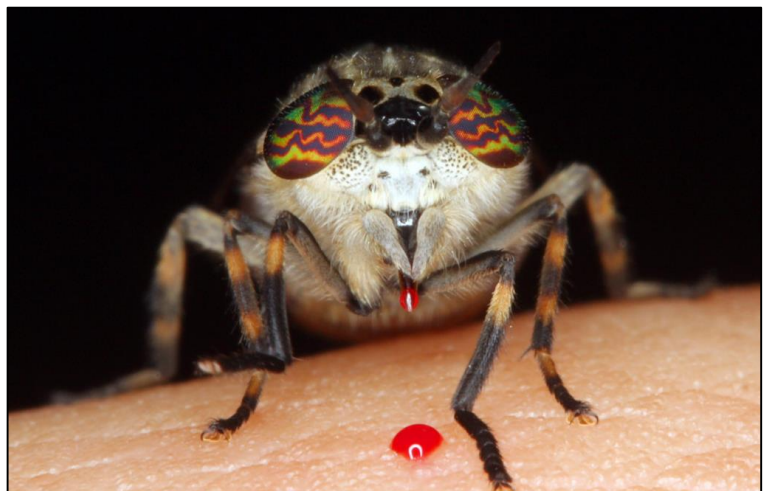
* " = " ženklas nurodo pavadinimo sinonimus, pavadinimus naudotus lietuvių literatūroje, kalbant apie tą pačią rūšį.

Nepastovūs, kintantys Tabanidae šeimos individų požymiai rūšies lygmenyje, kaip ir būdinimui reikalingos informacijos stygius, sukelia nemažai problemų identifikuojant rūšis (Chainey, 1993). Nėra vieno, universalaus atpažinimo rakto padedančio identifikuoti Tabanidae šeimos pošeimius ar gentis, pasaulyje paplitusią šios šeimos rūšių įvairovę.

1.2. Tabanidae hematofagija ir ligų sukėlėjų pernešimas

Dėl savo gyvenimo būdo, hematofagiški Tabanidae šeimos vabzdžiai kenkia ir sukelia daugybę tiesioginių ir netiesioginių problemų įvairiems naminiams, laukiniams gyvūnams ir žmonėms. Skausmingi Tabanidae musių įkandimai ir dideli kraujo netekimo kiekiai, gali sukelti stresą, diskomfortą, didelio kraujo kiekio netekimą ar alergines reakcijas, o kartais ir sunkias ligas, pavojingas gyvybei. Po įkandimų ant individų odos atsiranda matomi randai. Ekonominė žala yra pastebima turizmo sektoriuje, kai didelio šių musių kiekio sukeliama trikdžiai, nepatogumai gali visiškai užkirsti laisvalaikio veiklą lauke. Taip pat patiriami nuostoliai ūkiuose, kai dėl dažnų Tabanidae atstovų išpuolių, gyvūnai negali ganytis ir dėl to, sumažėja šių gyvūnų mėsos ir pieno produkcija (Blahó *et al.*, 2012; Mullens, 2019).

Hematofagija yra vabzdžių prisitaikymas maitintis krauju (Wallace, 2009). Pasitaiko nekandančių vabzdžių, kurie prisitaikė maitintis krauju, kuris išteka į paviršių per kitų organizmų ar kitų faktorių padarytas žaizdas. To pavyzdys galėtų būti Muscidae šeimos musės *Fannia benjamini* ir *Hydrotaea armipes*, kurios maitinasi krauju iš Tabanidae sukeltų žaizdų. Visgi, dauguma hematofagiškų vabzdžių nepriklauso nuo atsitiktinių progų, galimybių aptikti atviras žaizdas, kraujo šaltinius. Šie vabzdžiai pasižymi išsivysčiusiais specializuotais burnos aparatais, kuriais yra prisitaikę pradurti ir prasiskverbti iki gyvūno kraujagyslių, prakirpti, gramdyti gyvūnų audinius, sudarant mažesnes ar didesnes žaizdas iš kurių yra siurbiamas kraujas (Lehane, 2005). Tabanidae šeimos musės, o tiksliau didžioji dalis šios šeimos patelių, yra kraujasiurbiai vabzdžiai, pasižymintys šiais specifiniais burnos aparatais, leidžiančiais pažeidus, įkirpus audinius savo aštriomis, tvirtomis mandibulėmis pasiekti ir siurbti kraują (1 pav.). Paprastai šios šeimos vabzdžiai, tiek patinėliai, tiek patelės, maitinasi įvairių gėlių nektaru, žiedadulkėmis, iš pažeistų medžių tekančia sula ir kitomis panašiomis medžiagomis, kurios aprūpina juos angliavandeniais. Patelės prisitaikiusios prie hematofagiško gyvenimo būdo, kadangi kraujas joms reikalingas kiaušinėlių produkcijai. Be šio kraujo pasisavinimo, kuris atlieka baltymų šaltinio vaidmenį, kiaušinėliai negali vystytis ir subręsti (Chainey, 1993; Vaduva, 2020).



1pav. *Haematopota pluvialis* patelė, besimaitinanti krauju (Hakon, 2009)

Įkandimo ir maitinimosi metu Tabanidae vabzdžiai pasisavina ypač gausius, kelis kartus už jų pačių kūno svorį didesnius, kraujo kiekius, o tai kartu suteikia galimybę prisidėti prie ligų sukėlėjų pernešimo ir platinimo (Krinsky, 1976). Tabanidae patelės yra įvairių ligų sukėlėjų, patogenų, tokių kaip bakterijos, protistai, nematodai ir virusai, vektoriai. Tokia ligų sukėlėjų pernešimo, „vektorinė“ sistemą sudaro tris elementai: vektorius, patogenas ir šeimininkas. Vektoriais yra vadinami organizmai, dažniausiai krauju besimaitinantys nariuotakojai, užtikrinantys patogeno pernešimą nuo vieno šeimininko į kitą (Berenger, Parola, 2017). Šeimininkas yra bet koks gyvas organizmas, užkrėstas tam tikru ligos sukėlėju, patogenu. Šeimininko vaidmuo priklauso nuo ligos simptomų pasireiškimo. Šis organizmas gali pasiduoti patogeno sukeliamai ligai, žūti ar įveikti ją. Taip pat, jis gali tapti besimptomiu nešiotu, funkcionuojančiu kaip ligų sukėlėjų rezervuaras kitiems, naujiems šeimininkams (Sarwar, 2015). Tabanidae šeimos atstovai, kaip šeimininkus, aukas, kurių kraują maitinsis gali pasirinkti įvairius roplius, paukščius ar žinduolius, visgi, pirmenybę taikydami stambiams, šiltakraujams gyvūnams, kaip kad arkliams ar galvijai (Desquesnes, 2004). Siurbiant kraują iš užsikretusio, sergančio šeimininko, su krauju yra įsiurbiami įvairūs patogenai. Dėl skausmingo Tabanidae šeimos musių įkandimo, šeimininkas stengiasi kuo greičiau atsikratyti vabzdžio. Nutraukus vabzdžio maitinimąsi, šis tuojau ieškos ir suradęs persikels ant kito individo, kad pabaigtų maitinimąsi. Tai yra ypač palankus veiksmas mechaniniam perdavimui, kadangi nemažai patogenų negali ilgai išgyventi vektoriuje, nors yra ir patogenų, kuriems ilgesnis buvimas vektoriuje yra būtinas žingsnis jų gyvenimo cikle (Lane, Crosskey, 1993; Desquesnes *et al.*, 2009).

Pagal įvairius vektoriaus ir patogeno tarpusavio santykius, aplinkos ir vietinės sąlygas vabzdžiai gali vykdyti biologinį arba mechaninį ligų sukėlėjų pernešimą (Baldacchino *et al.*, 2014). Šios abi pernašos gali koegzistuoti toje pačioje teritorijoje, su tais pačiais šeimininkais ar tais pačiais vektoriais (Desquesnes *et al.*, 2009). **Mechaninis pernešimas** vyksta kai patogenai pasitelkę vektoriaus pagalbą yra mechaniškai pernešami nuo vieno šeimininko į kitą. Šios pernašos metu neįvyksta jokios patogenų vystymosi ciklo stadijos ar pagausėjimas vektoriuje. Į vektorių ligų sukėlėjas patenka kraujo siurbimo metu ir yra pernešamas juo užterštomis burnos aparato dalimis. Didesnė tikimybė mechaniškai pernešti patogeną turi tie vektoriai, kurie pasižymi dažnu kraujo maitinimusi bei gausiu jo kiekiu pasisavinimu. Iš esmės mechaninių vektorių, nariuotakojų vaidmuo šio tipo pernešime yra kontakto pratęsimas, pernešimas tarp šeimininkų (Sarwar, 2015). Tuo tarpu **biologinis**, arba dar kitaip vadinamas cikliniu, **pernešimas** įvyksta, kai patogenas tam tikrą laiką išgyvena vektoriaus kūne ir tik vėliau yra pernešamas į naująjį, stuburinį šeimininką. Egzistuoja tam tikra priklausomybė tarp parazito ir jį pernešančio vektoriaus. Patekęs į vektorių, ligos sukėlėjas kelis vystymosi ciklus ir/ar pasidauginimą turi praleisti vektoriaus, vabzdžio organizme prieš įvykstant galutiniam perdavimui į naują šeimininką. Pagal tam

tikrą gyvenimo būdą, ypatumus, tai yra priklausomai nuo to, ar ligų sukėlėjas pereina tik vystymosi ciklus, tik dauginimasi, ar tiek vystymasi, tiek dauginimasi, viename vektoriuje, vabzdyje, skirtingų patogenų biologinė perneša gali atitinkamai būti suskirstoma į ciklinę – vystymosi (angl. *cyclo – developmental*), propagavimo (angl. *propagative*) ir ciklinę – propagavimo (angl. *cyclo – propagative*), pernašas (Sarwar, 2015; Lehane, 2005).

Tabanidae šeimos vabzdžiai sugeba pernešti įvairių stuburinių ligų sukėlėjus tiek fiziškai, tiek mechanškai. Mechaninis pernešimas yra geriau žinomas, dažniau pasitaikantis šios šeimos gretose, pernešant patogenus nuo užsikrėtusio šeimininko, imliam šeimininkui, ant krauju užterštų burnos aparatų pertraukto maitinimosi metu (Mullen, 2019; Baldacchino *et al.*, 2014). Nors yra pasiekiami tokių autorių kaip Krinsky (1976), Foil (1989), Baldacchino (2014) bei kitų mokslininkų sudaryti sąrašai, kuriuose yra pateikta surinkta informacija apie Tabanidae musių pernešamus patogenus, visgi, duomenų, atliktų analizių ir dokumentavimo apie Tabanidae šeimos rūšių, kaip ligų sukėlėjų vektorių vaidmenį palyginus su kitais nariuotakojais nėra ypač daug (Baldacchino *et al.*, 2017; Mullens, 2019). Pagal pasiekiamus duomenis apie Tabanidae šeimos pernešamus patogenus visame pasaulyje arba vien Europoje (Krinsky, 1976; Baldacchino *et al.*, 2014) (informacija, apie kituose žemynuose, nekosmopolitiškai ir ne Europoje, sutinkamus ir Tabanidae pernešamus ligų sukėlėjus, šiame darbe nėra analizuojama, į ją neatsižvelgiama), galima teigti, jog yra mažiausiai 20 skirtingų ligų sukėlėjų rūšių, genčių, kurias gali pernešti Europoje aptinkami Tabanidae atstovai, o tai pat galimai ir Lietuvoje gyvenančių Tabanidae rūšių musės.

1.3. Afrikinio kiaulių maro virusas

Afrikinio kiaulių maro virusas – didelis, ikosaedro formos, Asfarviridae šeimos ir Asfivirus genties DNR arbovirusas, kurio genomo ilgis varijuoja nuo 170 iki 193 kb porų priklausomai nuo viruso izoliato (Simulundu *et al.*, 2017; Arias *et al.*, 2017). Šis virusas sukelia Afrikinį kiaulių marą.

Afrikinis kiaulių maras (AKM) yra užkrečiama ir dažnai net mirtina virusinė liga, paveikianti namines kiaules, šernus bei kitus Suidae šeimos atstovus (Simulundu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020). Visos šios šeimos atstovų amžiaus grupės yra vienodai jautrios. Individaus liga gali pasireikšti skirtingomis formomis: ūmine, paūmine ar lėtine, arba neakivaizdžia, besimptomė forma, kai gyvūnas yra Afrikinį kiaulių marą sukeliančio viruso nešiotojas. Ūmine forma sergančių kiaulių mirtingumas siekia iki 95-100 procentų (Gallardo *et al.*, 2015; Arias, Sánchez-Vizcaíno, 2002). Afrikinio kiaulių maro inkubacinis laikotarpis varijuoja nuo 3 iki 19 dienų, o klinikiniai požymiai gali būti panašūs į kitas hemoragines ligas, tokias, kaip klasikinis kiaulių maras (angl. *Classical swine fever*) ar rožė (angl.

Erysipelas) (Arias *et al.*, 2017). Žmonėms ir kitiems stuburiniams gyvūnams ši liga nėra pavojinga, neturi tiesioginio poveikio jų sveikatai. Visgi, pastebimas didžiulis neigiamas poveikis, nuostoliai šalių, kovojančių ir bandančių kontroliuoti viruso sukeltos ligos protrūkius, ekonomikai. Vakcinacija galėtų būti viena iš priemonių, padedančių kontroliuoti ir kovoti prieš infekcines virusines ligas. Nemažai pastangų įdėta į Afrikinio kiaulių maro vakcinų kūrimą, tačiau veiksminga ir efektyvi vakcina prieš Afrikinį kiaulių maro virusą kol kas nėra sukurta, o efektyviausia priemonė užkirsti protrūkiams yra užsikrėtusių kiaulių skerdimas, utilizacija.

Pirmieji šio viruso ir jo sukeltos ligos stebėjimai buvo atlikti 1909-aisiais metais Rytų Afrikos protektorate (dabartinės Kenijos teritorijoje) (Montgomery R. E., 1921) ir po mažo išplito kitose Afrikos žemyno dalyse. 1957-aisias ir pakartotinai 1960-aisiais metais ši Afrikinio kiaulių maro viruso sukelta liga buvo pastebėta Portugalijoje, čia introdukuota iš Angolos, kuri tuo metu dar buvo Portugalijos kolonija. Antrosios introdukacijos metu šio viruso plitimas nebuvo sukontroliuotas ir Afrikinis kiaulių maras išplito Pirėnų pusiasalyje ir kitose Europos šalyse, tokiose, kaip Italija, Malta, Prancūzija, Belgija ir Nyderlandai. Natūralus barjeras, toks, kaip Atlanto vandenynas, atskiriantis Šiaurės ir Pietų Amerikas nuo ligos plintančios Afrikoje ir Europoje buvo neveiksmingas ir maždaug 1971-aisiais metais virusas persikėlė į Kubą, o aštuntojo dešimtmečio gale į Dominikos Respubliką, Haitį, bei Braziliją (Penrith, Vosloo, 2009). Afrikinio kiaulių maro protrūkiai ir toliau tęsėsi skirtingose Afrikos dalyse. 2007-aisiais metais viruso sukeltos ligos atvejai patvirtinti ir Sakartvele (Gruzija), Armėnijoje, Čėčėnijoje (Rusijos federacija), o vėliau Afrikinis kiaulių maras aptiktas ir dar keliose Rusijos regionuose (Penrith, Vosloo, 2009). Vėl į Europą įvestas virusas, nuo tada išplito įvairiose Europos ir Azijos šalyse (Wang *et al.*, 2020). Nuo maždaug 2014-ųjų metų virusas pradėjo plisti Rytų Europoje - pastebėti atvejai Lenkijoje bei Baltijos šalyse, jų tarpe ir Lietuvoje. Toliau jis paplito ir centrinėje Europos dalyje, su atvejais užfiksuotais Čekijos Respublikoje, Rumunijoje ir Vengrijoje (Olesen *et al.*, 2018). Pasaulio gyvūnų sveikatos organizacija (angl. *World Organisation for Animal Health*) yra paskelbusi apibendrintą ataskaitą apie Afrikinio kiaulių maro padėtį ir jo protrūkius pasaulyje tarp 2016-ųjų ir 2020-ųjų (iki birželio 18 d.) metų bei praneša apie ligos protrūkių padidėjimą. Apie 30 proc. (60/201) ataskaitas teikiančių šalių ir teritorijų pranešė apie šios ligos buvimą (OIE, 2020). Taip pat Pasaulio gyvūnų sveikatos organizacija savo šešių mėnesių ataskaitoje apie Afrikinio kiaulių maro situacija skirtingose šalyse (2021-ųjų metų Sausio 8 – 21 dienų situacijos ataskaita), pranešė apie naujus arba vis dar besitęsiančius protrūkius 24-iose Pasaulio šalyse: 9-iose Europos šalyse, 12-oje Azijos ir 4-iose Afrikos šalyse (Rusija pateikta, kaip šalys turinti naujus ar vykstančius šio viruso protrūkius, tiek Azijoje, tiek Europoje) (OIE, 2021).

Afrikinis kiaulių maro virusas gali būti perduodamas tiesiogiai, tai yra per kontaktą tarp užsikrėtusių ir sveikų, ligai imlių kiaulių ar laukinių šernų. Virusą perdavimas per kiaulių tiesioginį kontaktą yra galimas iki 30 dienų po užsikrėtimo (Costard *et al.*, 2009; Penrith, Vosloo, 2009). Žmonės taip pat atlieka svarbų vaidmenį šio viruso platinime. Jie yra atsakingi už kiaulių ir jų produktų gabenimą, pervežimą, taip galimai išplatinant virusą dideliais atstumais su užsikrėtusiomis kiaulėmis ar tokių kiaulių produktais. Galimas plitimas per užkrėstos mėsos vartojimą, pašarus, sąlyčio su daiktais, įranga, kuri yra užteršta užsikrėtusių, sergančių kiaulių krauju, seilėmis, ekskrementais, atliekomis, kuriose gali būti virusas, metu. Kitas būdas – ligos sukėlėjo, Afrikinio kiaulių maro viruso, plitimas, perdavimas vektorių, vabzdžių ar erkių pagalba. Šiuo atveju virusas imliam organizmui gali būti perduodamas kraujo, kuriame yra šis virusas, maitinimosi metu (Penrith, Vosloo, 2009; Olesen *et al.*, 2018). Dažniausi šio viruso platintojai – virusą pernešančios *Ornithodoros* genties (*Ornithodoros* spp.) erkės. Nuo jo aptikimo pradžios, buvo atlikta ir vis dar yra atliekama daugybė tyrimų ir su kitomis kraują vartojančių nariuotakojų rūšimis, galimų, potencialių Afrikinio kiaulių maro vektorių nustatymui, tačiau beveik visi rezultatai yra neigiami. Be *Ornithodoros* genties erkių, vieninteliai kiti nariuotakojai, laboratoriniais tyrimais patvirtinti ir šio viruso potencialiais vektoriais laikomi, yra *Stomoxys* genties atstovai (Penrith, Vosloo, 2009; EFSA Panel on Animal Health and Welfare, 2010). Tabanidae šeimos musės, dėl savo mitybinių įpročių, yra įvairių virusų mechaniniai vektoriai. Jų kraujo šaltiniais, aukomis tampa įvairūs gyvūnai, jų tarpe ir Suidae šeimos atstovai. Nors kol kas tyrimais nėra įrodyta, tačiau nėra atmetama galimybė, jog Tabanidae vabzdžiai, maitinimosi metu pasisavinantys ypač didelius kraujo kiekius, galėtų dalyvauti perduodant Afrikinio kiaulių maro virusą (Olesen *et al.*, 2018).

1.4. *Trypanosoma* genties protistai vabzdžiuose

Trypanosoma yra žiuželinių protistų gentis, priklausanti Sarcomastigophora tipui, *Kinetoplastida* būriui ir *Trypanosomatidae* šeimai. Šeimos klasifikacija yra ypač sudėtinga ir vis persvarstoma mokslininkų parazitologų gretose dėl įvairių priežasčių, pavyzdžiui tokių, kaip kad morfologinių skirtumų trūkumas tarp filogenetiškai skirtingų taksonų (Magri *et al.*, 2021; Votypka *et al.*, 2015b). *Trypanosoma* gentį sudaro daugiau nei 500 rūšių, paplitusių visuose žemynuose. Gentyje yra nepatogeninių ir patogeninių rūšių, kurios yra įvairių stuburinių – paukščių, žuvų, varliagyvių, roplių ir žinduolių, taip pat ir žmonių, parazitai (Haag *et al.*, 1998; Spodareva *et al.*, 2018).

Hemoparazitais yra laikomi patogenai, kurie parazituoja ir apsigyvena gyvo šeimininko, parazituojamo organizmo kraujyje. Šių patogenų tarpe yra ir *Trypanosoma* genties atstovai (Stuen, 2020). *Trypanosoma* protistai – hemoparazitai, kuriems dažniausiai reikia daugiau nei vieno šeimininko, kad

galėtų užbaigti savo gyvenimo ciklą. Jie pakaitomis gyvenimo ciklus praleidžia stuburinių ir bestuburių organizmuose. Šie vienaląsčiai įsikuria stuburinių organizmų kraujyje, nors kai kuriais atvejais gali būti pažeidžiami ir parazituojami kiti stuburinių šeimininkų audiniai. Bestuburiuose, kurie taip pat atlieka ir vektorių vaidmenį, šie patogenai tam tikrą laiką praleidžia žarnyne. Vektoriais gali būti kraują siurbiantys nariuotakojai, vabzdžiai ar voragyviai, kurie maitinasi žinduolių, paukščių bei kai kurių varliagyvių ir roplių krauju. Taip pat žuvims, kai kuriems varliagyviams ir ropliams *Trypanosoma* protistus perduoda ir vektorių vaidmenį atlieka dėlės. *Trypanosoma* sp. į vektorius vabzdžius, patenka pastariesiems maitinantis krauju iš jau užsikrėtusių šeimininkų (Haag *et al.*, 1998; Yahya *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2019). Žinduoliams pernešamos trypanosomos gali būti suskirstomos į Salivaria ir Stercoraria grupes pagal vektorių naudojamą jų pernešimo, perdavimo būdą. Salivaria protistai vystosi priekinėje vabzdžių virškinamojo trakto dalyje ir yra perduodami kraujo siurbimo metu per vabzdžio burną. Tuo tarpu, Stercoraria protistai vystosi užpakalinėje vabzdžio virškinimo trakto dalyje. Vabzdys, besimaitinantis stuburinio gyvūno krauju, tuo pat metu tuština ir kartu su vabzdžio išmatomis *Trypanosoma* genties atstovai patenka į naująjį šeimininką per įkandimo metu padarytą žaizdą (Haag *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2019). Kitaip nei Salivaria grupės atstovai, didžioji dalis Stercoraria grupėje esančių rūšių yra nepatogeniniai protistai, nesukeliantys jokio neigiamo poveikio šeimininkams, kurių organizme jos įsikuria. Žinoma yra ir išimčių, viena jų – Stercoraria grupėje esanti patogeninė rūšis *Trypanosoma cruzi* (Magri *et al.*, 2021).

Nemažai *Trypanosoma* genties parazitų sukelia svarbias, rimtas veterinarines, gyvūnų ligas, o taip pat ir ligas turinčias poveikį ir žmogaus sveikatai. Didžioji su šia gentimi susijusi tyrimų dalis ir didžiausias mokslininkų dėmesys yra nukreiptas į dvi *Trypanosoma* rūšis – *T. brucei* ir *T. cruzi*, kurios sukelia ypač sunkias žmonių ligas. *Trypanosoma brucei* sukelia miegligę, kitaip dar vadinama žmonių afrikine tripanosomoze, o *Trypanosoma cruzi* sukelia Chagaso (Šagaso) ligą, dar vadinama Amerikine tripanosomoze (Spodareva *et al.*, 2018; Yahya *et al.*, 2012). Šios rūšys nėra endeminės Europos žemyne, o atvežtiniai šių ligų atvejai diagnozuoti įvairiose Europos šalyse, tarp žmonių, kurie imigravo iš arba buvo apsilankę Afrikoje ar Centrinėje ir Pietų Amerikoje (Magri *et al.*, 2021). Nors vidutinio klimato regionuose sutinkamos *Trypanosoma* rūšys dažniausiai nesukelia ypač didelio parazituojamų stuburinių gyvūnų sergamumo, mirtingumo, visgi, šiose teritorijose pasitaiko ir specifinių rūšių, kurios sugeba sukelti įvairias ligas (Werszko *et al.*, 2019). Net ir nepatogeninės rūšys dėl tam tikrų sąlygų sugeba sukelti žalingą poveikį savo šeimininkams. Atlikti tyrimai parodė, jog visame pasaulyje plačiai paplitęs, galvijus parazituojantis, nepatogeninis protistas *Trypanosoma theileri* gali būti potencialus patogenas dėl tam tikrų priežasčių nusilpusiems, stresą jaučiantiems šeimininkams, parazituojamiems stuburiniams organizmams. Tarkim, nors *Trypanosoma theileri* dažniausiai asocijuojama su besimptomiais

užsikretumais, ligų atvejai yra užfiksuojami gyvuliuose su nusilpusia imunine sistema. Šiems gyvuliams pasireiškia leukocitozė, blužnies padidėjimas, anemija, krintantis svoris ir aiškus pieno gamybos sumažėjimas (Botero *et al.*, 2013; Magri *et al.*, 2021).

Tabanidae šeimos atstovai yra gerai žinomi šios protistų genties vektoriai, galintys pernešti *Trypanosoma* rūšis tiek mechaniniu, tiek biologiniu pernašos būdais, atsižvelgiant į vietines sąlygas ir tam tikras aplinkybes (Baldacchino *et al.*, 2014). Mokslininko F. Baldacchino ir kolegų 2014 publikuotame straipsnyje (Baldacchino *et al.*, 2014) yra pateikti šeši su Tabanidae musėmis asocijuojami *Trypanosoma* genties ligų sukėlėjai – *Trypanosoma evansi*, *T. vivax*, *T. theileri*, *T. equiperdum*, *T. brucei*, *T. congolense*, pernešami mechaninės pernašos būdu. Visgi, pasiekiamas didžiulis kiekis literatūros šaltinių, kuriuose minimas ir kitų *Trypanosoma* genties protistų aptikimas įvairiuose Tabanidae šeimai priklausančiuose rūšyse. Europos žemyne neatvežtinės, natūraliai laukiniuose ir naminiuose gyvuliuose aptinkamos bent keturiolika skirtingų *Trypanosoma* rūšių (Magri *et al.*, 2021), kurios tikėtina, kad gali būti platinamos vabzdžių pagalba. Dideli kraujo kiekiai suvartojami pertraukto maitinimosi metu iš užsikrėtusių šeimininkų, sudaro sąlygas *Trypanosoma* genties atstovams patekti į Tabanidae vabzdį ir būti pernešiami į naujus organizmus. Tarkim skirtingos Tabanidae šeimos rūšys yra dažni, plačiai Europoje paplitusio, nedidelių patogeniškumą pasižyminčio protisto *Trypanosoma theileri* vektoriai (Magri *et al.*, 2021).

Žinios apie *Trypanosoma* sp. stuburinių šeimininkų ir bestuburių vektorių įvairovę, skirtingose buveinėse, teritorijose padeda suprasti perdavimo ciklą dinamiką ir prisideda prie bandymo spręsti parazituojančių rūšių keliamas didesnes ar mažesnes problemas, tinkamos kontrolės taikymo pasirinkimo. Atsižvelgiant į *Trypanosomų* patogeninį potencialą, kai šeimininkai yra veikiami tam tikrų streso faktorių, pakankamai naudinga, svarbu nustatyti rūšių buvimą, genetinę būklę, plitimo kelius ir epidemiologiją Europoje ir Lietuvoje. Tai svarbu atsižvelgiant ir į tai, jog dėl vykstančių klimato ir aplinkos pokyčių gali didėti šių patogenų erdvinis pasiskirstymas (Haag *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2019; Botero *et al.*, 2013; Magri *et al.*, 2021).

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Vabzdžių surinkimas

Tyrimo metu analizuojami Tabanidae šeimos vabzdžiai sugauti 2018 ir 2019 metų vasaros mėnesiais, šešiose skirtingose Lietuvos teritorijose.

Vabzdžiai buvo gaudomi NZI gaudyklėmis, kurios buvo pastatytos keturiose vietose, apie 5-20 metrų atstumu nuo kiaulių laikymo vietų. Vietos buvo pasirinktos AKM užkrėstose teritorijose, kuriose buvo nustatyti AKM užsikrėtę šernai. Pirmoji vieta buvo kiaulių fermų kompleksas Poškaičiuose, Gaukštonių g. 79, Nemenčinės sen., Vilniaus raj. (54.891858, 25.429798 (WGS)). Aplink kompleksą auginamos įvairios žemės ūkio kultūros, kuriose buvo stebimi šernai. Antroji vieta buvo prie stambaus kiaulių auginimo komplekso Sirvyduose, Lekėčių sen., Šakių raj (55.009557, 23.458766 (WGS)). Po masinių AKM atvejų Ažuolų Būdoje, Marijampolės sav., ir netolimose teritorijose, liepos 24 d. NZI gaudyklė buvo pastatyta Ažuolų Būdės kaime netoli (apie 10-15 m atstumu) kiaulių tvarto, kurio šeimininkė buvo susijusi su prieš tai Ažuolų Būdoje buvusiu AKM židiniu. Ketviroji vieta buvo pasirinkta miške prie kritusio nuo AKM šerno, kuris buvo izoliuotas tinkline tvora nuo aplinkos (Ilgakiemis, Kauno apskritis, 54.76593, 23.83296 (WGS)). Tyrimas buvo suderintas su VMVT (Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos) Skubios veiklos skyriumi. Gaudyklių medžiaga buvo surenkama kiekvieną savaitę gegužės - spalio mėnesiais.

Taip pat medžiaga buvo renkama dviejuose AKM židiniuose naudojant entomologinį tinklėlį – Sviliai, Kėdainių raj. (2018 06 18), Akmenės raj., Papilės sen., Skabeikiai (2018 08 08).

Renkant vabzdžius, kurį laiką jie buvo laikomi propilenglikolyje. Surinktos musės kartu su duomenų etiketėmis, nurodančiomis informaciją apie individą, jo sugavimo datą ir vietą, yra laikomi 96 proc. etanolyje, kol toliau bus tęsiamas tyrimas, sugautų individų morfologinė ir molekulinė analizė laboratorijoje.

2.2. Tabanidae šeimos rūšių identifikavimo tyrimų metodika

Tabanidae šeimos vabzdžiai pasižymi morfologiniais požymiais, kurie padeda nesunkiai atskirti šią šeimą iš kitų Diptera būriui priklausančių šeimų. Tai yra vidutinio ar gana didelio dydžio, dažniausiai tamsia kūno spalva pasižymintys vabzdžiai su ypač didelėmis, spalvingomis sudėtinėmis (facetinėmis) akimis. Šios šeimos vabzdžiams yra būdingas duriamasis – siurbiamasis burnos aparatas bei aiškiai matomos, iš trijų narelių sudarytos antenos, su ant jų trečiojo narelio pastebimais redukuotais segmentų pėdsakais. Tarp Tabanidae šeimos atstovų nekintantis sparnų gyslotumas yra vienas iš šeimą identifikuoti

padedančių požymių. Vienas ryškiausių požymių yra tai, jog visų šeimos atstovų sparno R4 ir R5 radialinės gyslos sudaro „Y“ raidės formos gyslotumą (Chainey, 1993; Mullens, 2019).

Didelė požymių įvairovė ir nepastovumas net rūšių lygmenyje gali sukelti problemų būdinant atskirus atstovus iki rūšies. Svarbu atsižvelgti ir į tai, jog Tabanidae šeimos patelių ir patinėlių būdinimas dažnai yra paremtas skirtingais raktais (Falck, 2014).

Laboratorijoje Tabanidae šeimos musės biologinio mikroskopo pagalba yra identifikuojamos iki rūšies. Vabzdžių identifikacijai pasitelkiami įvairūs atpažinimo raktais, kuriais išskiriami individai pagal specifinius morfologinius požymius (Chinery, 2012; Falck, 2014; Krčmar *et al.*, 2011; Chainey, 1993; Olsufjev, 1977). Pirmiausiai suskirstyti į gentis vabzdžiai toliau identifikuojami iki rūšių.

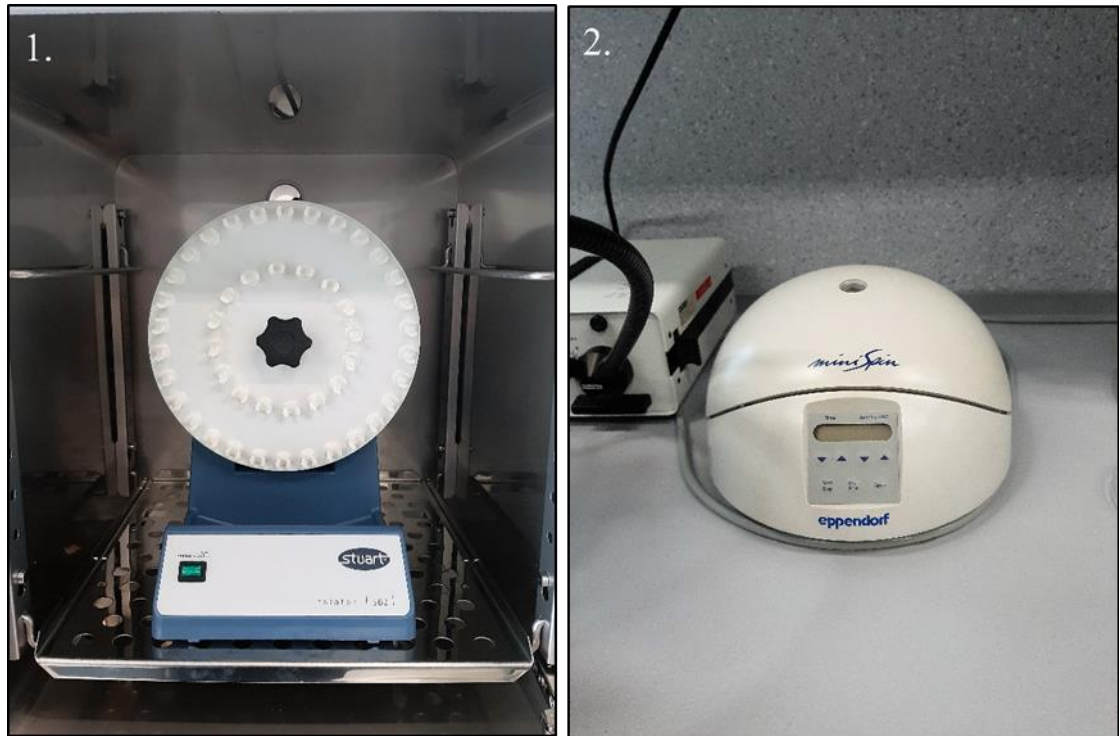
Atsižvelgiant į identifikavimo problemas, naudojantis ne visuomet patikimais ir aiškiais morfologiniais požymiais, išorine sandara, pateikta taksonominiuose apibūdinimo raktuose, gali būti pasitelkti molekuliniai tyrimai tikslesniam, patikimesniam rūšies nustatymui. Papildomi molekuliniai tyrimai pasitelkti nustatyti Tabanidae šeimos individų rūšis, kurių nebuvo galima identifikuoti remiantis tik jų morfologija.

2.3. DNR išskyrimas

DNR išskyrimas iš sugautų ir etilo alkoholyje laikomų Tabanidae šeimos musių, buvo atliekamas pasitelkiant „DNeasy® Blood & Tissue Kit (250)“ (QIAGEN) DNR išskyrimo rinkinį. Viskas buvo atliekama DNR išskyrimui paruoštoje aplinkoje, ant dezinfekuotų paviršių.

Mėgintuvėliuose su etilo alkoholiu laikomas vabzdys yra perkeliamas ant objektinio stiklelio ir paliekamas kelioms minutėms išdžiūti, kad etilo alkoholis išgaruotų. Tuomet, sterilia adatėle yra kelis kartus praduriama ant objektinio stiklelio padėto vabzdžio pilvelio sritis ir šis perkeliamas į 1,5ml mėgintuvėlį. Į mėgintuvėlį su muse yra įpilama 180 µl ATL buferio ir 20 µl Proteinazės K. lengvai suplakus, mėginiai įstatomi į termostate esantį rotorių (2 pav.1) ir inkubuojami 56 °C temperatūroje per naktį. Praėjus inkubacijos laikotarpiui į kiekvieną mėginį įpilami 200 µl AL buferio ir lengvai suplakus inkubuojama 10 min 70 °C temperatūroje. Toliau yra pridedami 200 µl etilo alkoholio ir gerai išmaišoma. Mišinys automatine pipete iš mėgintuvėlio (mėgintuvėlyje paliekant tik musę) yra perpilamas į minikolonelę ir centrifuguojamas (1 x 6000 rpm) 1 min. (2 pav. 2). Kolonėlė perkeliama į naują mėgintuvėlį (senasis išmetamas). Į kolonėlę yra įpilami 500 µl AW1 buferio ir centrifuguojama (1 x 6000 rpm) 1 min. Kolonėlė perkeliama į naują mėgintuvėlį ir įpilus 500 µl AW2 buferio centrifuguojama maksimaliu greičiu (naudojamos centrifugos atveju – 1 x 13400 rpm) 3 minutes. Kolonėlė perkeliama į „Safelock“ mėgintuvėlius. Ant kolonėlėje esančio filtro atsargiai supilama 60-200 µl (priklausomai nuo

musės didžio) AE buferio ir paliekama inkubuotis apie 1 min kambario temperatūroje. Mėginys centrifuguojamas (1 x 6000 rpm) 1 minutę. Kolonėlė išmetama, o mėgintuvėlis su išskirta DNR yra sandariai uždaromas ir saugomas -20 °C temperatūroje.



2 pav. DNR išskyrimui naudojamos darbo priemonės. 1.- rotorius „Rotator SB2“ (Stuart);
2.- centrifuga „MiniSpin“ (Eppendorf)

2.4. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

2.4.1. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) Afrikinio kiaulių maro viruso DNR nustatyti

Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) atliekamos naudojant „Mastercycler personal“ PGR aparatą (Eppendorf) (3 pav.). PGR metodu, siekiama nustatyti Afrikinio kiaulių maro viruso kapsidės baltymo p72 koduojančio geno B646L buvimą skirtingose Tabanidae šeimos rūšių musėse. AKM viruso p72 baltymo geno padauginimui naudojami pradmenys P72-F (5'-GGT TGG TAT TCC TCC CGT G-3') ir P72-R (5'-GAT TGG CAC AAG TTC GGA C-3') (Luo *et al.*, 2016). Galutinis produktas – maždaug 330bp ilgio seka.



3 pav. "Mastercycler personal" PGR aparatas

Pirmiausia yra paruošiamas PGR reakcijos mišinys. Vieno mėginio reakcijos mišinio tūris yra 23 μ l. Ši mišinį sudaro 8,5 μ l ddH₂O, 1 μ l pradmens P72-F, 1 μ l pradmens P72-R ir 12,5 μ l PGR mišinys „DreamTaq PCR Master Mix (2X)“ (Thermo Fisher Scientific) (į šio mišinio sudėti įeina DreamTaq DNA Polimerazė, 2X DreamTaq buferis, dNTPs, 4Mm MgCl₂). Visi PGR reagentai yra atitirpdinami iki kambario temperatūros ir supilstomi į 1,5ml tūrio mėgintuvėlį.

Darbo metu pagal tai, kokį skaičių DNR mėginių norima amplifikuoti, yra sunumeruojami 0,2 ml mėgintuvėliai (kontrolių žymėjimas: K- žymimas mėgintuvėlis su neigiama kontrolė; K+ mėgintuvėlis su teigiama kontrolė). Į 0,2 ml sužymėtus mėgintuvėlius supilstoma po 23 μ l PGR reakcijos mišinio. Į kiekvieną mėgintuvėlį pridedami 2 μ l tiriamos DNR. Kaip teigiama kontrolė į kontrolinį mėgintuvėlį supilami 2 μ l jau patikrintos ir teigiamą PGR rezultatą davusios DNR, o kaip neigiama kontrolė į mėgintuvėlį įpilami 2 μ l vandens. Galutinis kiekvieno mėginio tūris yra 25 μ l.

Polimerazinės grandinės reakcijos programa yra parodyta 2-oje lentelėje (2 lentelė).

2 lentelė. Atliekama PGR programa AKM viruso DNR padauginimui

Temperatūra (°C)	Ciklo trukmė (min.)	Ciklo kartojimo skaičius
95	5	-
95	0,5	39
55	0,5	
72	0,5	
72	10	-

Po PGR mėgintuvėliai saugomi 4°C temperatūroje.

2.4.2. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) *Trypanosoma* sp. DNR nustatymui

Trypanosoma genties protistų buvimui Tabanidae šeimai priklausančiose musėse nustatyti yra atliekamas „lizdinė“ PGR. PGR metu yra amplifikuojama *Trypanosoma* sp. budinga 18S mažo subvieneto ribosominę RNR koduojančio geno fragmentai (18S SSU rRNR). Atliekamos dvi PGR reakcijos, kurių rezultatas – maždaug 770 bp ilgio fragmentas (Valkiūnas *et al.*, 2011).

Pirmajai PGR reakcijai naudojami pradmenys Tryp763 (5'- CAT ATG CTT GTT TCA AGG AC-3') ir Tryp1016 (5'- CCC CAT AAT CTC CAA TGG AC-3'). Antrajai polimerazės grandininei reakcijai naudojami pradmenys Tryp99 (5'- TCA ATC AGA CGT AAT CTG CC-3') ir Tryp957 (5'- CTG CTC CTT TGT TAT CCC AT-3') (Valkiūnas *et al.*, 2011).

Atšildžius visus reikiamus reagentus 1,5ml tūrio mėgintuvėlyje yra paruošiamas galutinis PGR reakcijos mišinys pirmajai polimerazės grandininei reakcijai. Kiekvienam mėginiui sudaromas 23 µl PGR mišinys, kurį sudaro 8,5 µl ddH₂O, 1 µl pradmens Tryp763, 1 µl Tryp1016, ir 12,5 µl polimerazinės grandininės reakcijos mišinio „DreamTaq PCR Master Mix (2X)“ (Thermo Fisher Scientific).

Į paruoštus 0,2 ml mėgintuvėlius supilstoma po 23 µl paruošto PGR reakcijos mišinio. Į mėgintuvėlius pridedami 2 µl tiriamos DNR. Kaip teigiama kontrolė į mėgintuvėlį supilama jau patikrinta DNR, kurioje yra *Trypanosoma* sp. DNR, o kaip neigiama kontrolė – įpilami 2 µl vandens. Galutinis kiekvieno reakcijos mėginio tūris yra 25 µl.

Paruošti mėgintuvėliai yra sustatomi amplifikatoriuje, kur paleidžiama pirmoji PGR programa *Trypanoma* sp. 18S SSU rRNR padauginimui (3 lentelė).

3 lentelė. Pirmoji *Trypanosoma* sp. DNR amplifikacijos PGR programa

Temperatūra (°C)	Ciklo trukmė (min.)	Ciklo kartojimo skaičius
95	5	-
95	1	5
45	0,5	
65	1	
95	1	35
50	0,5	
72	1	
65	10	-

Po pirmosios PGR reakcijos 1,5ml tūrio mėgintuvėlyje paruošiamas naujas PGR reakcijos mišinys. Naują PGR reakcijos mišinį sudaro 8,5 µl ddH₂O, 1 µl pradmens Tryp99, 1 µl pradmens Tryp957 ir 12,5 µl PGR mišinio „DreamTaq PCR Master Mix (2X)“ (Thermo Fisher Scientific).

Į naujus paruoštus ir sunumeruotus 0,2 ml mėgintuvėlius yra supilama po 23 µl PGR mišinio. Toliau į mėgintuvėlius yra įpilami po 2 µl iš pirmoje polimerazės grandininėje reakcijoje dalyvavusių mėginių mėgintuvėlių. Galutinis reakcijos mėginio tūris – 25 µl.

Antrajai reakcijai paruošti mėgintuvėliai yra nunešami ir įstatomi į PGR aparatą, kur yra paleidžiama antroji polimerazės grandininės reakcijos programa *Trypanosoma* DNR amplifikacijai (4 lentelė).

4 lentelė. Antroji *Trypanosoma* sp. DNR amplifikacijos PGR programa

Temperatūra (°C)	Ciklo trukmė (min.)	Ciklo kartojimo skaičius
96	3	-
96	0,5	25
58	1	
72	0,5	
72	7	-

Po PGR, mėginiai laikomi 4°C temperatūroje.

2.4.3. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) vabzdžių identifikavimo patvirtinimui

Kai kurių vabzdžių identifikavimui buvo pasitelkta polimerazinė grandininė reakcija (PGR). Taikant šį metodą, buvo naudojami mitochondrinės DNR citochromo c oksidazės I (COI) geno fragmentą amplifikuojantys pradmenys – LCO1490 (5'–GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG–3') ir HXO2198 (5'–TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA–3') (Folmer *et al.*, 1994). PGR rezultatas – 710 bp ilgio seka.

PGR reakcijai paruošti 25 µl mėginiai, kurių tūrį sudaro 9,5 µl ddH₂O, po 1 µl kiekvieno pradmens (LCO1490 ir HXO2198), 12,5 µl PGR mišinio „DreamTaq PCR Master Mix (2X)“ (Thermo Fisher Scientific) ir 1 µl tiriamos DNR.

Paruošti PGR reakcijos mėginiai sustatyti amplifikatoriuje, kur paleidžiama polimerazinės grandinės reakcijos programa (5 lentelė).

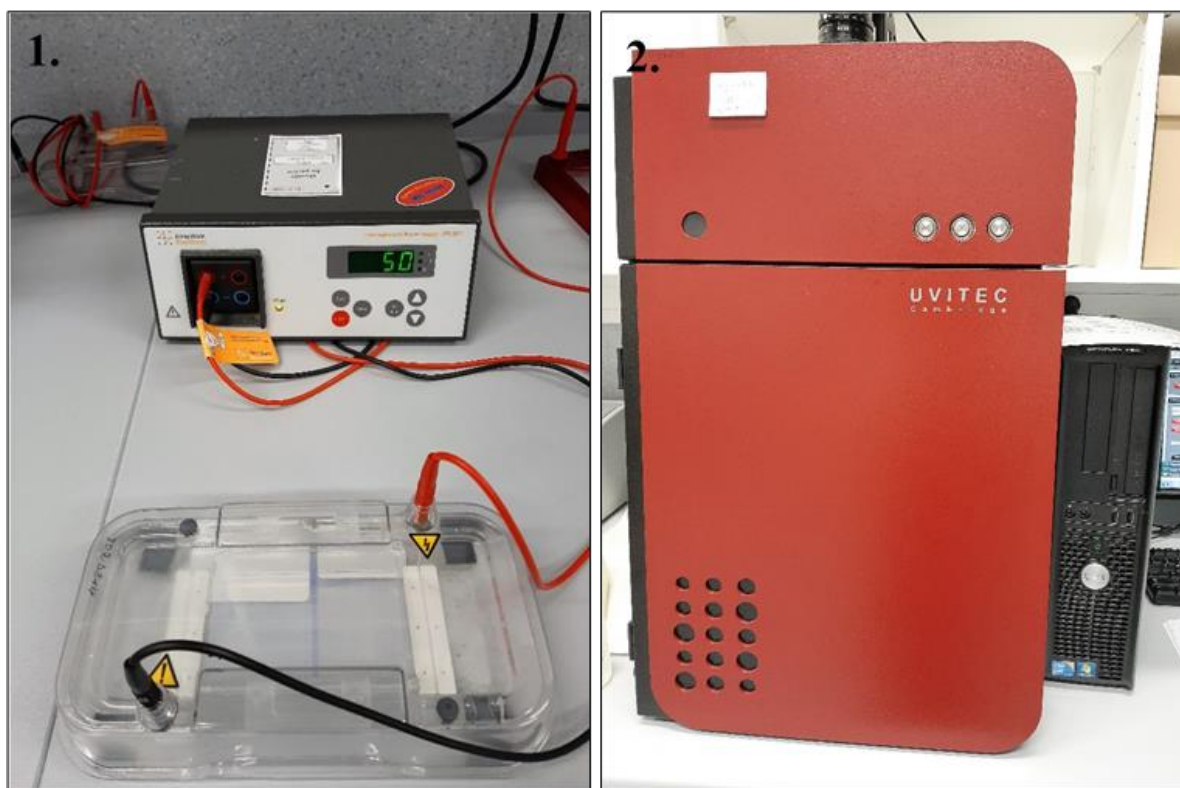
5 lentelė. PGR metu COI geno fragmento pagausinimui naudota programa (Bernotienė, 2010)

Temperatūra (°C)	Ciklo trukmė (min.)	Ciklo kartojimo skaičius
94	10	-
94	0,5	35
49	30	
72	2	
72	10	-

Po polimerazinės grandininės reakcijos, mėgintuvėliai laikomi 4°C temperatūroje.

2.5. Gelio elektroforezė

DNR fragmentų ilgio arba jų buvimo nustatymui yra pasitelkiamas elektroforezės metodas. Šiam metodui yra naudojamas elektroforezės aparatas su dviem buferinių tirpalų rezervuarais, kuriuose yra skirtingų krūvių elektrodai (4 pav. 1). Elektroforezės rezultatai stebimi pasitelkus „UVITEC Cambridge“ kompiuterinę gelio dokumentavimo sistemą (CCD kamerą, vaizdo gavimo elektroniką ir programinę įrangą) (4 pav. 2).



4 pav. Gelio elektroforezės metodo metu naudojama aparaturą. 1. – Elektroforezės aparatas; 2. – „UVITEC Cambridge“ kompiuterinė gelio dokumentavimo sistema (CCD kamera, vaizdo gavimo elektronika ir programinė įranga)

2.5.1. Agarozės gelio ruošimas

Laikantis agarozės paruošimo protokolo pagaminamas 100ml agarozės gelio. Kolboje yra sumaišomi 90ml distiliuoto vandens ir 10ml TBE buferio. Į kolbą su 100ml tirpalu toliau yra beriami 1,5 g agarozės milteliai ir ši yra šildoma mikrobangų krosnelėje, kol agarozės milteliai visiškai ištirpsta. Tirpalas yra atvėsintas iki kambario temperatūros ir į jį yra įlašinami 4 lašai etidžio bromido. Paruoštas elektroforezės gelis yra supilamas į elektroforezės gelio gamybai skirta formelę su į ją įstatytais šakutėmis, mėginio užnešimo šulinėlių sudarymui ir paliekamas sustingti maždaug 30 minučių.

2.5.2. Elektroforezė

Geliui sustingus yra pradedami ruošti DNR mėginiai elektroforezei. PGR metu amplifikuota DNR yra sumaišoma su „MassRuler DNR Loading Dye (6X)“ dažais (5μl DNR mėginio sumaišoma su 1μl DNR dažo).

Išėjus šakutes, sustingęs agarozės gelis yra įdedamas į elektroforezės aparatą, pripildyta TBE elektroforezės tirpalo (90ml vandens x 10ml TBE buferio). Į gelyje mėginių užnešimui suformuotus šulinėlius yra įleidžiami 6 μl FastRuler molekulinio ilgio žymens („FastRuler Low Range DNR Ladder“

liniuotė), elektroforezei paruošti DNR mėginiai ir kontrolės. Suleidus visus mėginius yra uždaromas ir įjungiamas elektroforezės aparatas, kuriuo elektros srovė per gelį su mėginiais yra leidžiama maždaug 15 minučių.

2.5.3. Elektroforezės rezultatų gavimas

Po elektroforezės rezultatai yra stebimi pasitelkus kompiuterinę gelio dokumentavimo sistemą. Pasibaigus elektroforezei gelis yra pernešamas į CCD ultravioletinė vaizdų kamerą, kuri yra susieta su programine įranga kompiuteryje. Kompiuteryje įjungiamą UVITEC „FireReader“ programa. Nuspaudus „Start Preview“ funkciją kompiuteryje, kol aparatas yra atidarytas, ekrane yra matomas įdėtas agarozės gelis. Įsitikinama, jog gelis yra lygiai įdėtas, pataisoma, kad šulinėliai būtų matomi vaizdo viršuje, kamera yra uždaroma ir išjungiama peržiūra su „Stop Preview“ funkcija. Nuspaudus UV mygtuką, įjungiama funkciją „Auto Exposure“, pasibaigus reguliavimui išjungiamas UV, o ekrane yra matomi rezultatai.

2.6. Sekų analizė

Teigiamų DNR mėginių sekoskaitos rezultatai, nukleotidų sekos, sulyginamos naudojant „Bioedit“ sekų sulyginimo programos 7.2.5 versiją (Hall, 1999). DNR sekos palyginamos su homologinėmis, anksčiau publikuotomis sekomis, saugomomis Nacionalinio biotechnologijų informacijos centro (angl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) genų banko (GenBank) duomenų bazeje, naudojantis BLAST (angl. *Basic local alignment search tool*) programa. Po daugybinio sekų sulyginimo „Bioedit“ programoje, sekos rankinių būdų sutrumpintos, kad prasidėtų ir baigtųsi tokiose pačiose nukleotidų pozicijose, būtų vienodo ilgio.

Tolimesnei sutvarkytų sekų filogenetinei analizei buvo naudojama MEGA X programa (Kumar *et al.*, 2018), kurioje pasirinkus tinkamiausią metodą ir parametrų modelį, sudarytas filogenetinis medis, kurio pagalba yra nustatomi filogenetiniai ryšiai.

2.7. Statistinė analizė

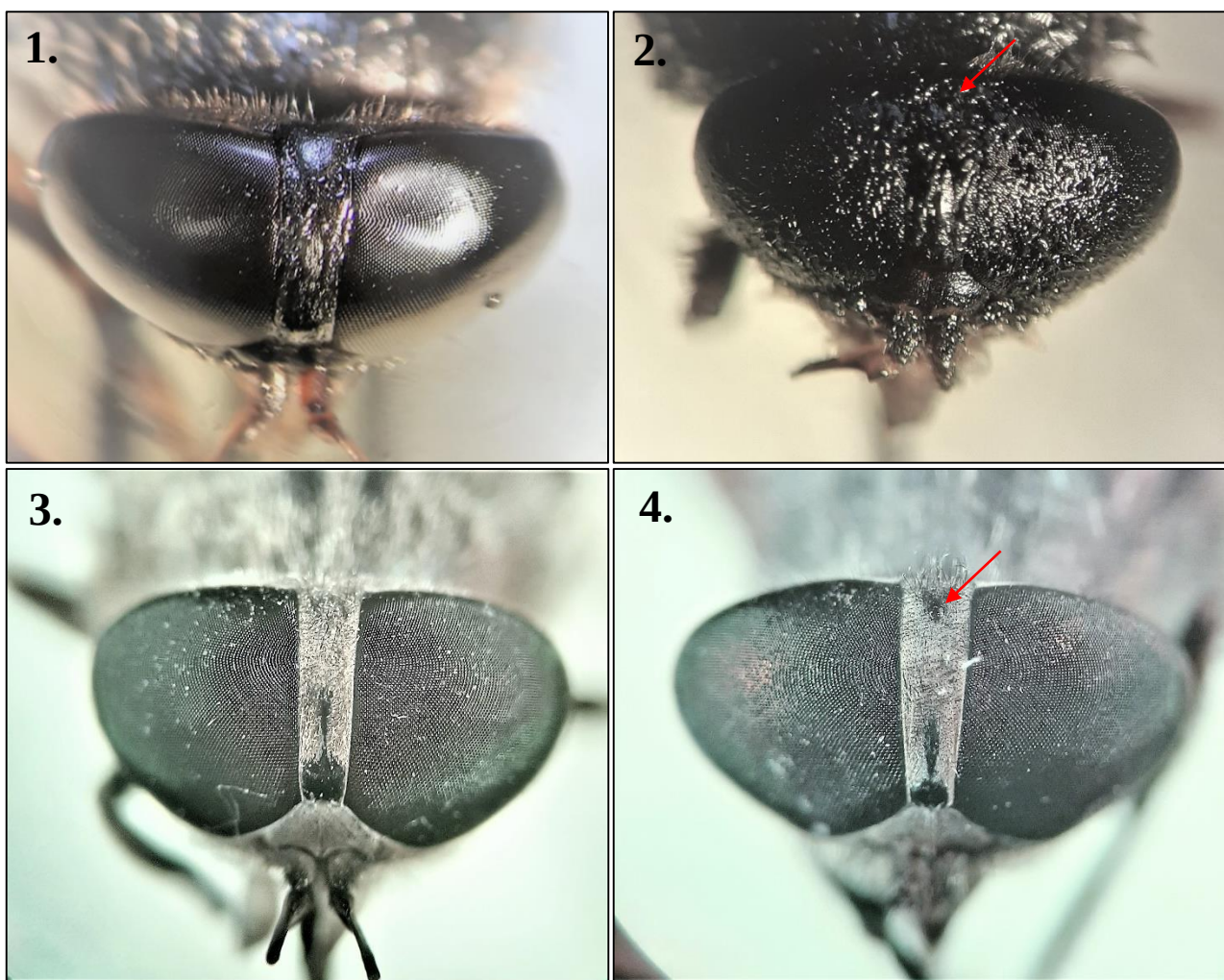
Atlikta statistinė analizė, kurios metu naudojant programos PSPP 1.2.0 versija, buvo atliekamas Chi-kvadrato ar Fišerio tikslusis testas (nedidelėms imtims), kokybinių požymių ryšiui ir gautų rezultatų patikimumui nustatyti. Duomenys buvo laikomi patikimais, statistiškai reikšmingais, kai $p < 0.05$ ir statistiškai nereikšmingais kai $p > 0.05$.

3. REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ

3.1. Tabanidae šeimai priklausančių rūšių morfologinis identifikavimas

Tyrimo metu buvo analizuojami 112 vabzdžių, priklausančių Tabanidae šeimai. Vabzdžiai iki jų analizės buvo laikomi 96 % etanolyje, kas sukėlė tam tikrų nepatogumų jų būdinimo metu. Norint geriau pamatyti kai kuriuos skiriamuosius požymius, iš mėgintuvėlių išimti vabzdžiai kuriam laikui turėjo būti palikti pradžiūti. Septynių tyrime analizuojamų Tabanidae šeimos atstovų identifikacijai prireikė pasitelkti molekulinis tyrimo metodus, nes morfologinės analizės būdu nebuvo įmanoma prieiti prie patikimo morfologinių požymių identifikavimo, tikslaus rūšies nustatymo. Visgi, likusi, didžioji tyrime nagrinėjamų musių dalis buvo identifikuota morfologinių požymių pagalba, pasitelkus metodikoje pateiktus raktus. Visos sugautos ir šiame darbe analizuojamos Tabanidae musės buvo patelės, būdinamos pagal atitinkamus šiai lyčiai identifikavimo raktus.

Surinkti vabzdžiai buvo nesunkiai atrinkti ir priskirti Tabanidae šeimai, pagal šiai šeimai būdingus bruožus. Sudėtingesnis etapas buvo vabzdžių diagnostika genties lygmenyje. *Chrysops* ir *Haematopota* genties atstovai pasižymėjo specifiniais, unikaliais požymiais, pilvelių ar sparnų spalvomis ir raštais, kurie buvo lengvai pastebimi tarp iš mėgintuvėlių išimtų šių genčių musių. Sunkumų kilo identifikuojant *Hybomitra* ir *Tabanus* genčių muses, ypač dėl šių musių laikymo būdo. *Hybomitra* ir *Tabanus* yra gausios rūšimis gentys jungiančios daugiau kaip 150 (*Hybomitra*) ir daugiau nei 1050 (*Tabanus*) rūšių, o varijuojantys morfologiniai rūšių požymiai, sukelia problemų siekiant tiksliai identifikuoti rūšis. Šių dviejų genčių musės iš pirmo žvilgsnio turi daugybę panašumų, dėl kurių gali būti sunkiai atskiriamos. Tai paaiškina ir tai jog iki 1922 metų *Hybomitra* genties atstovai buvo priskiriami *Tabanus* genčiai (Falck, 2014). Vienas pagrindinių skiriamųjų požymių, padedančių atskirti šias dvi gentis vieną nuo kitos – vabzdžio viršugalvyje matomas blizgus gumbas. Visi *Hybomitra* genties atstovai turi šį gumbą savo viršugalvyje, tuo tarpu *Tabanus* genties vabzdžiams šis iškilimas nėra būdingas (Krčmar *et al.*, 2011; Falck, 2014). Visgi, šlapiuose preparatuose šie požymiai buvo sunkiai pastebimi, nes šlapiuose individuose dauguma paviršių yra blizgūs (5 pav. 1, 2), tad tik kelias paras palikus šiuos vabzdžius pradžiūti buvo įmanoma aiškiai matyti skiriamąjį genčių požymį ir priskirti jį vienai ar kitai genčiai (5 pav. 3, 4).



5 pav. *Hybomitra* ir *Tabanus* genčių identifikacinio, išskiriamąjo bruožo – gumbo pakaušyje, buvimas/nebuvimas, šlapiuose ir sausuose preparatuose. Šlapias preparatas: 1- *Tabanus maculicornis*, 2- *Hybomitra nitridifrons*; Sausas preparatas: ; 3- *Tabanus bromius*, 4- *Hybomitra lapponica*. Raudona rodyklė nukreipta į išskiriamąjį požymį ant musės viršugalvio. (20x padidinimas)

Šlapių preparatų identifikavimas sukelia problemų ir siekiant identifikuoti atskiras rūšis. Šlapiuose *Hybomitra* genties atstovuose yra sunkiai matomas kaktos ilgio ir pločio santykis, kuris yra svarbus būdinimo raktuose aprašomas požymis, leidžiantis toliau eiti raktu ir teisingai identifikuoti skirtingas rūšis.

Visų Tabanidae šeimos vabzdžių būdinimas rūšies lygmenyje dėl nepastovių identifikavimo požymių ir tam tikrų mechaninių pažeidimų taip pat iškėlė sunkumų morfologinei analizei. *Haematopota* genčiai priklausančių vabzdžių būdinimui svarbus požymis – antenų narelių spalva ir forma, kai kuriuose tyrime analizuojamuose individuose buvo nematomas dėl nulūžusių antenų. Taip pat ir toks požymis, kaip rudos dėmės ant vabzdžio pilvelio, yra nepatikimas, galintis kisti tarp atskirų tos pačios rūšies individų.

3.2. Tabanidae šeimos rūšių analizė

Remiantis morfologinės identifikacijos ir molekulinio metodo pagalba identifikuotos 14 Tabanidae šeimos rūšių, priklausančių keturioms gentims: *Chrysops*, *Haematopota*, *Hybomitra* ir *Tabanus*. Visi vabzdžiai buvo sugauti 6 skirtingose Lietuvos vietose – Ažuolų Būdoje, Ilgakiemyje, Papilėje, Poškaičiuose, Sirvyduose ir Sviliuose. Identifikuotų vabzdžių pasiskirstymas, sugavimo teritorijose yra pateiktas 6 lentelėje.

6 lentelė. Tyrimo metu analizuojamų skirtingų Tabanidae šeimos rūšių atstovų pasiskirstymas, pagal jų surinkimo vietovę skirtingose Lietuvos teritorijose

Tabanidae rūšis	Vietovė						Rūšies atstovų skaičius
	Ažuolų Būda	Ilgakiemis	Poškaičiai	Sirvydai	Papilė	Sviliai	
<i>Chrysops caecutiens</i>	-	-	-	1	-	-	1
<i>Chrysops italicus</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>Chrysops relictus</i>	1	-	-	2	-	-	3
<i>Haematopota crassicornis</i>	-	-	1	-	-	-	1
<i>Haematopota pluvialis</i>	1	-	3	11	1	1	17
<i>Haematopota subcylindrica</i>	3	-	2	9	-	-	14
<i>Hybomitra bimaculata</i>	-	2	1	-	-	-	3
<i>Hybomitra distinguenda</i>	-	-	1	-	-	-	1
<i>Hybomitra lapponica</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>Hybomitra lurida</i>	-	-	-	-	-	1	1
<i>Hybomitra muelhfeldi</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>Hybomitra nitidifrons</i>	-	18	-	-	-	-	18
<i>Tabanus bromius</i>	2	3	-	17	-	-	22
<i>Tabanus maculicornis</i>	-	26	-	2	-	-	28
Individų kiekis vietovėse:	8	51	8	42	1	2	112

Didžiausia rūšinė įvairovė tarp tyrime analizuojamų Tabanidae musių nustatyta *Hybomitra* gentyje, mažiausia – *Tabanus* gentyje. Iš 14 tyrimo metu identifikuotų rūšių, 6 priklausė *Hybomitra* genčiai (*Hybomitra bimaculata*, *H. distinguenda*, *H. lapponica*, *H. lurida*, *H. muelhfeldi*, *H. nitidifrons*), 3 rūšys

priklausė *Chrysops* genčiai (*Chrysops caecutiens*, *C. italicus*, *C. relictus*), 3 rūšys – *Haematopota* genčiai (*Haematopota crassicornis*, *H. pluvialis*, *H. subcylindrica*) ir 2 rūšys – *Tabanus* genčiai (*Tabanus maculicornis*, *T. bromius*).

Individų gausumas genties lygmenyje nėra tolygus. Tarp 112 sugautų Tabanidae vabzdžių, dominuoja *Tabanus* genties atstovai (50 individų), po kurių seka *Haematopota* genties (32 individai) ir *Hybomitra* genties atstovai (25 individai), o mažiausią tyrime analizuojamų individų dalį sudaro *Chrysops* genties atstovai (5 individai).

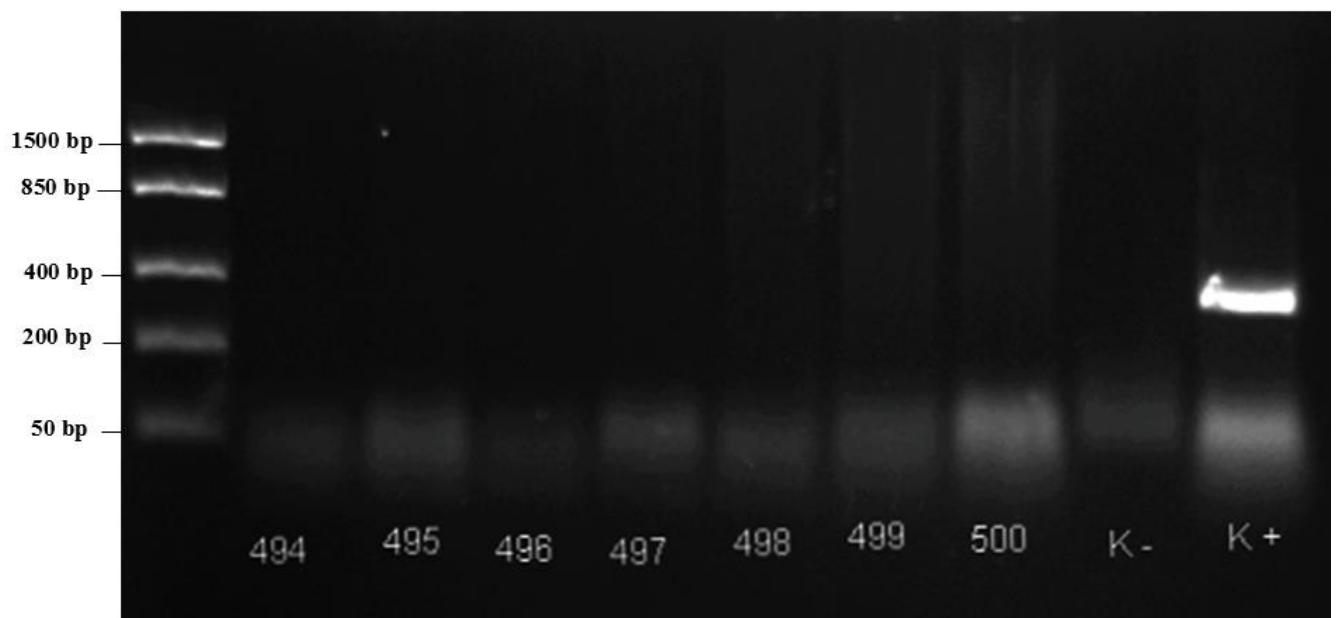
Tyrimo metu nagrinėtų 14 Tabanidae šeimos rūšių tarpe gausiausiai pasitaikiusi rūšis buvo *Tabanus maculicornis*, kurioje nustatyti 28 nagrinėjami individai. Antroji pagal atstovų gausumą nustatyta rūšis yra *Tabanus bromius*, kurioje buvo tirti 22 šios rūšies atstovai. Šios 2 rūšys sudarė 44,64 proc. (50/112) visų tirtų Tabanidae šeimos vabzdžių. Nustatyta 18 musių priklausančių *Hybomitra nitidifrons* rūšiai, 17 *Haematopota pluvialis* ir 14 *Haematopota subcylindrica* rūšims. Taip pat identifikuota po 3 atstovus priklausančius *Chrysops relictus* ir *Hybomitra bimaculata* rūšims. Visoms kitoms identifikuotoms Tabanidae šeimos rūšims priklauso tik po viena individą.

Pagal 6 lentelėje (6 lentelė) pateiktus duomenis, matoma, jog skirtingose vietovėse sugautų vabzdžių skaičius ir rūšinė įvairovė skiriasi. Dėl šio pasiskirstymo pirmiausiai svarbu atsižvelgti ir į tai, jog 4-iose teritorijose (Ažuolų Būda, Ilgakiemis, Poškaičiai, Sirvydai) vabzdžiai buvo gaudomi ir surenkami NZI gaudyklėmis visą sezoną (gegužės - spalio mėnesiais), tuo tarpu kituose 2-uose AKM protrūkių židiniuose (Papilė ir Sviliai) Tabanidae šeimai priklausančios rūšys buvo pagautos vienkartinio gaudymo metu pasitelkus entomologinį tinklą. Vienkartinio gaudymo metu yra sugauti kur kas mažesni vabzdžių skaičiai. Dėl mažo pagautų individų skaičiaus Papilėje (1) ir Sviliuose (2), šiose teritorijose matoma ir nedidelė rūšinė įvairovė. Tuo tarpu, kitose teritorijose, su pastatytomis gaudyklėmis atitinkamai pastebimas ir kur kas didesnis vabzdžių skaičius, ir rūšinė įvairovė. Ilgakiemis ir Sirvydai, kuriuose buvo sugauti didžiausi tyrime analizuojamų Tabanidae šeimos musių kiekiai, pasižymi ir didžiausia rūšine įvairove, kurią sudaro 6 skirtingos šios šeimos rūšys kiekvienoje iš teritorijų. Galimai didesnę įvairovę lėmė ir pastatytų gaudyklių vietos, pavyzdžiui tai, kad Ilgakiemyje gaudyklė buvo pastatyta miške. Ilgakiemyje tarp visą tyrimo laikotarpį pagautų 51-os Tabanidae musių, dominavo *Tabanus maculicornis* (26 individai) ir *Hybomitra nitidifrons* (18 individai) rūšys. Antroje pagal tyrimo metu surinktų nagrinėjamos šeimos atstovų gausumą vietoje – Sirvyduose, kur buvo pagauti 42 individai, gausiausiai aptinkamos buvo *Haematopota pluvialis* (11 individų), *Haematopota subcylindrica* (9 individai) ir *Tabanus bromius* (17 individų). Likusios šio tyrimo metu analizuojamų Tabanidae šeimos vabzdžių pagavimo vietos pasižymi kur kas mažesniais sugautų individų kiekiais. Tiek Ažuolų Būdoje, tiek Poškaičiuose buvo sugauta po 8 šiai šeimai priklausančias muses. Kiekvienoje iš teritorijų vabzdžius

pavyko identifikuoti ir priskirti 5 skirtingoms rūšims. Pošakaičiuose viso sezono metu sugautos skirtingos rūšys priklausė 2 gentims (*Haematopota* ir *Hybomitra*), tuo tarpu Ažuolų Būdoje identifikuotos 5 skirtingos rūšys, priklausančios 3 gentims (*Chrysops*, *Haematopota*, *Hybomitra*).

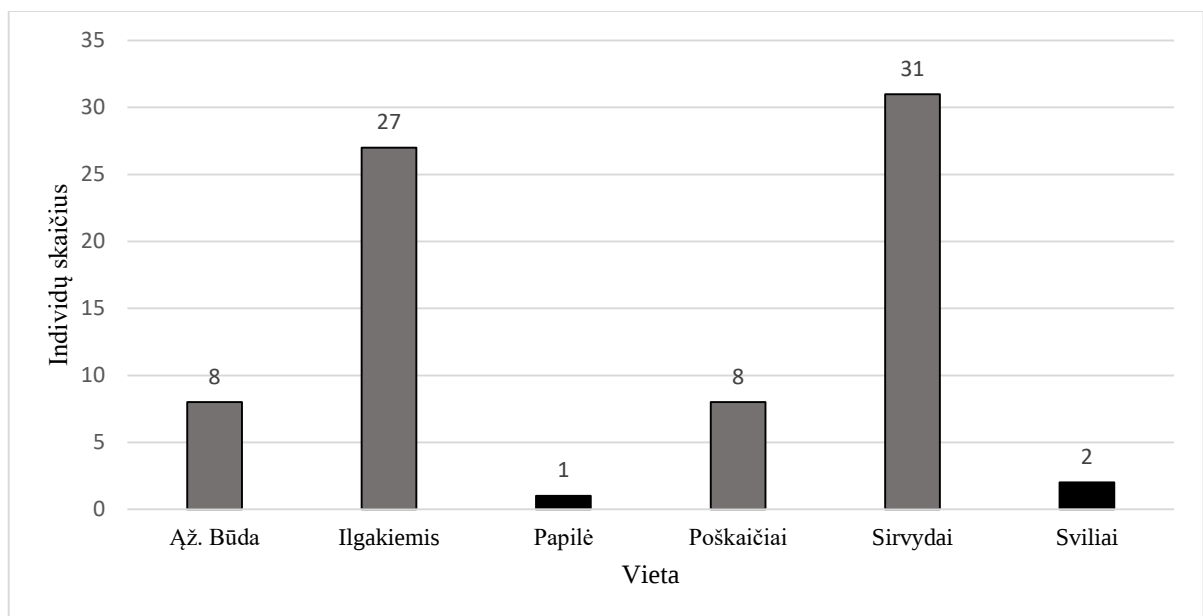
3.3. Afrikinio kiaulių maro viruso DNR Tabanidae šeimos vabzdžiuose analizė

Viruso buvimui Tabanidae šeimos vabzdžiuose nustatyti buvo tikrinami 77 mėginiai su iš šios šeimos vabzdžių išskirta DNR. Visi tikrinami šios šeimos atstovai priklausė vienai iš 14 prieš tai tyrime identifikuotų rūšių. Darbe pateikta viena iš gelio elektroforezės rezultatų nuotraukų (6 pav.) parodo šio Afrikinio kiaulių maro viruso buvimą/nebuvimą analizuotuose vabzdžiuose.



6 pav. DNR elektroforezės 1,5% agaroziniame gelyje vaizdas, rodantis AKM viruso PGR rezultatus. Pirmajame (Kairėje) takelyje – DNR ilgio žymenys. K- takelyje – neigiama kontrolė, K+ – teigiama kontrolė, 210 mėginys (326 bp). 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 – tirtų DNR mėginių numeriai

Išanalizavus 77 DNR mėginius, elektroforezės rezultatai parodė, jog nebuvo aptiktas nė vienas teigiamas Afrikinio kiaulių maro viruso mėginys. AKM buvimui nustatyti pasirinkti vabzdžiai buvo surinkti iš 6 teritorijų. Žemiau esančiame grafike (7 pav.) yra pateikta informacija apie tai, kiek ir iš kokių teritorijų surinktų Tabanidae šeimos vabzdžių buvo panaudota šioje tyrimo dalyje.

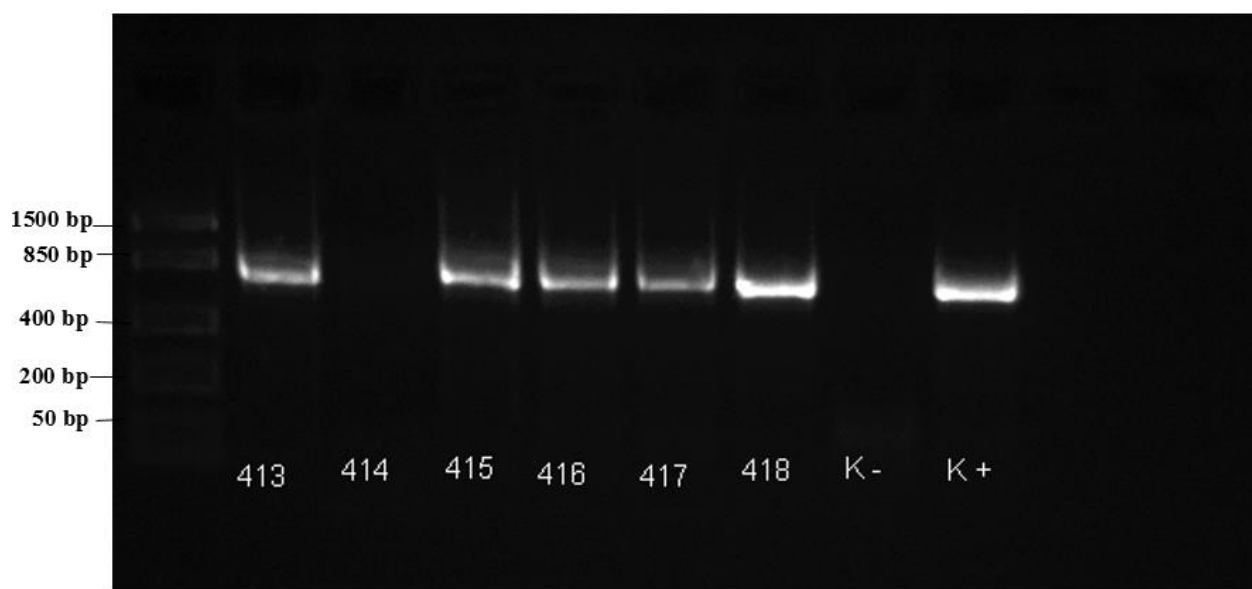


7 pav. Vabzdžių, kuriuose buvo tikrinamas Afrikinio kiaulių maro buvimas, skaičius skirtingose Lietuvos vietovėse. Juoda spalva nuspalvinti vietovių stulpeliai, pažymi AKM židinius, kuriuose vabzdžiai buvo gaudomi vienkartinio gaudymo meto. Pilka spalva nuspalvinti stulpeliai parodo vietas, kuriose vabzdžiai buvo gaudomi NZI gaudyklėmis gegužės – spalio mėnesiais

Dėl šiose teritorijose anksčiau nustatytų AKM užsikrėtimų, čia sutinkami kraujasiurbiai vabzdžiai savo organizmuose gali turėti Afrikinį kiaulių maro virusą ir būti jo nešiotojai, platintojai. Tyrimo metu siekta išsiaiškinti, ar Tabanidae musės pagautos šiose teritorijose taip pat galėjo turėti AKM virusą ir prisidėti prie jo platinimo. Visgi, nė viena iš tyrime analizuojamų Tabanidae šeimai priklausančių rūšių savo organizme neturėjo Afrikinio kiaulių maro viruso.

3.4. *Trypanosoma* sp. DNR Tabanidae šeimos vabzdžiuose analizė

Darbo metu atlikta 101 DNR mėginio, išskirto iš Tabanidae šeimai priklausančių vabzdžių, analizė, nustatyti, ar skirtingose Lietuvos teritorijose sugautos tam tikros Tabanidae šeimos rūšys savo organizmuose turi ir gali pernešti *Trypanosoma* sp. protistus. Gelio elektroforezės rezultatų nuotraukos parodė *Trypanosoma* sp. ligų sukėlėjų buvimą ir nebuvimą Tabanidae vabzdžiuose (8 pav.).



8 pav. DNR elektroforezės 1,5% agaroziniame gelyje vaizdas, rodantis *Trypanosoma* sp. PGR rezultatus. Pirmajame (Kairėje) takelyje – DNR ilgio žymenys. K- takelyje – neigiama kontrolė, K+ – teigiama kontrolė. 413, 414, 415, 416, 417, 418 – tirtų DNR mėginių numeriai. 413, 415, 416, 417, 418 takeliai- nustatyti teigiami *Trypanosoma* sp. tyrimų mėginiai (~770bp). 414 – neigiami *Trypanosoma* sp. tyrimų mėginiai

Ištyrus 101 DNR mėginį, buvo nustatytas 51 teigiamas *Trypanosoma* sp. DNR turintis mėginys. *Trypanosoma* genties ligų sukėlėjų aptikimo Tabanidae šeimos vabzdžiuose PGR rezultatai rodo, kad pusė (50,50 proc.) tyrimo metu analizuotų vabzdžių turėjo šiuos ligų sukėlėjus savo organizmuose. Žemiau pateiktoje lentelėje (7 lentelė) yra nurodoma informacija apie skirtingose Lietuvos vietose sugautus Tabanidae šeimos rūšių atstovus, kuriuose buvo aptiktas šis patogenas.

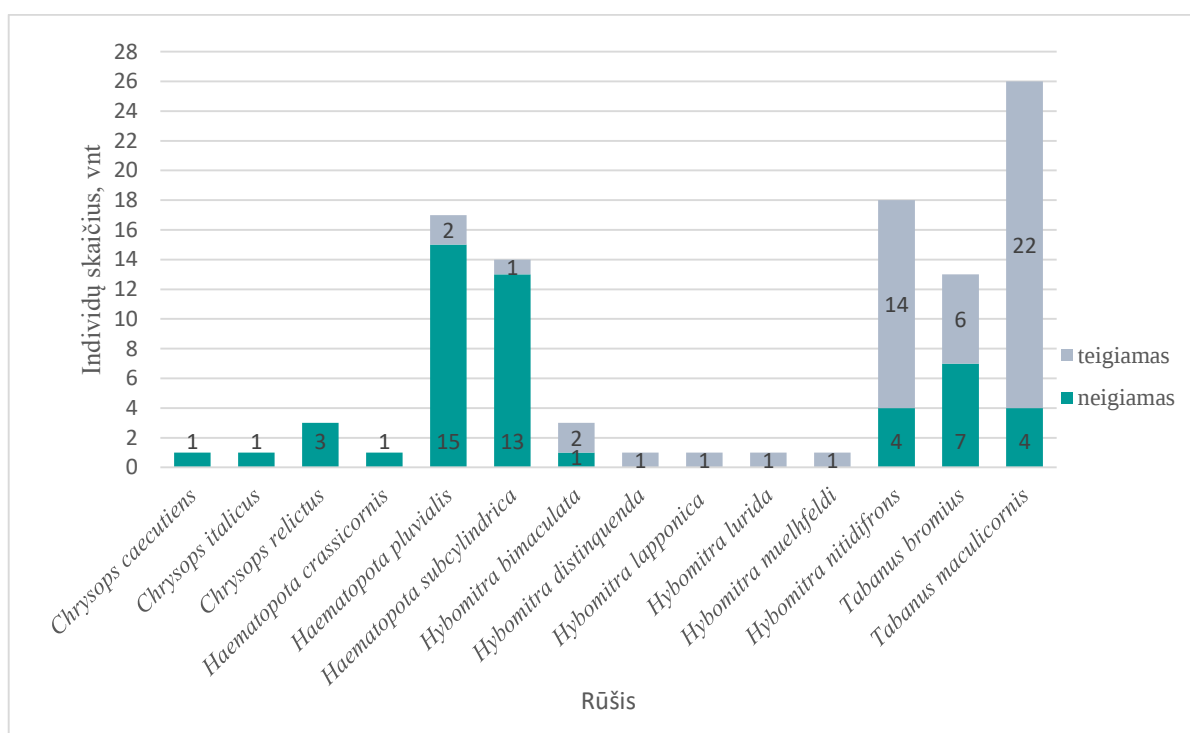
7 lentelė. Duomenys apie skirtingose teritorijose surinktų Tabanidae šeimos rūšių atstovus, kuriuose buvo aptikti *Trypanosoma* sp. protistai

Vieta	Rūšis	Teigiamų mėginių skaičius (ištirtas mėginių skaičius)
Ažuolų Būda	<i>Chrysops italicus</i>	0 (1)
	<i>Chrysops relictus</i>	0 (1)
	<i>Haematopota pluvialis</i>	0 (1)
	<i>Haematopota subcylindrica</i>	1 (3)
	<i>Tabanus bromius</i>	0 (2)
	Visos:	1 (8)
Ilgakiemis	<i>Hybomitra bimaculata</i>	2 (2)
	<i>Hybomitra lapponica</i>	1 (1)
	<i>Hybomitra muelhfeldi</i>	1 (1)

	<i>Hybomitra nitidifrons</i>	14 (18)
	<i>Tabanus bromius</i>	3 (3)
	<i>Tabanus maculicornis</i>	22 (26)
	Visos:	43 (51)
Poškaičiai	<i>Haematopota crassicornis</i>	0 (1)
	<i>Haematopota pluvialis</i>	2 (3)
	<i>Haematopota subcylindrica</i>	0 (2)
	<i>Hybomitra bimaculata</i>	0 (1)
	<i>Hybomitra distinguenda</i>	1 (1)
	Visos:	3 (8)
Sirvydai	<i>Chrysops caecutiens</i>	0 (1)
	<i>Chrysops relictus</i>	0 (2)
	<i>Haematopota pluvialis</i>	0 (11)
	<i>Haematopota subcylindrica</i>	0 (9)
	<i>Tabanus bromius</i>	3 (8)
	Visos:	3 (31)
Papilė (AKM židinys)	<i>Haematopota pluvialis</i>	0 (1)
	Visos:	0 (1)
Sviliai (AKM židinys)	<i>Haematopota pluvialis</i>	0 (1)
	<i>Hybomitra lurida</i>	1 (1)
	Visos:	1 (2)
Bendras visų rūšių atstovų skaičius visose vietovėse:		51 (101)

Lentelėje (7 lentelė) yra pateiktos 6 vietos, kuriose buvo sugauti Tabanidae šeimos vabzdžiai. Teigiami atvejai pasitaikė vabzdžiuose surinktuose penkiose iš šešių teritorijų. Svarbu atkreipti dėmesį į tai, jog dviejose iš vietovių (Papilė ir Sviliai) vabzdžiai buvo surinkti AKM židiniuose, vienkartinį gaudymų metu, tad šių pagautų vabzdžių užsikrėtimas/neužsikrėtimas *Trypanosoma* sp. atspindi situaciją tik tuo gaudymo laiko metu. Papilėje sugautame individe (1 individas) nebuvo nustatytas tiriamo protisto buvimas. Sviliuose iš sugautų dviejų Tabanidae atstovų, viename buvo nustatyta *Trypanosoma* sp. DNR. Kitose keturiose Lietuvos vietovėse rinkti ir analizuojami vabzdžiai buvo sugauti pastatytų gaudyklių pagalba. Didžiausias Tabanidae musių kiekis, kurių DNR mėginiuose buvo aptiktas *Trypanosoma* sp. protistas, buvo nustatytas Ilgakiemyje. Iš šioje vietoje surinktų ir analizuojamų vabzdžių, 84,31 proc. (43/51) buvo nustatytas ligų sukėlėjo buvimas. Poškaičiuose sugautų vabzdžių tarpe užsikrėtę vabzdžiai sudarė 37,50 proc. (3/8), Ažuolų Būdoje – 12,50 proc. (1/8). Teigiamų mėginių skaičius, patvirtinantis *Trypanosoma* sp. buvimą Sirvyduose sugautuose vabzdžiuose, sudarė 9,68 proc. (3/31).

Vabzdžių rūšinė įvairovė ir užsikrėtimo dažnis išsiskiria priklausomai nuo teritorijos, kurioje jie buvo pagauti. Didžiausias skirtingų rūšių užsikrėtimo dažnis buvo Ilgakiemyje (6/6; 100 proc.). Visose šiose šioje teritorijoje pagautose rūšyse pasitaikė užsikrėtusių individų. Kiek mažesnė užsikrėtusių vabzdžių rūšinė įvairovė pastebima Poškaičiuose (2/5; 40 proc.). Ažuolų Būdoje, kur sugauti vabzdžiai priklausė 5 skirtingoms rūšims, tik vienos rūšies, *Haematopota subcylindrica*, atstovai savo organizme turėjo *Trypanosoma* protistą (1/5; 20 proc.). Toks pats dėsniumas pastebimas ir Sirvyduose sugautų vabzdžių tarpe, kur visi užsikrėtę vabzdžiai priklausė tik 1-ai rūšiai – *Tabanus bromius* (1/5; 20 proc.). Sviliuose pagautų musių tarpe viena iš dviejų analizuojamų rūšių, turėjo patogeną. Papildėje sugauta vienintelė rūšis kurios organizme nebuvo aptikta *Trypanosoma* sp. DNR.



9 pav. Tyrimo metų gautų teigiamų mėginių pasiskirstymas rūšyse. Skirtingos spalvos nurodo teigiamų ir neigiamų mėginių pasiskirstymą tirtuose individuose

Dešimtyje iš 14 tyrime analizuojamų Tabanidae šeimos rūšių buvo aptikti *Trypanosoma* protistai (9 pav.). Didžiausias teigiamų mėginių skaičius buvo DNR mėginiuose išskirtuose iš *Tabanus maculicornis* rūšies atstovų. Iš 26 analizuotų šios rūšies atstovų, net 22-iose (84,62 proc.) buvo aptiktas protistas. Ištyrus 18 *Hybomitra nitidifrons* rūšies individų, 12 iš jų (66,66 proc.) buvo rasta *Trypanosoma* sp. DNR.. Iš trijų tiriamų *Hybomitra bimaculata* rūšies vabzdžių, 2-iose (66,66 proc.) rastas *Trypanosoma* patogenas, tuo tarpu iš 13 *Tabanus bromius* vabzdžių užsikrėtusios buvo 5 musės (38,46

proc.). Du teigiami mėginiai nustatyti 17-os *Haematopota pluvialis* musių tarpe (11,76 proc.). *Haematopota subcylindrica* rūšyje, iš ištirtų 14 rūšies atstovų, tik viename (7,14 proc.) buvo aptiktas analizuojamas patogenas. Keturiuose rūšyse (*Hybomitra distinguenda*, *Hybomitra lapponica*, *Hybomitra lurida* ir *Hybomitra muelhfeldi*), kurių buvo ištirta tik po vieną individą, visi mėginiai buvo teigiami, parodantys protistų buvimą. Taip pat 4-iose tyrime analizuojamose rūšyse - *Chrysops caecutiens*, *Chrysops italicus*, *Chrysops relictus* ir *Haematopota crassicornis* nebuvo nustatytas nė vienas individas, kuriame būtų aptiktas *Trypanosoma* genties protistas. Atsižvelgus į analizuojamą gana mažą šių rūšių imtį (9 pav.), negalima padaryti išvados, jog šių rūšių, kuriose nebuvo aptiktas protistas, vabzdžiai nėra *Trypanosoma* spp. vektoriai, nedalyvaujantys šių ligų sukėlėjų pernešime. Tai parodo ir atlikta analizė. Gautų rezultatų patikimumui nustatyti buvo atlikta statistinė analizė, kuri parodė, jog tik *Tabanus maculicornis*, *Tabanus bromius*, *Hybomitra nitidifrons*, *Haematopota pluvialis* ir *Haematopota subcylindrica* rūšių rezultatai buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0.05$), patikimi.

3.5. *Trypanosoma* sp. DNR sekų filogenetinė analizė

Darbo metu gautas 51 teigiamas PGR mėginys, kuriuose buvo rasta *Trypanosoma* sp. DNR. Šie mėginiai buvo nusiųsti sekvenavimui. Iš 51 sekvenuotos sekos buvo atrinkta 30 sekų tolimesnei filogenetinei analizei. Gautos maždaug 770 bp nusekvenuotos 18S SSU rRNR sekos pirmiausia buvo palygintos tarpusavyje ir tuomet su Genų banke esančiomis sekomis. Galutinis sutvarkytų ir tyrime analizuojamų sekų fragmentų ilgis buvo 748 nukleotidai. Žemiau esančioje 8 lentelėje yra pateikta informacija apie sekas, atsisiųstas iš Genų banko, kurios buvo naudojamos palyginimui ir tolimesnei analizei. Sekos parinktos naudojantis NCBI BLAST programa.

8 lentelė. Duomenys apie Genų banke pateiktas sekas, kurios kartu su šio tyrimo metu išskirtomis sekomis, buvo naudojamos filogenetinio medžio kūrimui

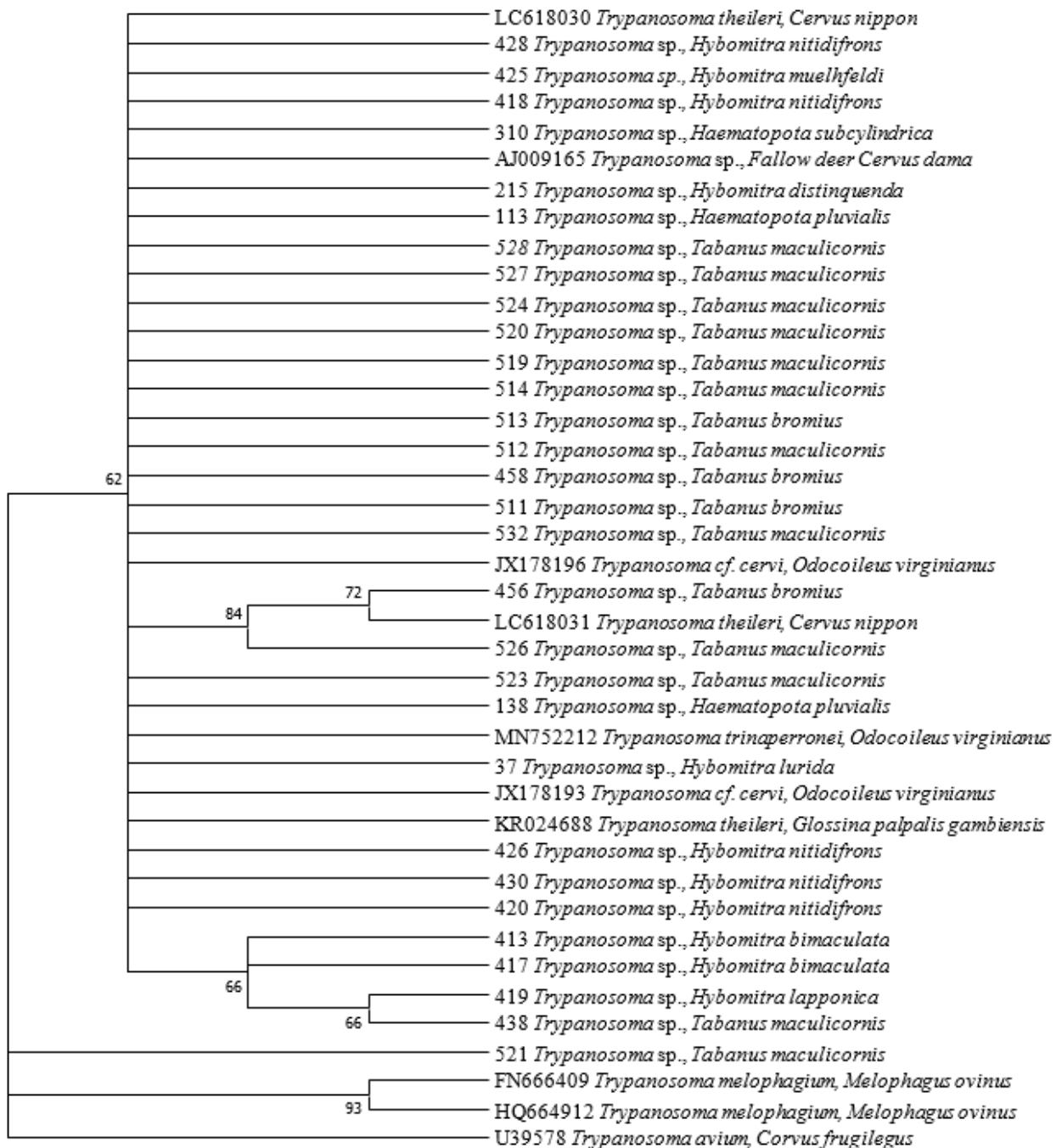
<i>Trypanosoma</i> rūšis	GenBank prieigos numeris	Šeimininkas	Kilmės šalis	Šaltinis (nuoroda)
<i>T. avium</i>	U39578	Paprastasis kovas <i>Corvus frugilegus</i>	Čekija	Maslov <i>et al.</i> , 1996
<i>T. cf. cervi</i>	JX178193	Baltauodegis elnias <i>Odocoileus virginianus</i>	JAV	Fisher <i>et al.</i> , 2013
<i>T. cf. cervi</i>	JX178196	Baltauodegis elnias <i>Odocoileus virginianus</i>	JAV	Fisher <i>et al.</i> , 2013
<i>T. melophagium</i>	FN666409	Musė <i>Melophagus ovinus</i> (Šeima: Hippoboscidae)	Škotija (UK)	Gibson <i>et al.</i> , 2010
<i>T. melophagium</i>	HQ664912	Musė <i>Melophagus ovinus</i> (Šeima: Hippoboscidae)	Kroatija	Garcia <i>et al.</i> , 2011

<i>T. sp.</i>	AJ009165	Danielius <i>Cervus dama</i>	Vokietija	Stevens <i>et al.</i> , 1999
<i>T. theileri</i>	KR024688	Musė cėcė <i>Glossina fuscipes fuscipes</i>	Centrinės Afrikos Respublika	Votypka <i>et al.</i> , 2015a
<i>T. theileri</i>	LC618030	Dėmėtasis elnias <i>Cervus nippon</i>	Japonija	Nepublikuota
<i>T. theileri</i>	LC618031	Dėmėtasis elnias <i>Cervus nippon</i>	Japonija	Nepublikuota
<i>T. trinaperronei</i>	MN752212	Baltauodegis elnias <i>Odocoileus virginianus</i>	Venesuela	Garcia <i>et al.</i> , 2020

Visos tyrimo metu analizuojamos sekos buvo labai panašios ar identiškios. BLAST programos pagalba, sulyginus gautas su genų banke esančiomis sekomis, nustatyta, jog net 16 sekų buvo identiškios (100 proc.) su *Trypanosoma theileri* rūšimi (LC618030), kurios seka išskirta iš dėmėtojų elnių *Cervus nippon* mėginių Japonijoje, bei *Trypanosoma sp.* (AJ009165), išskirta iš Danieliaus *Cervus dama* Vokietijoje. Taip pat visiškai identiškumu (100 proc.) su *Trypanosoma cf. cervi* (JX178193) išskirta iš Baltauodegių elnių *Odocoileus virginianus* Jungtinėse Amerikos Valstijose, ir *Trypanosoma theileri* rūšimi (KR024688), kurios seka išskirta iš Centrinėje Afrikos Respublikoje sugautos musės cėcė *Glossina fuscipes fuscipes* (KR024688), pasižymi 3 šio tyrimo metu gautos sekos. Likusieji (11) *Trypanosoma sp.* izoliatai pasižymėjo 99,60 - 99,73 proc. arba 99,87 proc. panašumu į šias dvi rūšis. *Trypanosoma theileri* ir *Trypanosoma cf. cervi* sekų izoliatai dažniausiai arba tarpusavyje skyrėsi 1-2 nukleotidais, arba visiškai nesiskyrė ir su dauguma sekų sudarė vienodą procentinę identiškumą. Visiškų tapatumu (100 proc.) tarpusavyje pasižymi *Trypanoma theileri* KR024688, ir *T. cf. cervi* JX178193 sekos. Svarbu atkreipti dėmesį į tai, jog *Trypanosoma cf. cervi* pavadinime yra naudojama santrumpa „cf.“. Ši santrumpa paprastai naudojama apibūdiant taksoną, kurio identifikacija, priskyrimas, dėl tam tikrų priežasčių yra neaiški, abejotina (Votypka *et al.*, 2015b). Tad neaiškus šio izoliato statusas rodo galimybę, jog mūsų mėginiuose aptiktos ne atskiros, bet ta pati rūšis. Tyrimo metu visos gautos iš Tabanidae šeimos *Trypanosoma sp.* sekos taip pat parodė giminingumą su *Trypanosoma melophagium* (FN666409.1, HQ664912.1) ir *Trypanosoma trinaperronei* (MN752212.1) rūšių izoliatais. Priklausomai nuo tyrimo dalyvaujančios sekos panašumas šioms rūšims varijavo nuo 99,00 iki 99,87 proc.

Palyginus nusekvenuotas 18S SSU rRNR genų sekas, MEGA X programos pagalba, naudojantis mažiausios evoliucijos („Minimum-Evolution“) metodu (Rzhetsk, Nei, 1992), Kimura-2 parametru modeliu (Kimura M., 1980), sudarytas filogenetinis medis (10 pav.). Braižant filogenetinį medį buvo naudojamos 30 tyrimo metu iš Tabanidae šeimos rūšių gautų ir 9 Fasta formatu iš Genų banko atsisiųstų sekų iš 8 šalių, esančių skirtinguose žemynuose (8 lentelė). Taip pat atsisiųsta dar viena seka – kaip

išorinė grupė pasirinkta *Trypanosoma avium* seka (U39578), pasižyminti maždaug 96 – 97 proc. giminingumu nagrinėjamoms rūšims. Filogenetiniu medžiu pavaizduotas *Trypanosoma theileri*, *T. cf. cervi*, *T. melophagium* ir *T. trinaperronei* filogenetinis giminingumas su tyrime nustatytomis sekomis.



10 pav. Minimalios evoliucijos *Trypanosoma* genties atstovų 18S SSU rRNR sekų filogenetinis medis.

Ant šakų esančios imčių kartojimo (angl. bootstrap) reikšmės yra gautos atlikus 1000 pakartojimų. Šakos, kurių vertė nesiekė 50 proc. – pašalintos (Felsenstein, 1985). genų banko sekos pažymėtos tokia tvarka: GenBank prieigos kodas, patogeno rūšis, šeimininkas lotynų kalba. Darbe gautų sekų įvardijimo tvarka: mėginio identifikacinis kodas, vabzdžio rūšys. Išorinė grupė – *Trypanosoma avium*.

Sudarytas filogenetinis medis iš *Trypanosoma* genties individų 18S SSU rRNR geno sekų parodė, jog nemaža dalis tiriamų sekų pasižymi dideliu panašumu ir susigrupuoja į vieną grupę. Šioje grupėje pasiskirsto 29 sekos, kurias sudaro 23 tyrimo metu išskirtos ir 6 iš genų banko atsisiųstos sekos. Atsiųstų sekų tarpe yra ir *T. theileri*, *T. cf. cervi*, *T. trinaperronei* ir *Trypanosoma* sp. izoliatai. Visos šioje vietoje išsidėsčiusios sekos yra neišspręstos. Nėra pakankamai patikimos informacijos spręsti apie tikslesnį jų evoliucinį išsiskyrimą ir atsišakojimą. Taip pat šioje grupėje matomi ir keli išsišakojimai sugrupuojantys likusias rūšis ir teigiantys apie skirtingų rūšių artimesnius evoliucinius ryšius tarpusavyje. Toks atsiskyrimas matomas tarp sekų išskirtų iš Tabanidae musių *Tabanus bromius* (Nr. 456), *Tabanus maculicornis* (Nr. 526) ir iš dėmėtojo elnio *Cervus nippon* išskirtos *Trypanosoma theileri* (LC618031). Nors, visos 3 sekos pasižymi identišku nukleotidu skaičiumi ir pozicijomis tarpusavyje (100 proc.), Nr.456 ir LC618031 sekos vaizduojamos kaip kiek artimesnės. Filogenetinio medžio grupės viduje yra susidariusi dar viena atskira šaka, sugrupuojanti 4 sekas išskirtas iš *Hybomitra lapponica* (419), *Tabanus maculicornis* (438) ir dviejų *Hybomitra bimaculata* (413, 417) musių. Tai parodo, kad šios šakos izoliatai turi daugiau panašumų ir skiriasi nuo kitų medyje esančių sekų. Visos 4 sekos yra vienodos tarpusavyje, bet skiriasi nuo kitų filogenetiniame medyje 5 arba 6 nukleotidais. Iš *Tabanus maculicornis* išskirta seka Nr. 521 kur kas labiau nutolo filogenetiniame medyje, nors ir nuo kitų tyrime analizuojamų sekų skyrėsi ypač nežymiai (vienu nukleotidu). Panaši situacija yra ir su *Trypanosoma melophagium* protistą koduojančiomis sekomis (FN666409, HQ664912), kurios skiriasi atitinkamai 3 ir 4 nukleotidais.

Įvairiuose literatūros šaltiniuose *Trypanosoma theileri*, *T. cf. cervi*, *T. melophagium* ir *T. trinaperronei* rūšys dažnai gali būti priskiriamos *Megatrypanum* trypanosomų grupei, nors filogenetinės analizėje kai kurios jų gali būti priskiriamos „*Trypanosoma with unspecified subgenus*“. Šios rūšys yra aptinkamos naminiuose ar laukiniuose atrajotojuose, siejamos su žinduolių pobūriu *Ruminantia*. *Trypanosoma theileri* yra priskiriama tai pačiai *Megatrypanum* trypanosomų grupei, kartu su *Trypanosoma melophagium*, o W. Gibsono ir kitų mokslininkų (Gibson *et al.* 2010) teigimu dėl *T. theileri* ir *T. melophagium* pasižymėjimo ypač artimu genetiniu panašumu, *T. melophagium* yra nuo *T. theileri* atsiskyrusi evoliucinė linija, kuri yra pernešama *Melophagus ovinus* (Hippoboscidae) musių, tapo specifinių avių patogenų (Gibson *et al.* 2010; Magri, 2021).

Aptikti *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma trinaperronei*, *Trypanosoma melophagium* ar *Trypanosoma cf. cervi* protistai neparodė reikšmingo specifiškumo tiriamoms Tabanidae šeimos rūšims kaip vektoriams. Greičiausiai, pasiskirstymas skirtingose vabzdžių rūšyse priklauso nuo pasiekiamo užsikrėtusio gyvulio maitinimosi metu. Protistų rūšių įvairovė galėtų priklausyti nuo geografinės vietovės, gyvulių, auginamų ar paplitusių šiose teritorijose, ir Tabanidae rūšių polinkio maitintis tam

tikrų stambesnių gyvulių krauju. Išsamesnei vektoriaus ir patogeno, ar šeimininko ir parazito, santykių specifikai ir šios *Trypanosoma* grupės evoliucinės linijos išsiskyrimui reikalingi tolimesni tyrimai.

IŠVADOS

1. Atlikta literatūros šaltinių analizė parodė, kad Tabanidae šeimos vabzdžiai gali dalyvauti įvairių ligų sukėlėjų, jų tarpe *Trypanosoma* sp. ir galimai Afrikinio kiaulių maro viruso, pernešime.
2. Tyrimo metu apibūdinus 112 Tabanidae šeimos vabzdžių buvo identifikuota 14 rūšių.
3. Tabanidae šeimai priklausančiuose vabzdžiuose nebuvo aptikta Afrikio kiaulių maro viruso DNR, todėl šių rūšių dalyvavimas AKM viruso pernešime ir plitime yra mažai tikėtinas.
4. *Haematopota pluvialis*, *H. subcylindrica*, *Hybomitra bimaculata*, *H. distinguenda*, *H. lapponica*, *H. lurida*, *H. muelhfeldi*, *H. nitidifrons*, *T. bromius* ir *Tabanus maculicornis* rūšių musėse nustatyta *Trypanosoma* sp. DNR, todėl galima teigti, kad šių rūšių musės perneša *Trypanosoma* sp. protistus.
5. Dalis *Trypanosoma* sp. sekų, išskirtų iš skirtingų Tabanidae šeimos rūšių atstovų, parodė 100 proc. tapatumą *T. theileri* ir *T. cf. cervi* rūšims ir panašumą su *T. melophagium*, *T. trinaperronei* sekomis.

KAI KURIŲ RŪŠIŲ SPARVŲ (DIPTERA: TABANIDAE) VAIDMUO LIGŲ SUKĖLĖJŲ PERNEŠIME

SANTRAUKA

Tabanidae šeimos atstovai – kraujasiurbiai vabzdžiai, dėl savo gyvenimo būdo dažnai atliekantys vektorių vaidmenį, mechaninio ar biologinio pernešimo būdais platindami įvairius, tiek nepatogeniškus, tiek gana pavojingus ligų sukėlėjus tarp gyvulių ar žmonių. Atskiros šių vabzdžių rūšys maitinasi specifinių organizmų krauju ir gali pernešti skirtingus patogenus. Žinios apie atskirų rūšių specifiškumą pernešti vienus ar kitus ligų sukėlėjus leistų geriau suprasti ligų sukėlėjų plitimo kelius ir suteiktų galimybę imtis efektyvesnės jų kontrolės platinimo teritorijose.

Šio bakalauro darbo rengimo metu buvo siekta išsiaiškinti skirtingų Tabanidae šeimai priklausančių rūšių vaidmenį dviejų žinomų patogenų, Afrikinio kiaulių maro viruso ir *Trypanosoma* genties protistų, pernešime. Iš šešių teritorijų surinkti Tabanidae vabzdžiai buvo identifikuoti morfologinių tyrimų pagalba. Identifikuota 14 rūšių, didžiausia vabzdžių įvairovė rasta Ilgakiemyje (Kauno raj.). Molekulinių tyrimų pagalba iš vabzdžių buvo išskiriama DNR, kuri toliau buvo tikrinama siekiant nustatyti ligų sukėlėjų buvimą juose. Nebuvo aptiktas nė vienas Afrikinio kiaulių maro viruso atvejis, kuris leistų įvardyti Tabanidaeusių svarbą jo pernešime. Tuo tarpu, 50,5 proc. (51/101) tikrintų vabzdžių buvo aptikta *Trypanosoma* genties protistų DNR. Iš 14 analizuotų Tabanidae šeimai priklausančių rūšių, 10 turėjo *Trypanosoma* sp. DNR. Molekuliniai tyrimai leido toliau identifikuoti šiuos protistus iki rūšies lygio parodant 100 proc. tapatumą su *T. theileri*, *T. cf. cervi* rūšimis, bei didelį panašumą *T. melophagium* ir *T. trinaperronei* rūšių sekoms. Darbo metu gauta informacija apie atskirų Tabanidae rūšių galimą dalyvavimą *Trypanosoma* sp. pernešime, todėl reikalingi tolimesni išsamesni tyrimai, kurie galėtų prisidėti prie strategijų kovai su patogenais kūrimo.

ROLE OF SOME HORSEFLY SPECIES (DIPTERA: TABANIDAE) IN THE TRANSMISSION OF DIFFERENT DISEASE AGENTS

SUMMARY

Tabanidae family consist of haematophagous insects, that due to their lifestyle play a role as vectors in the mechanical and biological transmission of large variety of disease agents. Due to various reasons, such as host preference, distinct species of Tabanidae flies can act as vectors to different pathogens. Knowledge of what kind of pathogens are being transmitted by specific species would allow a better understanding how these disease agents are being spread and help coming up with better, more effective control programs.

The main aim of this work is to determine the role of different tabanid species in the transmission of two disease agents: African swine fever virus and *Trypanosoma* genus protists. Fourteen different Tabanidae fly species were identified from six areas in Lithuania. With the help of molecular tests, isolated DNA from the insects was checked to determine the presence of pathogens in them. There were no cases of African swine fever virus detected in Tabanidae flies. Meanwhile, 50,5% (51/101) of tested insects had *Trypanosoma* sp. in their system. Out of 14 species analyzed in this work, the protists were present in 10 of them. Molecular tests allowed the further identification of these protists showing high identity (100 percent) that of a *T. theileri*, *T. cf. cervi* and similarity with *T. melophagium* and *Trypanosoma trinaperronei* species. The collected information on the Tabanidae species' ability to transmit pathogens may contribute to the development of pathogen control strategies.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Arias M., Jurado C., Gallardo C., Fernández-Pinero J, Sánchez-Vizcaíno J. M., 2017. Gaps in African swine fever: Analysis and priorities. *Transboundary and Emerging Diseases* 65: 235-247. DOI: 10.1111/tbed.12695.
- Arias M., Sánchez-Vizcaíno J. M., 2002. African swine fever. Kn.: Morilla A., Yoon K. J., Zimmerman J. J.,(red.). Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa state press: 119-124.
- Baldacchino F., Desquesnes M., Mihok S., Foil L. D., Duvallet G., Jittapalapong S., 2014. Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infection, Genetics and Evolution* 28: 596-615. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.03.029.
- Baldacchino F., Krčmar S., Bernard C., Manon S., Jay-Robert P., 2017. The impact of land use and climate on tabanid assemblages in Europe. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 239 : 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.01.003>.
- Berenger J.M., Parola P., 2017. Arthropod Vectors of Medical Importance. Kn.: Cohen J., Powderly W. G., Opal S. M. (red.). *Infectious Diseases* (Fourth Edition). Elsevier: 104-112. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00012-5.
- Bernotienė R., 2010. On The Culicoides Obsoletus Group Biting Midges In Lithuania: The Fauna, Seasonal Activity And Diversity. *Naujos ir retos Lietuvos vabzdžių rūšys* 22: 5-10.
- Blahó M., Egri Á., Barta A., Antoni G., Kriska G., Horváth G., 2012. How can horseflies be captured by solar panels? A new concept of tabanid traps using light polarization and electricity produced by photovoltaics. *Veterinary Parasitology* 159 (2-4): 353-365. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.016>.
- Botero A., Thompson C. K., Peacock C. S., Clode P. L., Nicholls P. K., Wayne A. F., Lymbery A. J., Thompson R.C.A., 2013. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 2: 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.03.001>.
- Chainey J. E., 1993. Horse-flies, deer-flies and clegs (Tabanidae). Kn.: Lane R.P., Crosskey R. W., Medical insects and arachnids. 1 t. London, Springer Science+Business Media: 310-332.
- Chinery M., 2012. Insects of Britain and Western Europe. London, Bloombury Publishing . Ltd. 320.
- Costard S., Wieland B., De Glanville W., Jori f., Rowland R., Vosloo W., Roger F., Pfeiffer D. U., Dixon L. K., 2009. African swine fever: how can global spread be prevented?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 2683-2696. doi: 10.1098/rstb.2009.0098.

- Desquesnes M., 2004. Livestick Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. OIE (World organisation for animal health), Prancūzija. 192.
- Desquesnes M., Biteau-Coroller F., Bouyer J., Dia M. L., Foil L., 2009. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *International Journal for Parasitology* 39 (3): 333-346.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare, 2010. Scientific Opinion on African Swine Fever. *EFSA Journal* 8(3):149. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1556>.
- Fairchild G. B., 1969. Climates and the Phylogeny and Distribution of Tabanidae. *Bulletin of the Entomological Society of America* 15 (1): 7-11. DOI: 10.1093/besa/15.1.7.
- Falck M., 2014. The Horse Flies (Diptera, Tabanidae) of Norway. *Norwegian Journal of Entomology* 61: 219- 264.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fernández-Piner J., Gallardo C., Elizalde M., Robles A., Gómez C., Bishop R., Heath L., Couacy-Hymann E., Fasina F. O., Pelayo V., Soler A., Arias M., 2012. Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library. *Transboundary and Emerging Diseases* 48-58. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x.
- Fisher A. C., Schuster, Cobb W. J., James A. M., Cooper S. M., . Pérez de León A. A., Holman P. J., 2013. Molecular characterization of Trypanosoma (Megatrypanum) spp. infecting cattle (Bos taurus), white-tailed deer (Odocoileus virginianus), and elk (Cervus elaphus canadensis) in the United States. *Veterinary Parasitology* 197 (1-2): 29-42. doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.037.
- Folmer O. Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-297.
- Gallardo M. C., Reoyo A. T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M. J., Arias M. L., 2015. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Management* 1 (21). DOI: 10.1186/s40813-015-0013-y.
- Garcia H. A., Blanco P. A., Rodrigues A. C., Rodrigues C. M. F., Takata C. S. A., Campaner M., Camargo E. P., Teixeira M. M. G., 2020. Pan-American Trypanosoma (Megatrypanum) trinaperronei n. sp. in the white-tailed deer Odocoileus virginianus Zimmermann and its deer ked Lipoptena mazamae Rondani, 1878: morphological, developmental and phylogeographical characterisation. *Parasites & Vectors* 13: 303. doi.org/10.1186/s13071-020-04169-0.

Garcia H. A., Rodrigues A. C., Martinkovic F., Minervino A. H. H., Campaner M., Nunes V. L. B., Paiva F., Hamilton P. B., Teixeira M. M. G., 2011. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *International Journal for Parasitology* 41 (13-14): 1385-1396. doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.09.001.

Gibson W., Pilkington J. G., Pemberton J. M., 2010. *Trypanosoma melophagium* from the sheep ked *Melophagus ovinus* on the island of St Kilda. *Parasitology* 137: 1799-1804. doi:10.1017/S0031182010000752.

Gratz N. G., 1999. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annual Review of Entomology* 44: 51-75. DOI: 10.1146/annurev.ento.44.1.51.

Haag J., O'hUigin C., Overath P., 1998. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91(1): 37-49. DOI: 10.1016/s0166-6851(97)00185-0.

Hakon, 2009. *Haematopota pluvialis* (Linnaeus 1758). [žiūrėta 2021-05-26]. Prieiga per internetą: <https://flic.kr/p/6DBEjo>.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hurd H., 2019. Disease: Parasite-Modified Vector Behavior. Kn.: Choe J. C. (red.). *Encyclopedia of Animal Behavior (Second Edition)*. Acedamic Press: 663-667. DOI:10.1016/B978-0-12-809633-8.20746-2.

Yahya M. F. Z. R., Abd Hamid U. M. A. Zuraina M. Y. F., 2012. Investigation on Nuclear Transport of *Trypanosoma brucei*: An in silico Approach. Kn.: Pérez-Sánchez H. (red.), *Bioinformatics. InTech*: 31-54.

Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Krčmar S., Hackenberger D. K., Hackenberger B. K., 2011. Key to The Horse Flies Fauna of Croatia (Diptera, Tabanidae). *Periodicum Biologorum* 113: 1-61.

Krinsky W. L., 1976. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *Journal of medical entomology* 13 (3): 225-275. DOI: 10.1093/jmedent/13.3.225.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

Lane R. P., Crosskey R. W., 1993. General introduction. Kn.: Lane R.P., Crosskey R. W., *Medical insects and arachnids*. 1 t. London, Springer Science+Business Media: 1-29.

- Lehane M. J., 2005. The Biology of Blood-Sucking in Insects. New York, Cambridge University Press 2: 337p.
- Luo Y, Atim S.A., Shao L., Ayebazibwe C., Sun Y., Liu Y., Ji S., Meng X.Y., Li S., Li Y., Masembe C., Ståhl K., Widén F., Liu L., Qiu H.J., 2016. Development of an updatar PCR assay for detection of African swine feves virus. *Arch. Virol.* 162(1):191-199. doi:10.1007/s00705-016-3069-3.
- Mackerras I. M., 1954. The classification and distribution of tabanidae (Diptera). *Australian Journal of Zoology* 2 (3): 431- 454.
- Mackerras I. M., Spratt D. M., Yeates D. K., 2008. Revision of the horse fly genera *Lissimas* and *Cydistomyia* (Diptera: Tabanidae: Diachlorini) of Australia. *Zootaxa* 1886: 1-80. DOI:10.11646/ZOOTAXA.1886.1.1.
- Magri A., Galuppi R., Fioravanti M., 2021. Autochthonous Trypanosoma spp. in European Mammals: A Brief Journey amongst the Neglected Trypanosomes. *Pathogens* 10, 334. doi.org/10.3390/pathogens10030334.
- Maslov D. A., Lukeš J., Jirku M., Simpson L., 1996. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology* 75: 197-205. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02526-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02526-X).
- Montgomery R. E., 1921. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 34: 159-191. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(21\)80031-4](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(21)80031-4).
- Morita S.I., Bayless K. M., Yeates D. K., Wiegmann B. M., 2016. Molecular phylogeny of horse flies: a framework for renewing tabanid taxonomy. *Systematic Entomology* 41: 56-72. DOI: 10.1111/syen.12145.
- Mullens B. A., 2019. Horse Flies and Deer Flies (Tabanidae). Kn.: Mullen G. R., Durden L. A. (red), *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)*. Academic Press: 327-343.
- OIE, 2020. Global situation of african swine fever. [žiūrėta: 2021-01-28]. Prieiga per internetą: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/ASF/Report_47_Global_situation_ASF.pdf
- OIE, 2021. ASF situation. [žiūrėta: 2021-02-02]. Prieiga per internetą: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/ASF/Report_62_Current_situation_of_ASF.pdf
- Olesen A. S., Hansen M. F., Rasmussen T. B., Belsham G. J., Bødker R., Bøtner A., 2018. Survival and localization of African swine fever virus in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) after feeding in viremic

blood using a membrane feeder. *Veterinary Microbiology* 222: 25-29. doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.010

Olsufjev N.G., 1977. Slepni (Tabanidae). Kn.: Fauna SSSR. *Nasekomye dvukrylye*. [Tabanidae. In Fauna SSSR. Diptera]. Leningrad 7(2): 1–436.

Pakalniškis S., Bernotienė R., Lutovinovas E., Petrašiūnas A., Podėnas S., Rimšaitė J., Sæther O. A., Spungis V., 2006. Checklist of Lithuanian Diptera. *Naujos ir retos Lietuvos vabzdžių rūšys* 18: 16- 154.

Penrith M. L., Vosloo W., 2009. Review of African swine fever: transmission, spread and control. *Journal of the South African Veterinary Association* 80 (2): 58-62. DOI: 10.4102/jsava.v80i2.172.

Rzhetsky A., Nei M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Molecular Biology and Evolution* 9: 945-967.

Santos F. M., Barreto W. T. G., de Macedo G. C., da Silva Barros J. H., das Chagas Xavier S. C., Garcia C. M., Mourão G., de Oliveira J., Rimoldi A. R., de Oliveira Porfírio G. E., de Andrade G. B., Perles L., André M. R., Jansen A. M., Herrera H. M., 2019. The reservoir system for Trypanosoma (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) species in large neotropical wetland. *Acta Tropica* 199: 105098. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105098.

Sarwar M., 2015. Insect Vectors Involving in Mechanical Transmission of Human Pathogens for Serious Diseases. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering* 1 (3): 300-306.

Sasaki H., 2001. Comparison of capturing tabanid flies (Diptera: Tabanidae) by five different color traps in the fields. *Applied Entomology and Zoology* 36(4): 515- 519. https://doi.org/10.1303/aez.2001.515.

Simulundu E., Lubaba C. H., Heerden J., Kajihara M., Mataa L., Chambaro H. M., Sinkala Y., Munjita S. M., Munang'andu H. M., Nulubamba K. S., Samui K., Pandey G. S., Takada A., Mweene A. S., 2017. The Epidemiology of African Swine Fever in „Nonendemic“ Regions of Zambia (1989- 2015): Implications for Disease Prevention and Control. *Viruses* 9 (9): 236. doi.org/10.3390/v9090236.

Spodareva V. V., Grybchuk-Ieremenko A., Losev A., Votypka J., Lukeš J., Yurchenko V., Kostygov A. Y., 2018. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. *Parasites & Vectors* 11: 447. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3023-1.

Stevens J. R., Noyes h. a., Dover G. A., Gibson W. C., 1999. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, Trypanosoma brucei and T. cruzi. *Parasitology* 118: 107-116. doi: 10.1017/s0031182098003473.

Stuen S., 2020. Haemoparasites – Challenging and Wasting Infections in Small Ruminants: A Review. *Animals* 10 (11), 2179. doi: 10.3390/ani10112179.

- Vaduva G., 2020. Behavioral Responses of Tabanidae and Stomoxys calcitrans to Unbaited and Baited Nzi and Horse Pal Traps in Southern Sweden. *Journal of Biology and Life Science* 11 (2): 203- 219. DOI: 10.5296/jbls.v11i2.17806.
- Valkiūnas G., Iezhova T. A., Carlson J. S., Sehgal R. N. M., 2011. Two new Trypanosoma species from african birds, with notes on the taxonomy of avian Trypanosomes. *Journal of Parasitology* 97 (5): 924-930. DOI: 10.1645/GE-2796.1.
- Votypka J., d'Avila-Levy C.M., Grellier P., Maslov D.A., Lukeš J., Yurchenko V., 2015b. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology* 31 (10): 460-469. doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.015.
- Votypka J., Radrova J., Skalicky T., Jirku M., Jirsova D., Mihalca A. D., D'Amico G., Petrzalkova K. J., Modry D., Lukes J., 2015a. A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of Trypanosoma brucei. *International Journal for Parasitology* 45(12): 741-748. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.005.
- Wallace J. R., 2009. Diptera (Biting Flies). Kn.: Likens G.E. *Encyclopedia of Inland Waters*. Academic Press: 280-287.
- Wang T., Sun Y., Huang S., Qiu H., 2020. Multifaceted Immune Responses to African Swine Fever Virus: Implications for Vaccine Development. *Veterinary Microbiology* 249. doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108832.
- Werszko J., Szewczyk T., Steiner – Bogdaszewska Ż., Wróblewski P., Karbowiak G., Laskowskis Z., 2019. Molecular detection of Megatrypanum trypanosomes in tabanid flies. *Medical and Veterinary Entomology* 34 (1): 69-73. https://doi.org/10.1111/mve.12409.