

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS KATEDRA

II kurso studentė
Ana Steponkienė

Baigiamasis magistro darbas

**ERKIŲ PLATINAMŲ LIGŲ SUKĖLĖJŲ PAPLITIMAS IR
MOLEKULINĖ DIAGNOSTIKA**

Darbo vadovas: dr. Milda Žygutienė

Vilnius
2009

TURINYS

PADĖKA	4
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. <i>IXODIDAE</i> ŠEIMOS ERKĖS	8
1.2. ERKIŲ PLATINAMŲ LIGŲ SUKĖLĖJAI	9
1.2.1. ERKINIO ENCEFALITO VIRUSAS	9
1.2.2. <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i>	13
1.2.3. <i>BORRELIA BURGENDORFERI</i> SENSU LATO	15
1.2.4. <i>BABESIA</i> SPP.	19
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	21
2.1. <i>IXODES RICINUS</i> ERKĖS	21
2.2. REAGENTAI	21
2.3. ĮRANGA	22
2.4. TYRIMO METODAI	22
2.4.1. ERKIŲ HOMOGENIZAVIMAS	22
2.4.2. NUKLEINO RŪGŠČIŲ EKSTRAKCIJA IR ANALIZĖ	23
2.4.2.1. RNR EKSTRAKCIJA	23
2.4.2.2. DNR EKSTRAKCIJA	23
2.4.2.3. ERKINIO ENCEFALITO RNR TIKRALAIKĖ POLIMERAZĖS GRANDININĖ REAKCIJA (PGR) ...	24
2.4.2.4. <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i> DNR TIKRALAIKĖ POLIMERAZĖS GRANDININĖ REAKCIJA (PGR)	24
2.4.2.5. <i>BABESIA</i> SPP. 18S rDNR POLIMERAZĖS GRANDININĖ REAKCIJA (PGR)	25
2.4.2.6. <i>BORRELIA BURGENDORFERI</i> SENSU LATO 5S-23S rDNR INTARPO POLIMERAZĖS GRANDININĖ REAKCIJA (PGR)	25
2.4.2.7. <i>BABESIA</i> SPP. IR <i>BORRELIA BURGENDORFERI</i> SENSU LATO RLB HIBRIDIZACIJA	26
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	27
3.1. ERKIŲ NUKLEINO RŪGŠČIŲ EKSTRAKCIJA	28
3.2. ERKINIO ENCEFALITO RNR NUSTATYMAS TIKRALAIKĖS POLIMERAZĖS GRANDININĖS REAKCIJOS (PGR) METODU	29

3.3. <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i> DNR NUSTATYMAS TIKRALAIKĖS POLIMERAZĖS GRANDININĖS REAKCIJOS (PGR) METODU.....	31
3.4. <i>BABESIA SPP</i> NUSTATYMAS 18S RDNR POLIMERAZĖS GRANDININĖS REAKCIJOS (PGR) IR RLB HIBRIDIZACIJOS METODAIS	33
3.5. <i>BORRELIA BURGENDORFERI</i> SENSU LATO NUSTATYMAS 5S-23S RDNR INTARPO POLIMERAZĖS GRANDININĖS REAKCIJOS (PGR) IR RLB HIBRIDIZACIJOS METODAIS	35
IŠVADOS.....	37
SUMMARY.....	38
1 PRIEDAS. ERKIŲ PLATINAMŲ LIGŲ SUKĖLĖJŲ TYRIMŲ SCHEMA.....	39
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	40

Padėka

Esu labai dėkinga savo darbo vadovei dr. Mildai Žygutienei už suteiktą visapusišką pagalbą, patarimus ir informaciją, atliekant šį darbą.

Taip pat dėkoju visiems Nacionalinės visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijos Molekulinių biologinių tyrimų skyriaus darbuotojams už patarimus ir pagalbą, atliekant erkių platinamų ligų sukėlėjų molekulinis tyrimus.

EDEN (*Emerging diseases in a changing European Environment*) projekto koordinatoriams už suteiktą informaciją, tyrimų metodikas bei leidimą panaudoti gautus tyrimų rezultatus magistriniame darbe. ULPKC, EDEN projekto partneriams Lietuvoje, dėkoju už surinktas ir paruoštas erkes tyrimams bei bendradarbiavimą atliekant erkių platinamų ligų sukėlėjų tyrimus.

Santrumpų sąrašas

DNR – Dezoksiribonukleino rūgštis

RNR – Ribonukleino rūgštis

Tikralaikė PGR – Tikralaikė polimerazės grandininė reakcija (ang. Real-time PCR)

PGR – Polimerazės grandininė reakcija

kb – kilobazės

RLB hibridizacija – (angl. Revers line blot) hibridizacija

EEV – Erkinio encefalito virusas

EE – Erkinis encefalitas

ULPKC – Užkrečiamų ligų profilaktikos ir kontrolės centras

EDEN – (angl. Emerging diseases in a changing European Environment) atsirandančios ligos besikeičiančioje Europos aplinkoje

Ivadas

Ixodes genties erkės yra krauju mintantys nariuotakojai, visų – stuburinių gyvūnų, taip pat žmogaus parazitai. Jų įkandimas pavojingas todėl, kad šios genties erkės perneša ir perduoda savo šeimininkams užkrečiamų ligų sukėlėjus. Be to, joms būdingos tam tikros savybės, tokios, kaip, ilgas maitinimosi periodas, neskausmingas įsisiurbimas, nepastebimas šliaužiojimas po kūną, platus maitintojų ratas; iš vienos vietos į kitą jas pernešti gali vis kiti gyvūnai, todėl jos plačiai plinta aplinkoje, kartu išplatindamos ir ligas sukeliančius mikroorganizmus. *Ixodes* erkės paplitusios beveik visuose pasaulio regionuose, o jų pernešamos infekcijos dažniausiai sutinkamos Europos šalyse.

Lietuvoje labiausiai paplitusios yra *Ixodes ricinus* erkės, kurios perneša daugybę ligų sukėlėjų, tokių kaip: erkinio encefalito virusas, *Anaplasma phagocytophilum* ir *Borrelia burgdorferi* sensu lato bakterijos, *Babesia* genties (*Babesia microti* ir *Babesia divergens*) pirmuonys.

Vis daugiau tyrimų atliekama, siekiant surasti specifiškiausias ir jautriausias metodus, kurie padėtų identifikuoti erkių platinamus ligų sukėlėjus. Šiuo metu taikomi kultūros išskyrimo, tamsaus lauko mikroskopavimo, netiesioginio antikūnų ir antigenų nustatymo metodai. Pastaraisiais metais išpopuliarėjo molekulinės biologijos metodai, paremti polimerazės grandinine reakcija ir RLB hibridizacija. Šie metodai buvo pritaikyti erkių platinamų ligų sukėlėjų diagnostikai ne tik klinikiniuose mėginiuose, bet ir tiesioginiams jų platintojų – erkių tyrimams. Šie metodai laikomi jautriausiais, specifiškiausiais ir tinkamiausiais erkių platinamų ligų sukėlėjų diagnostikai.

Lietuvoje didžioji dalis tyrimų buvo atliekama tiriant tik erkinio encefalito viruso ir Laimo ligos (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) sukėlėjus. Kadangi šių ligų sukėlėjai Lietuvoje labai paplitę, o šių ligų atvejų skaičius yra pakankamai didelis, nuolat atliekamas epidemiologinis šių ligų stebėjimas. Lyginant erkinio encefalito Laimo ligos atvejų skaičių Lietuvoje ir kaimyninėse šalyse, pastebėta, kad Lietuvos epidemiologinė situacija nelabai skiriasi nuo kaimyninių Baltijos šalių, tačiau šių ligų skaičiumi Lietuva lenkia skandinavijos šalis, kuriose šių ligų atvejų skaičius yra labai nedidelis.

Tačiau dalies erkių platinamų ligų sukėlėjų diagnostika Lietuvoje atliekama ne taip seniai ar iš viso neatliekama. Pavyzdžiui *Anaplasma phagocytophilum* bakterijų paplitimas Lietuvos erkėse pradėtas tirti tik pastaraisiais metais. Tuo tarpu *Babesia* genties pirmuonių paplitimas dar nėra žinomas, nes tokio tipo tyrimai tik neseniai pradėti atlikti Europoje, taip pat ir Lietuvoje.

EDEN projekto metu atliktų tyrimų rezultatai svarbūs ne tik epidemiologiškai, nes erkių platinamų ligų sukėlėjų diagnostika jautriais ir specifiniais molekulinės biologijos metodais leis palyginti ir įvertinti įvairiose šalyse taikomus metodus. O pasirinkus geriausius iš jų, identifikuoti šiuos patogenus, stebėti jų paplitimą tiek Lietuvoje, tiek ir kitose šalyse.

Šio darbo tikslas įvertinti erkių platinamų ligų sukėlėjų paplitimą ir įvertinti šių patogenų tyrimo metodus. Tikslo įgyvendinimui buvo iškelti uždaviniai:

- Erkių, surinktų keturiuose Lietuvos rajonuose, nukleino rūgščių ekstrakcija;
- Pagrindinių erkių platinamų ligų sukėlėjų: erkinio encefalito viruso, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato ir *Babesia* spp. nustatymas molekulinės biologijos metodais;
- Erkių platinamų ligų sukėlėjų paplitimo įvertinimas.

EDEN projekto partneris Lietuvoje Užkrečiamų ligų profilaktikos ir kontrolės centras (ULPKC) atliko erkių rinkimą Lietuvos rajonuose. Laboratorinis darbas buvo atliktas Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje, Molekulinių biologinių tyrimų skyriuje.

1. Literatūros apžvalga

1. 1. *Ixodidae* šeimos erkės

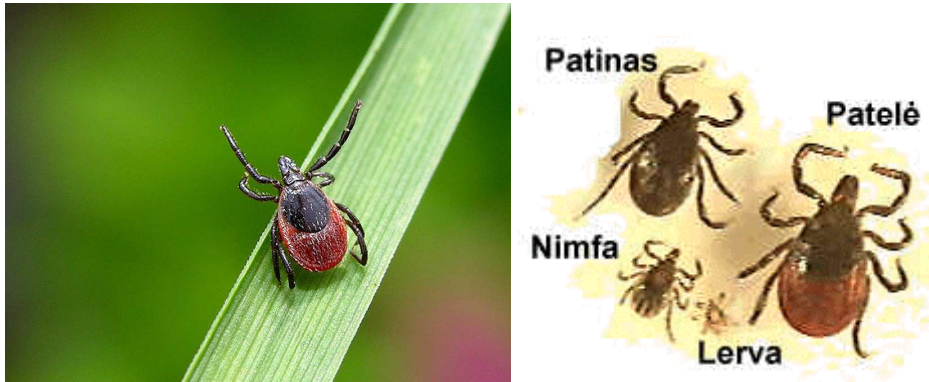
Ixodida eilės *Ixodidae* šeimai priskiriamos *Ixodes*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Anocentor*, *Aponomma*, *Boophilus*, *Bothriocroton*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Nosomma*, *Rhipicentor* ir *Rhipicephalus* genties erkės. *Ixodes* genties atstovai randami visuose kontinentuose: Europoje, Azijoje, Afrikoje ir Amerikoje. Šiai genčiai priskiriama apie 200 rūšių, tarp kurių literatūroje dažniausiai minimos *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *I. scapularis*, *I. hexagonus*, *I. holocyclus*, *I. nipponensis*, *I. cookei*, *I. ovatus*, *I. pacificus*, *I. pavloskyi*, *I. dentatus*, *I. tanuki*, *I. turdus*, *I. uriae* ir kt. Kiekvienos iš šių rūšių paplitimas savitas kiekvienam regionui.

Literatūros šaltinių duomenimis pagrindiniais erkių platinamų ligų sukėlėjų platintojais Europoje laikomos *Ixodes ricinus* ir *Ixodes persulcatus* erkės (Scouls ir kt., 1999, Ranka ir kt., 2004). Lietuvoje labiausiai paplitusios *Ixodes ricinus* erkės, kurios būdingos vakariniams Europos rajonams. Šios rūšies erkės yra pagrindiniai erkių platinamų ligų sukėlėjų rezervuarai (Žygutienė M., 2008). Tuo tarpu kaimyninėje Latvijoje sutinkamos *Ixodes ricinus* ir *Ixodes persulcatus* erkės, šios rūšies erkės būdingos rytiniams Europos regionams (Bormane, 1999).

Europoje gyvenančios *Ixodes ricinus* rūšies erkės turi plačią geografinę sklaidą. *Ixodes ricinus* erkės paplitusios nuo šiaurinės Airijos iki Turkijos bei Kaukazo pietų. Lietuva patenka į *Ixodes ricinus* paplitimo arealą. Tuo tarpu *Ixodes persulcatus* aptinkamos nuo rytų Europos iki Kinijos ir Japonijos krantų. Abiejų rūšių erkės cirkuliuoja apribotoje šiaurinės Europos dalyje, Rusijoje, rytinėse Latvijos ir Estijos dalyse.

Ixodes ricinus paplitimas stebimas vėsiose, santykinai drėgnose, krūmokšniais apaugusiose vietovėse, parkuose ir miškuose. Centrinėje Europoje visoms *Ixodes ricinus* rūšies erkėms būdingi du aktyvumo pikai: gegužės ir birželio bei rugsėjo ir spalio mėnesiai (Jasulaitienė ir kt., 2008). Tačiau erkių aktyvumo modeliai gali kasmet skirtis, tai priklauso nuo temperatūros ir drėgmės.

Ixodes ricinus erkėms (1 pav.) būdingos trys vystymosi stadijos: lerva, nimfa, suaugėlis. Kiekvienoje stadijoje būdingas vienkartinis maitinimas (Žygutienė M., 2008) bei skirtingi šeimnininkai. Erkių lervos ir nimfos parazituoja smulkius graužikus ir paukščius, tuo tarpu erkių suaugėliams būdinga didelė šeimnininkų žinduolių įvairovė; jai priklauso ir žmogus.



1 pav. *Ixodes ricinus* erkė ir visos trys jos vystymosi stadijos.

1. 2. Erkių platinamų ligų sukėlėjai

1. 2. 1. Erkinio encefalito virusas

Erkinis encefalitas (EE) yra aktuali visuomenės problema, nes kiekvienais metais pasaulyje hospitalizuojama dešimtys tūkstančių žmonių, iš jų 3000 – Europoje (Radzišauskienė ir kt., 2008, Mantke ir kt., 2008). Lietuvoje kasmet užregistruojama apie keturis šimtus erkinio encefalito atvejų.

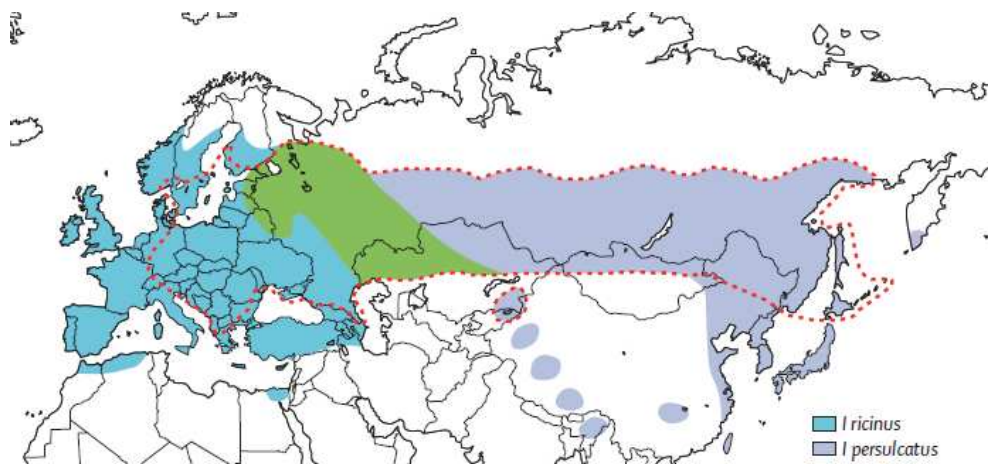
Erkių platinamas erkinio encefalito virusas (EEV) (angl. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) yra RNR flavivirusas, kuris kartu su kitais artimais virusais priklauso *Flaviviridae* šeimai (Mickienė ir kt., 2002, Lindquist ir kt., 2008, Bormane ir kt., 2004). Kartu su kitais *Flaviviridae* šeimos virusais - Šv. Louis'o encefalito virusu, Vakarų Nilo, Japonijos encefalito virusu - erkinio encefalito virusas yra pagrindinis neurologinius susirgimus sukeliantis flavivirusas. Erkinio encefalito virusas (EEV) paplitęs daugelyje Europos ir Azijos sričių ir yra platinamas *Ixodes ricinus* ir *Ixodes persulcatus* erkių.

Erkinio encefalito virusas yra izoedrinis 50 nm virusas, kurio viengrandės RNR genomai siekia 11 kb. EEV genomai yra koduojami viename atvirame 3414 aminorūgščių poliproteino skaitymo rėmelyje. Šis virusas turi tris pagrindinius struktūrinius baltymus: apvalkalinį glikoproteiną E, su membrana sujungtą M baltymą ir kapsulės baltymą C. Pastarasis baltymas ir genomine RNR formuoja nukleokapsidę, o baltymų apvalkalėlis sudarytas iš glikoproteino E ir subrendusių viruso dalelių M baltymo. Genų sekos, koduojančios struktūrinius baltymus (E, M, C) yra pirmame ketvirtyje EEV geno, kitose geno dalyse yra nestruktūrinių baltymų sekos (NS). E glikoproteiną koduojančių sekų analizė naudojama EEV potipių nustatymui.

Šiuo metu žinomi trys erkinio encefalito viruso potipiai (Lindquist ir kt., 2008, Bormane ir kt., 2004):

1. Europos erkinio encefalito viruso (EEV) potipis (angl. TBEV-Eu), anksčiau vadintas vakarų EEV;
2. Sibiro erkinio encefalito viruso potipis;
3. Tolimųjų rytų erkinio encefalito viruso potipis.

Pagrindiniu Europos erkinio encefalito viruso potipio vektoriumi yra *Ixodes ricinus* erkės, tuo tarpu *Ixodes persulcatus* yra kitų dviejų potipių nešiotojas (Lindquist ir kt., 2008). 2 paveiksle pavaizduotas *Ixodes* genties erkių bei erkinio encefalito viruso paplitimas Europoje ir Azijoje.



2 pav. Geografinis *Ixodes* spp. paplitimas, vakarinis *Ixodes ricinus* ir rytinis *Ixodes persulcatus* paplitimas. Abiejų vektorių persidengiantis pasiskirstymas pavaizduotas žalia spalva. Punktyrinė linija apriboja erkinio encefalito paplitimo endemines ribas.

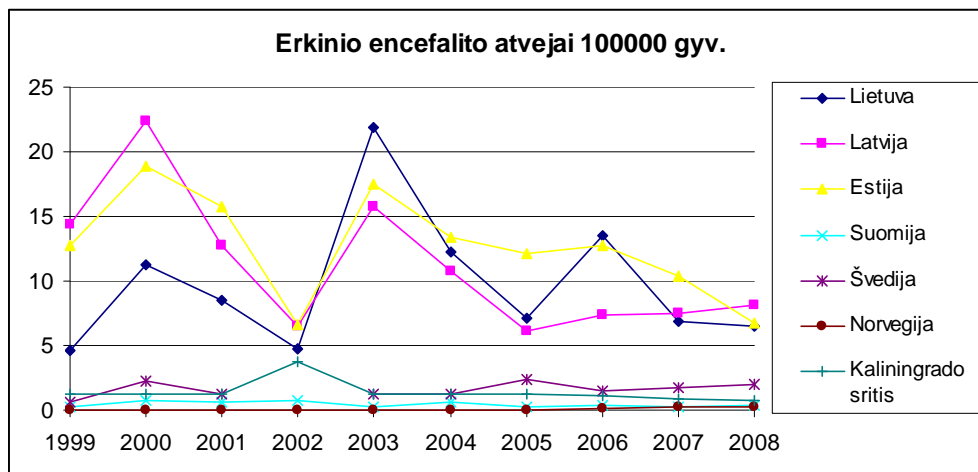
Europoje gyvenančios *Ixodes ricinus* erkės paplitusios nuo šiaurinės Airijos iki Turkijos, bei Kaukazo pietų. *Ixodes persulcatus* aptinkamos nuo rytų Europos iki Kinijos ir Japonijos krantų. Abiejų rūšių erkės cirkuliuoja apribotoje šiaurinės Europos dalyje, Rusijoje, rytinėse Latvijos ir Estijos dalyse.

Nustatyta, kad trys EEV potipiai yra susiję su skirtingais ligos sunkumo laipsniais (Mantke ir kt., 2008). Žmonių infekcijos tolimųjų rytų potipio EEV dažniausiai yra sunkios, su encefalito simptomais (židininis meningoencefalitas ar poliencefalitas); mirties atvejų dažnis siekia 5-35 %. Šio tipo EEV nesukelia chroniškų ligų. Sibiro potipio EEV sukelia mažiau sunkias infekcijas (mirtingumas 1-3 %), dažniausiai sukelia chroniškas ar užsitęsusias infekcijas, kurias lydi įvairūs neurologiniai ir neuropsichiniai simptomai. Europos EEV potipio infekcijos turi dvifazę eigą: po trumpo inkubacijos periodo (paprastai 7-14 ar 4-28 dienų) pirmoji vireminė fazė, kurios požymiai labai panašūs į peršalimo simptomus, jie trunka 2-4 dienas. Antroji EE fazė pasitaiko

20-30 % infekuotų pacientų atvejais, pasižymi ir įvairaus sunkumo požymiais (meningitas, meningoencefalitas ir kt.). Šioje fazėje nustatomi antikūnai serume ir cerebrospinaliniame skystyje.

Erkinio encefalito epidemiologinė situacija Lietuvoje panaši į bendrą situaciją Europoje. 3 pav. yra pateikti duomenys apie erkinio encefalito paplitimą 1999-2008 m. Lietuvoje ir kaimyninėse šalyse. Lietuvoje EE atvejų skaičius nelabai skiriasi nuo kitų kaimyninių šalių duomenų, skirtumai matomi lyginant juos su skandinavų šalimis, kuriose EE atvejų skaičius yra labai nedidelis. Lietuvoje nuo 1999 iki 2003 metų EE atvejų skaičius svyravo nuo 4,6-11,3 atvejų 100000 gyventojų ir buvo netgi mažesnis nei kitose Baltijos šalyse. Tik 2003 m. duomenys buvo neįprasti, net dvigubai didesni nei pastaraisiais metais – 21,9 100000 gyventojų (iš viso 763 atvejai). Šis skaičius buvo didžiausias ir tarp visų Baltijos šalių, ir tarp kitų Europos šalių (Süss J., 2008). Toks didelis EE užsikrėtimo atvejų skaičius gali būti susijęs su tuo, kad tais metais buvo užfiksuoti ne tik EE užsikrėtimai per erkių įkandimus, bet ir nepasterizuotą ožkų pieną.

Tuo tarpu nuo 2004-2008 metų Lietuvoje erkinio encefalito atvejų skaičius vis mažėjo (nuo 13,5-6,5 atvejų), o 2008 m. siekė 6,5 atvejų 100000 gyventojų. Tokie pokyčiai gali būti susiję su vis populiarėjančiu vakcinų naudojimu. Ši teiginį patvirtina ir Latvijos mokslininkai (Bormane ir kt., 2004, Bormane A., 2008), kurių pastebėjimai parodo, kad EE atvejų skaičius jų šalyje sumažėjo pradėjus vykdyti vaikų vakcinavimo programą.

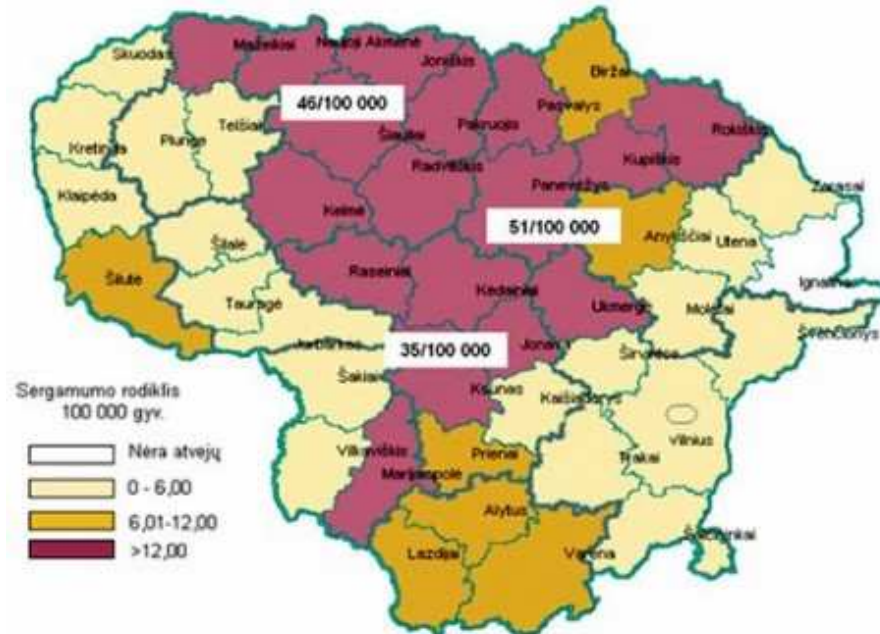


3 pav. Erkinio encefalito atvejai Lietuvoje ir kaimyninėse šalyse, tenkantys 100000 gyventojų. Duomenys gauti iš EpiNorth duomenų sistemos.

Lietuvoje erkinio encefalito viruso paplitimas fiksuojamas įvairiose vietovėse. Didžioji dalis, net 80 % nustatytų užsikrėtimų erkiniu encefalitu, užfiksuoti šiaurinėje ir centrinėje Lietuvos dalyse: Kauno, Šiaulių ir Panevėžio apskrityse (Süss J., 2008, Žygutienė M., 2008). 4

paveiksle yra pateiktas žemėlapis, kuriame pavaizduoti erkinio encefalito sergamumo duomenys, tenkantis 100000 gyventojų. Didžioji dalis EE atvejų užfiksuojama Panevėžio rajone, kur erkinio encefalito viruso sukeltųjų susirgimų atvejų skaičius siekia 51 atvejį 100000 gyventojų.

Erkinio encefalito paplitimas Lietuvoje



4 pav. Erkinio encefalito sergamumo rodiklis Lietuvos rajonuose.

Šiuo metu taikomi erkinio encefalito viruso diagnostikos metodai skirstomi į tiesioginius: reversinės transkriptazės tikralaikė polimerazės grandininė reakcija (angl. RT-PCR), elektroninis mikroskopavimas bei viruso kultivavimas; ir netiesioginius metodus: antikūnų nustatymas, imunoblotingas, viruso neutralizacijos ir kt.

Lietuvoje ir kitose šalyse erkinio encefalito viruso diagnostikai dažniausiai naudojami IgG ir IgM antikūnų nustatymas serume ir cerebrospinaliniame skystyje. Šie metodai plačiai taikomi ir pačioms erkėms, tiek surinktoms iš aplinkos, tiek ir įsisiurbusioms žmogui ir vėliaus pašalintoms (Schrader, Süß 1999). Tačiau antikūnų nustatymas galimas tik vėlyvosiose stadijose ir tai ilgai užtrunka. Dėl šios priežasties vis labiau populiarėja molekuliniai metodai, kurie padeda nustatyti erkinio encefalito viruso RNR ir ankstyvose ligų stadijose. Vienas tokių plačiai paplitusių tiesioginių metodų - tikralaikė polimerazės grandininė reakcija (angl. RT-PCR). Šis metodas naudojamas erkinio encefalito diagnostikai kraujo ir cerebrospinalinio skysčio mėginiuose (Schwaiger ir kt., 2003). Tikralaikės polimerazės grandininės reakcijos metodas buvo pritaikytas ir tiesioginiam erkinio encefalito viruso RNR nustatymui erkėse. Šiuo metu šis

metodas yra jautriausias ir specifiškiausias metodas, skirtas EEV nustatymui įvairiuose mėginiuose (Schrader, Süß 1999, Schwaiger ir kt., 2003).

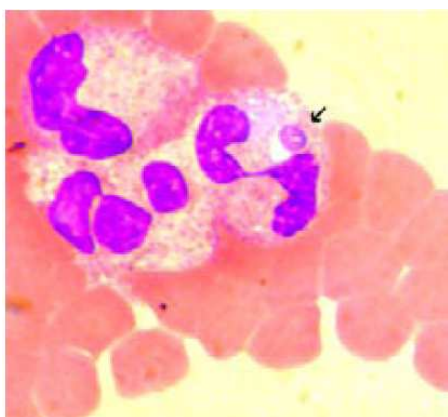
1. 2. 2. *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum yra unikali bakterija, kuri dauginasi įvairių šeimininkų, įskaitant naminius ir laukinius gyvūnus, taip pat ir žmonių organizme. Ji aptinkama granulocituose ir leukocituose. Iki 1990 metų, kai buvo nustatytas pirmasis žmogaus infekavimo *A. phagocytophilum* atvejis (kurio priežastis erkės įkandimas), šis patogenas buvo žinomas tik veterinarijoje (Dumler ir kt., 2005). *Anaplasma phagocytophilum* dažniausiai nustatomos tik šunų granulocitinės erlichiozės ir arklių anaplazmozės atvejais (Lester ir kt., 2005).

Anaplasma phagocytophilum sinoniminiai pavadinimai *Cytoeces bovis*, *C. Phagocytophila*, *Rickettsia phagocytophila*, *R. phagocytophila ovis*, *Ehrlichia phagocytophila*, *HGE agentas*, *Ehrlichia phagocytophila*, *Anaplasma phagocytophila*). Šis patogenas priklauso naujai išskirtai *Anaplasma* genčiai, kuriai priskiriami ir žmonių granulocitinės erlichiozės (angl. Humane granulocytic ehrlichiae (HGE)) sukėlėjai.

Šiuo metu *Anaplasma phagocytophilum* laikoma dar vienu svarbiu erkių platinamų ligų sukėlėju; šią bakteriją platina *Ixodes persulcatus* ir *Ixodes ricinus* erkės.

Anaplasma phagocytophilum yra mažos (0,2-1,0 μm skersmens) obligatinės viduląstelinės bakterijos su gram neigiama ląstelės sienele, tačiau šis bakterijos neturi lipopolisacharidų sintezės mechanizmų (Dumler ir kt., 2005). *Anaplasma phagocytophilum* infekuoja neutrofilus, leukocitus, granulocitus arba mieloidines ląsteles (Derdatova ir kt., 2003). 5 pav. pateiktas leukocitų, infekuotų *Anaplasma phagocytophilum*, mikroskopinis vaizdas.



5 pav. Neutrofilinių leukocitų infekcija *Anaplasma phagocytophilum*.

Anaplasma phagocytophilum infekcijos žmonėms sukelia granulocitinę anaplazmozę. Žmonių granulocitinės anaplazmozės simptomai gali būti nepastebimi ar labai nežymūs. Bet jei jie pasireiškia, tai būna panašūs į peršalimo simptomus, pasireiškia galvos skausmu ir karščiavimu, raumenų skausmais ir slogavimu.

Šis erkių platinamų ligų sukėlėjas plačiai paplitęs Amerikoje, bet šiuo metu vis daugiau *A. phagocytophilum* bakterijų nustatoma ir Europoje. Europoje *A. phagocytophilum* aptinkamos *Ixodes ricinus* erkėse, nustatoma gyvūnams ir žmonėms.

Dėl šių priežasčių vis didesnis dėmesys skiriamas *A. phagocytophilum* tyrimams. Kadangi ši bakterija yra priskiriama erkių platinamiems patogenams, manoma, kad šių sukėlėjų yra visuose erkių paplitimo arealuose. *A. phagocytophilum* nustatymas *Ixodes ricinus* erkėse buvo atliekamas Slovakijoje, Lenkijoje, Norvegijoje, Baltijos šalyse (Grzeszczuk A., 2006, Alekseev ir kt., 2001, Derdàkovà ir kt., 2003, Žygutienė ir kt., 2008, Paulauskas ir kt., 2008).

Lenkijos mokslininkų tyrimuose nustatytas didelis *A. phagocytophilum* infekcijų skaičius *Ixodes ricinus* erkėse, kuris siekia 0-16 %. Kitose šalyse *A. phagocytophilum* infekcijų skaičius siekė: 3,2 % - Slovėnijoje ir 28,9 % - Nyderlanduose (Alekseev ir kt., 2001). Tyrimai buvo atliekami ir siekiant nustatyti šio patogeno pasiskirstymą įvairiose erkių vystymosi stadijose. Nustatyta, kad *A. phagocytophilum* paplitimas erkių suaugėliuose siekia 18,1 %, o patelėse – net 40 % (Grzeszczuk A., 2006). Tyrimuose, atliktuose Slovėnijoje, buvo nustatyta, kad 13,3 % tirtų erkių buvo infekuotos *A. phagocytophilum*. Tarp erkių suaugėlių šis skaičius (19,5 %) buvo žymiai didesnis nei tarp nimfų (1,4 %). Tuo tarpu Norvegijoje nustatytas erkių užkrėstumas - 7,1-27,7 %, ir žmonių granulocitinės anaplazmozės sukėlėjų žymiai daugiau buvo nustatyta nimfose (Derdàkovà ir kt., 2003). Lietuvoje atlikti tyrimai parodė, kad *A. phagocytophilum* infekcijų skaičius svyruoja nuo 0-19,6 % (Paulauskas ir kt., 2008) ir jos dažnesnės erkių suaugėliuose nei nimfose.

Literatūroje sutinkami duomenis apie mišrias *A. phagocytophilum* su *Borrelia burgdorferi* sensu lato infekcijas (Derdàkovà ir kt., 2003, Grzeszczuk ir kt., 2002). Tokio tipo koinfekcijos buvo nustatytos ir Lietuvoje, net 20 % tirtų erkių turėjo tokio tipo infekcijas (Žygutienė ir kt., 2008).

Infekcijų skaičiaus svyravimai skirtingose valstybėse gali būti susiję su naudotų metodų jautrumu. Dažniausiai naudojami metodai *A. phagocytophilum* diagnostikai yra serologiniai, kultivavimo ir mikroskopavimo metodai. *A. phagocytophilum* atveju serologiniai, imunofluorescentiniai metodai dažnai neatspindi antigeninių šio patogeno savybių. Kiti metodai, tokie, kaip kultivavimas ir kraujo tepinėlių mikroskopavimas, reikalauja daug laiko ir patirties

bei nėra labai jautrūs (Schouls ir kt., 1999). Vienas jautriausių ir specifiskiausių metodų yra polimerazės grandininė reakcija (PCR), šis molekulinis metodas plačiausiai naudojamas *A. phagocytophilum* nustatymui tiek erkėse, tiek klinikiniuose kraujo mėginiuose.

Šiuo metu *A. phagocytophilum* diagnostikai naudojami du polimerazės grandininė reakcijos taikiniai: tai *A. phagocytophilum msp2* geno fragmento nustatymas ir 16S rDNR fragmento nustatymas (Paulauskas ir kt., 2008, Brouqui ir kt., 2004). Tyrimais nustatyta, kad abu šie diagnostikos metodai yra patogūs, specifiški ir jautrūs, tačiau dažniausiai naudojamas *msp2* geno fragmento nustatymas. *msp2* genas koduoja 40 kDa išorinės membranos baltymą, kuris yra unikalus *Anaplasma* rūšims (Courtney ir kt., 2004), be to, šiam metodui reikia mažesnių laiko sąnaudų, nes jis pritaikytas tikralaikiui PGR, todėl nereikalinga agarozės gelio elektroforezė.

1. 2. 3. *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Laimo liga yra daugiasisteminė liga, kurią sukelia spiralės formos, judri, 20-30 µm ilgio ir 0,2-0,3 µm pločio spirocheta *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Borrelia burgdorferi sensu lato yra heterogeniška rūšis, jai priskiriamos trys borelijų grupės: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* ir *Borrelia garinii* (Brouqui ir kt., 2004). *B. burgdorferi* sensu stricto randamos Šiaurės Amerikoje, tuo tarpu Europoje yra randamos visos trys borelijų rūšys. Žinomos ir kitos rūšys: *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. tanuki*, *B. turdae*, tačiau dar nėra įrodyta, kad šios rūšys yra patogeniškos žmogui.

Tačiau randamas vis didesnis borelijų rūšių skaičius suformavo naują *Borrelia burgdorferi* sensu lato kompleksą. Šiuo metu literatūroje *Borrelia burgdorferi* sensu lato kompleksui priskiriamos septynios rūšys: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *B. bissetti*, *B. spielmani* (Poupon ir kt., 2006). Borelijų įvairovę padeda nustatyti: *rrs-rrlA* rRNR introno, kuris lokalizuotas chromosomoje ir plazmidėje esančio paviršiaus baltymo C geno (*OspC*) tyrimai (Hanincova ir kt., 2008).

Europoje *Ixodes ricinus* erkės laikomos pagrindiniu visų *B. burgdorferi* sensu lato rūšių nešiotuju (Poupon ir kt., 2006), tačiau Latvijoje žinomi ir kiti atvejai, kai borelijų spirochetas platino *Ixodes persulcatus* erkės (Ranka ir kt., 2004). *Ixodes* erkės platina visas rūšis, kurios priklauso *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Nustatyta tam tikra priklausomybė tarp įvairių *Borrelia* spp. rūšių ir jų pasiskirstymo ant specifinių stuburinių šeimininkų. Žinoma, kad *B. afzelii* dažniausiai randamos smulkiuose graužikuose, *B. garinii* ir *B. valaisiana* – paukščiuose (Poupon ir kt., 2006, Brouqui ir kt., 2004).

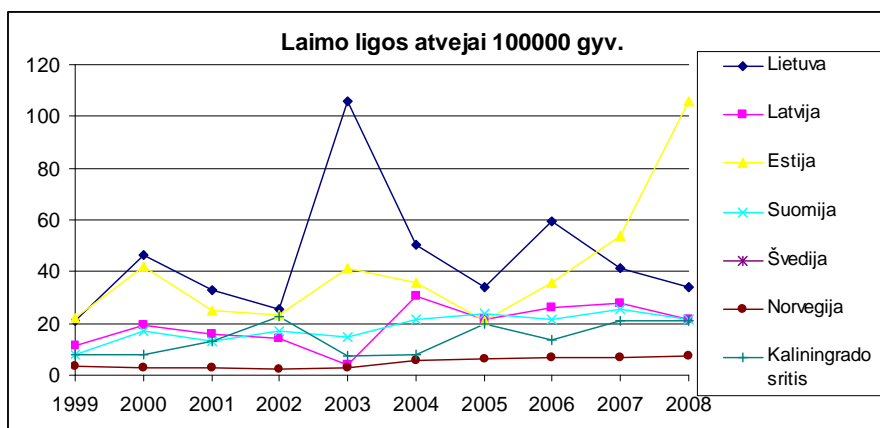
Su erkių maitinimosi ypatumais susijęs ir *Borrelia burgdorferi* sensu lato paplitimas tarp įvairių erkių vystymosi stadijų. Dažniausiai šio patogeno DNR randama erkių patelėse, mažiau nimfose ir lervose, ir mažiausiai – patinėliuose (Wodecka B., 2003). Laimo ligos (boreliozės) pernešimas gali vykti dviem būdais: vertikaliai (iš erkių erkėms vykstant jų vystymosi eigoje) ir horizontaliai (tarp erkės ir šeimininko). Dėl šių ypatumų erkių patelės vaidina pagrindinį vaidmenį pernešant Laimo ligos sukėlėjus; tai susiję su tuo, kad erkių patelių aktyvumas yra didesnis, ir maitinimasis yra dažnesnis nei patinėlių (Wodecka B., 2003, Biaduń ir kt., 2007).

Borrelia burgdorferi sensu lato komplekso skirstymas į atskiras rūšis yra svarbus dėl kelių priežasčių: viena jų, kad bus įmanoma stebėti kiekvienos rūšies paplitimą. Kita priežastis, kad kiekvienos rūšies infekcija turi skirtingus Laimo ligos klinikinius požymius, nustačius borelijų rūšį galima bus numatyti ligos eigą (Ranka ir kt. 2004, Liveris ir kt., 1995, Brouqui ir kt., 2004).

Yra aprašomos trys Laimo ligos stadijos: pirmoji – ankstyvoji, infekcijos lokalizacijos; antroji – ankstyvoji, infekcijos plitimo ir trečioji – vėlyvoji stadija, infekcijos persistencijos stadija. Pirmoji stadija būdinga visoms *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* rūšims, kurios metu formuojasi palaipsnis raudonas bėrimas erkės įkandimo vietoje. Antrinis apskritimo formos bėrimas nustatomas tik tam tikrais atvejais. Antroji stadija, kurios metu pasireiškia artrito požymiai, siejama su *B. burgdorferi* sensu stricto infekcija, tačiau ši hipotezė yra ginčytina. Neurologiniai požymiai dažniausiai siejami su *B. garinii*, šie simptomai apima meningitą, taip pat galvos smegenų pakitimus. *B. afzelii* rūšis siejama su chronišku silpnumu, kuris pasireiškia trečiojoje Laimo ligos stadijoje, ir pasireiškia po keleto metų nuo sukėlėjo patekimo į organizmą (Liveris ir kt., 1995, Brouqui ir kt., 2004).

Laimo ligos epidemiologinė situacija Lietuvoje panaši į bendrą situaciją Europoje. 6 pav. yra pateikti duomenys apie Laimo ligos paplitimą 1999-2008 m. Lietuvoje ir kaimyninėse šalyse. Lietuvoje Laimo ligos atvejų skaičius nelabai skiriasi nuo kitų kaimyninių šalių duomenų. Nuo 1999 iki 2003 metų Laimo ligos atvejų skaičius svyravo nuo 20,7-46,3 atvejų 100000 gyventojų. Tik 2003 m., taip pat kaip ir erkinio encefalito atveju, būta pakilimo: užfiksuota dvigubai daugiau atvejų nei pastaraisiais metais – 105,6 atvejai 100000 gyventojų. Šis skaičius buvo didžiausias ir tarp visų Baltijos šalių (Süss J., 2008). Po 2003 metų Laimo ligos atvejų skaičius mažėjo ir svyravo tarp 59,4-34 atvejų šimtui tūkstančių gyventojų. 2008 metais *Borrelia*

burgdorferi sensu lato infekcijų skaičius siekė 34 atvejus 100000 gyventojų ir buvo mažesnis nei Estijoje.



6 pav. Laimo ligos atvejai Lietuvoje ir kaimyninėse šalyse. Duomenys gauti iš EpiNorth duomenų sistemos.

Lietuvoje, kaip ir kitose Europos šalyse, *B. afzelii* ir *B. garinii* yra labiausiai paplitusios rūšys. Apskritai Lietuvoje ir Latvijoje iki šiol nustatytos tik trys pagrindinės *B. burgdorferi* sensu lato rūšys - *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* ir *B. garinii*. Iš kurių rečiausiai sutinkama yra *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Žygutienė ir kt., 2003, Ranka ir kt., 2004). Lietuvoje, atlikus *B. burgdorferi* sensu lato tyrimus iš Biržų, Joniškio, Klaipėdos, Kupiškio, Pakruojo, Pasvalio, Rokiškio ir Skuodo rajonuose surinktų erkių, nustatyta, kad labiausiai paplitusi rūšis Lietuvoje yra *B. afzelii* (9,3 % tirtų erkių), *B. garinii* nustatyta mažiau (2,5 %). Iki 2003 metų *B. burgdorferi* sensu stricto infekcijos šiaurinėje Lietuvoje nebuvo užfiksuotos, ir tai dar kartą patvirtino, kad *B. burgdorferi* sensu stricto paplitusios vakarinėje Europos dalyje ir retai sutinkama rytinėje Europoje (Žygutienė ir kt., 2003). Latvijos mokslininkų tyrimuose buvo gauti tokie patys rūšių pasiskirstymo rezultatai.

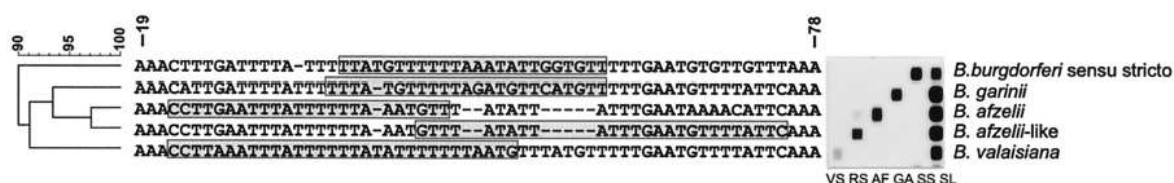
Didesnė rūšių įvairovė buvo nustatyta Šveicarijoje, tiriant migruojančius paukščius. Ten buvo nustatytos toks borelijų rūšių pasiskirstymas: *B. valaisiana* > *B. garinii* > *B. lusitanae* > *B. afzelii* > *B. burgdorferi* sensu stricto. Tokia rūšių įvairovė gali būti susijusi su tuo, kad migruojantys paukščiai pernešė pietų Europai ir šiaurės Afrikai būdingas rūšis į joms nebūdingus rajonus (Poupon ir kt., 2006).

Literatūros šaltiniuose minimos ir mišrios borelijų infekcijos (Rijpkema ir kt., 1995, Derdakova ir kt., 2003, Žygutienė ir kt., 2008). Šios mišrios infekcijos gali būti tiek vienos genties sukėlėjų infekcijos, tiek mišrios infekcijos su kitais erkių platinamų ligų sukėlėjais. Dažniausiai nustatomos *B. afzelii*, *B. garinii* ir *B. burgdorferi* sensu stricto infekcijos, šių

infekcijų deriniai yra labai įvairūs (Ranka ir kt., 2004). Ankstesniais metais Lietuvoje atliktuose tyrimuose nustatyta, kad galimos *B. afzelii* ir *B. garinii* rūšių mišrios infekcijos (Žygutienė ir kt., 2003).

Mišrios infekcijos su kitais erkių platinamais sukėlėjais buvo aprašomos įvairiuose šaltiniuose (Grzeszczuk ir kt., 2002, Derdakova ir kt., 2003). Yra nustatytos *B. burgdorferi* sensu lato infekcijos su *Anaplasma phagocytophilum* bakterijomis. Tokio tipo mišrios infekcijos taip pat buvo nustatytos, tiriant parkuose surinktas erkes. Net 20 % surinktų erkių buvo nustatytos dvigubos ar net trigubos infekcijos (Žygutienė ir kt., 2008).

Borrelia burgdorferi diagnostikai naudojami metodai yra labai įvairūs: labiausiai paplitę yra tamsaus lauko mikroskopavimas ir serologiniai metodai, kultivavimo metodas, kurie reikalauja specialios įrangos, ilgų laiko sąnaudų bei specialaus pasiruošimo. Pastaruoju metu literatūros šaltiniuose vis dažniau minima polimerazės grandininė reakcija, kurios metu amplifikuojamas intarpas, esantis tarp dviejų besikartojančių genų, koduojančių 5S ir 23S ribosominę DNR (Aleksėev ir kt., 2001, Poupon ir kt., 2006) ir RLB (Revers line blot) hibridizacijos metodas. 7 pav. parodytas daugybinis 5S-23S intarpo regiono persidengimas ir RLB hibridizacijos rezultatas, naudojant skirtingus zondus.



7 pav. 5S-23S intarpo regiono daugybinis persidengimas *B. burgdorferi* sensu lato ir RLB hibridizacijos rezultatai, naudojant skirtingus zondus. Zondų regionai yra pažymėti pilka spalva, *B. burgdorferi* sensu stricto intarpo seka pažymėta viršuje. RLB hibridizacijos zondai pažymėti: VS, *B. valaisiana*, RS, panašūs į *B. afzelii*; AF, *B. afzelii*, GA, *B. garinii*, SS, *B. burgdorferi* sensu stricto, SL, *B. burgdorferi* sensu lato.

Šiais intarpo amplifikavimo skirtumais paremta *Borrelia burgdorferi* sensu lato diagnostika įvairiuose mėginiuose bei *Borrelia burgdorferi* sensu lato komplekso rūšių nustatymas.

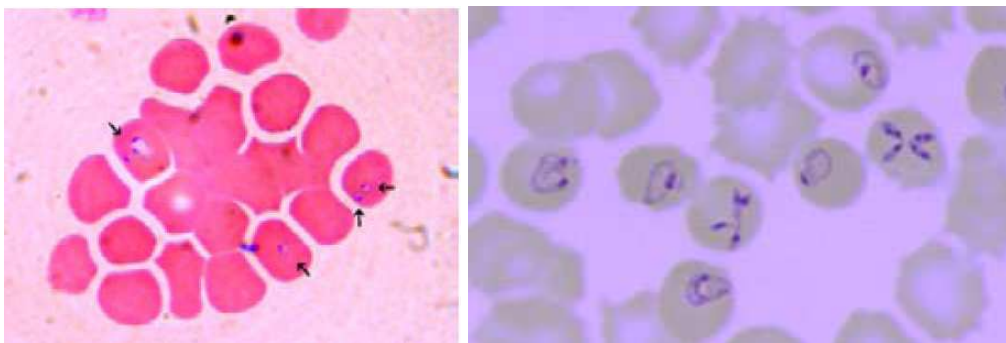
Amplifikavimo ir hibridizavimo tyrimų rezultatai buvo lyginami su tamsaus lauko mikroskopavimo rezultatais. Jų metu pastebėta, kad dalis teigiamų tamsaus lauko mikroskopavimo mėginių buvo neigiami tiriant juos molekuliniais metodais (nustatoma *Borrelia* DNR). Tačiau tiriant iširtus neigiamus mėginius PGR ir RLB hibridizacijos metodais buvo nustatyta net 18 % teigiamų *Borrelia burgdorferi* sensu lato mėginių (Aleksėev ir kt., 2001). Dėl šios priežasties buvo keliamos teorijos apie tai, kad tamsaus lauko mikroskopavimas yra jautresnis metodas nei PGR. Tačiau tamsaus lauko mikroskopavimo rezultatai parodė, kad mikroorganizmai randami šiuo metodu gali būti kitokie nei *Borrelia burgdorferi* sensu lato, ir

kad šios rūšys yra dažniau randamos *Ixodes ricinus* nei *Ixodes persulcatus* erkėse. Tolimesnių tyrimų metu buvo įrodyta, kad molekuliniai metodai - PGR ir RLB hibridizacija - specifiniai ir jautrūs. Todėl buvo daroma prielaida, kad neigiami rezultatai galėjo būti susiję su PGR inhibicija, taip pat DNR degradavimu, nors šiaip manoma, kad DNR yra pakankamai stabili struktūra. Taip pat nustatyta, kad *Borrelia* DNR aptikimo dažnis *Ixodes ricinus* ir *Ixodes persulcatus* erkėse skiriasi, todėl šios metodikos turi būti patikrintos ir pritaikytos kiekvienai *Ixodes* genties rūšiai.

1. 2. 4. *Babesia* spp.

Babezozė yra viena iš erkių platinamų ligų, kurią sukelia eritrocitiniai parazitai (8 pav.), priklausantys *Babesia* genčiai. Tai *Apicomplexa* klasės eukariotai priklausantys *Piroplasmida eilei*, *Babesiidae* šeimai. Šie parazitai sukelia sunkias ligas naminiams gyvūnams (jaučiams, arkliams, šunims ir kitiems). Babezozės atvejai daugiau žinomi veterinarinėje praktikoje. Gyvūnų tarpe dažniausiai pasitaikančios rūšys yra *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. motasi*, *B. bigemina*, *B. bovis*. Pastaraisiais metais vis daugiau šios genties atstovų aprašomi ir kaip žmogaus zoonozių sukėlėjai.

Babesia genties pirmuonims priklauso apie 100 rūšių, kurios buvo identifikuotos pagal savo morfologines savybes. Daroma prielaida, kad kiekviena iš rūšių yra specifiška šeimininkui (Blaschitz ir kt., 2008, Skotarczak B., 2008).



8 pav. *Babesia microti* inkluzija eritrocituose.

Šiuo metu yra nustatytos trys *Babesia* genties rūšys, kurios yra patogeninės žmogui: *B. bovis*, *B. microti*, *B. divergens* (Rudolf ir kt., 2005). Buvo manoma, kad Europoje labiausiai paplitę galvijų parazitai *B. divergens*, tačiau neseniai atlikti tyrimai parodė *B. microti* paplitimą Europos šalyse (Skotarczak B., 2008).

Nustačius, kad šiuos pirmuonis platina *Ixodes ricinus* erkės, buvo iškelta prielaida, kad *B. microti* ir *B. divergens* yra potencialiai pavojingi žmogaus sveikatai, nes gali būti pernešami įkandus erkei (Skotarczak B., 2008). Kiekvienais metais nustatoma vis daugiau žmonių babeziozių atvejų ir manoma, kad šis skaičius gali būti dar didesnis, nes didelė dalis infekcijų praeina be jokių simptomų, arba jie būna nespecifiniais (Rudolf ir kt., 2005). Dėl šios priežasties babezijų sukeltos infekcijos nediagnozuojamos.

Babesia spp. infekcijų simptomai dažniausiai pasireiškia vyresnio amžiaus, nusilpusio imuniteto žmonėms. Dažniausi žmonių babeziozės simptomai yra: kraujagyslinė hemolizė su hemoglobinurija, tulžies uždegimas ir nuolatinis karščiavimas, drebulys, prakaitavimas, galvos, raumenų, strėnų ir pilvo skausmai (Blaschitz ir kt., 2008).

Babesia spp., sukeltamų ligų diagnostikai naudojami įvairūs metodai. Dažnai atliekamas tyrimas yra kraujo tepinėlio, dažyto „Giemsa“ ar „Wright“ metodu, mikroskopavimas. Tačiau šis metodas nėra labai patikimas, ypač kai mėginyje sukėlėjo ląstelių nedaug, todėl infekcija gali būti net nepastebėta. Be to, tik pagal morfologines savybes nustatyti *Babesia* spp. yra labai sunku, kadangi *Babesia* genties pirmuonys yra labai panašūs į *Plasmodium* parazitus (Skotarczak B., 2008, Agüero-Rosenfeld M. E. M. D., 2003). Praktikoje naudojami ir serologiniai metodai, šiuo atveju specifiškesni tyrimai, kai naudojami didesnio titro antigenai. Kiti metodai, taikomi *Babesia* spp. diagnostikai, yra molekuliniai metodai, paremti polimerazės grandininė reakcija ir tolimesne šių produktų hibridizacija. PGR reakcijų taikiniai yra įvairūs: 18S rDNR genas, koduojantis mažojo ribosominio subvieneto RNR, β -tubulino baltymo genas ir karščio šoko baltymą (HSP 70), koduojantis genas. Tačiau dažniausiai naudojamas 18S rDNR geno taikinytis, kadangi šio geno dydis skirtingose *Babesia* spp. rūšyse svyruoja nuo 1720-1770 bp ir šis regionas yra konservatyvus visose rūšyse (Skotarczak B., 2008, Agüero-Rosenfeld M. E. M. D., 2003). Nustatyta, kad RLB hibridizacijos metodas tinkamas esant mišrioms infekcijoms, be to, šis metodas yra žymiai jautresnis ir specifiškesnis nei kiti iki šiol minėti metodai (İÇA ir kt., 2007). Naudojant šiuos du molekulinės biologijos metodus – PGR ir RLB hibridizaciją - galima gauti tikslius rezultatus.

2. Tyrimo objektas ir metodai

2. 1. *Ixodes ricinus* erkės

Ixodes ricinus erkes, surinko Užkrečiamų ligų profilaktikos ir kontrolės centras (ULPKC). Erkės surinktos iš keturių Lietuvos rajonų: Utenos raj. Vyžuonų šilo, Radviliškio raj. Linkaičių miško, Klaipėdos raj. Melnragės miško ir Kėdainių raj. Babėnų miško.

Dalis surinktų erkių buvo puluojama: 1000 *Ixodes ricinus* buvo supuluotos po penkias, tai yra 200 pulų. Dar 200 erkių buvo tiriama individualiai. Tirtos dviejų vystymosi stadijų erkės: nimfos ir suaugėliai. Buvo tirtas vienodas skaičius nimfų ir suaugėlių erkių (po lygiai moteriškų ir vyriškų individų). Tyrimų schema pateikta 1 priede.

Tolimesnėje tyrimų eigoje buvo ištirta dar 200 pulų (penkios erkės viename pule). Viso ištirta 2200 erkių (400 pulų ir 200 individualių erkių).

2. 2. Reagentai

- Trizolis,
Reagentų mišinys su revertaze ir Taq Polimeraze „SSIII 1-STEP qRT-PCR“,
Hibridizacijos buferis „UltraPure™ 20X SSPE“,
10% natrio dodecil sulfato tirpalas,
Peroksidaze žymėtas streptavidinas – **Invitrogen**.
- Buferiai:
Fosfatinis buferis (PBS),
500 mM NaHCO₃ ph 8,8,
20mM EDTA ph 8,0,
100 mM NaOH – **Roth**.
- RNazę šalinantis reagentas „RNase AWAY“,
DNR išskyrimo rinkinys “DNeasy Blood & Tissue Kit”,
HotStarTaq DNR polimerazė,
dNTP Mišinys, 10mM,
RNR stabilizavimo reagentas „RNAlater“ - **QIAGEN**.

- RNR saugojimo reagentas „RNAsecure“ – **Amersham Bioscience**.
- EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil) karbodiimidazolas) – **Sigma**.
- ECL detekcinis skystis “ Amersham ECL Detection fluid” – **Ge Healthcare**.
- Pradmenys ir zondai (F-TBE1, R-TBE1, TBE-probe-WT, ApMSP2f, ApMSP2r, ApMSP2p, B-5SBor, 23SBor, RLB-F2, RLB-R2, Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9) – **Intelligent DNA**.
- Ryškalas,
Fiksažas – **Kodak**.

2. 3. Įranga

Centrifūgos „Eppendorf 5804R“, Eppendorf 5415D“ – **Eppendorf**.

Laminaras „Biosafe 1.2 LF“ – **Holten**.

Audinių smulkintuvas „TissueLyser II“ – **QIAGEN**.

Hibridizacijos krosnis „RPN200“ – **Amersham Bioscience**.

Termomikseris „Termomixer comfort“ - **Eppendorf**.

Termocikleris „Termocycler gradient“ - **Eppendorf**.

Termocikleris „Rotorgene 6000“ - **Corbet Life Science**.

Maišyklė „MS2“ – **Biosan**.

2. 4. Tyrimo metodai

2. 4. 1. Erkių homogenizavimas

Į 2 ml mėgintuvėlius dedama po 245 µl PBS buferio, sudedamos erkės (penkios, jei tiriamas pulas ar viena, jei tiriamos individualios erkės) ir įdedamas vienas 5 mm nerūdijančio plieno rutuliukas. Mėgintuvėliai uždaromi ir sudedami į prieš tai atšaldytus (-20° C) audinių smulkintuvo „TissueLyser II“ adapterius. Mėgintuvėliai kratomi 30 kartų/s 4 minutes.

Po homogenizavimo mėgintuvėliai yra trumpai nucentrifuguojami (1 min/2000 aps/min greičiu). Paruošiami švarūs 1,5 ml mėgintuvėliai (vienas RNR, vienas DNR išskyrimui ir vienas mėgintuvėlis homogenizato saugojimui). Homogenizato saugojimui imama 20 µl RNR

stabilizavimo reagento "RNAlater" ir toks pat erkių homogenizato kiekis. Homogenizatas saugomas -20° C temperatūroje.

Į 1,5 ml mėgintuvėlius (skirtus RNR ir DNR ekstrakcijai) imama po 100 µl homogenizato.

2. 4. 2. Nukleino rūgščių ekstrakcija ir analizė

2. 4. 2. 1. RNR ekstrakcija

Į 100 µl homogenizato pridedama 300 µl Trizolio reagento, laikyto 4°C temperatūroje, išmaišoma ir inkubuojama 5 min kambario temperatūroje. Po inkubacijos pridedama 60 µl chloroformo, maišoma 15 s ir inkubuojama 10 min kambario temperatūroje (kas penkias minutes vorteksuojama). Po paskutinio vorteksavimo mėgintuvėliai cetrifuguojami 17 min 4°C temperatūroje (11000 g). Po cetrifugavimo viršutinis supernatantas perkeliamas į naują 1,5 ml mėgintuvėlį, pridedama 150 µl izopropanolio (laikyto -20°C temperatūroje), maišoma ir cetrifuguojama 17 min 4°C temperatūroje (11000 g). Po cetrifugavimo nusiurbiamas susidaręs supernatantas ir pridedama 300 µl 75% etanolio (laikyto -20°C temperatūroje), vorteksuojama 1 min ir cetrifuguojama 8 min 4°C temperatūroje (11000 g). Po cetrifugavimo supernatantas yra nusiurbiamas ir mėgintuvėliai paliekami 45 min džiūti, kad išgaruotų etanolio lašeliai. Kai mėgintuvėliuose išdžiūna skysčio lašeliai, pridedama 30 µl pašildyto iki 60°C RNR saugojimo reagento „RNAsecure“, atsargiai pamaišomi ir inkubuojama 10 min 60°C temperatūroje. Po inkubavimo RNR tirpalas saugomas -20°C temperatūroje.

2. 4. 2. 2. DNR ekstrakcija

DNR ekstrakcija iš 100 µl homogenizato, atliekama naudojant DNR išskyrimo rinkinį - "DNeasy Blood & Tissue Kit", laikantis gamintojo rekomendacijų.

2. 4. 2. 3. Erkinio encefalito RNR tikralaikė polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Tikralaikės polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama naudojant **Rotorgene 6000** PGR aparatą, laikantis gamintojo rekomendacijų, naudojant F-TBE1, R-TBE1 pradmenis ir TBE-probe-WT zondą (Intelligent DNA) ir reagentų mišinį „SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR“. Kaip teigiama kontrolė naudota infekcinė erkinio encefalito RNR (Lyginamosios tropinės medicinos ir parazitologijos instituto, Vokietija).

Pradmenų ir zondų sekos (Schwaiger ir kt., 2003):

TBE1-F - 5'> GGG CGG TTC TTG TTC TCC <3'

TBE1-R - 5'> ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT <3'

TBE-Probe-WT 56-FAM 5'> TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA <3'

Termociklerio tikralaikės PGR programa:

1. 42°C 30 min,
2. 95°C 10 min,
3. 95°C 15 s. 60°C 1 min – 45 ciklai

2. 4. 2. 4. *Anaplasma phagocytophilum* DNR tikralaikė polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Tikralaikės polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama naudojant **Rotorgene 6000** PGR aparatą, laikantis gamintojo rekomendacijų, naudojant ApMsp2f, ApMsp2r pradmenis ir ApMsp2p zondą (Intelligent DNA). Kaip teigiama kontrolė naudota *Anaplasma phagocytophilum* DNR (Lyginamosios tropinės medicinos ir parazitologijos institutas, Vokietija).

Pradmenų ir zondų sekos (Courtney ir kt., 2004):

ApMsp2f 5'> ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT <3'

ApMsp2r 5'> TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA <3'

ApMsp2p 5'> HEX TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG TAMRA <3'

Termociklerio tikralaikės PGR programa:

1. 95°C 10 min
2. 94°C 15 s. 60 °C 1 min – 50 ciklų.

2. 4. 2. 5. *Babesia* spp. 18S rDNR polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama naudojant **Mastercycler gradient** PGR aparatą, laikantis gamintojo rekomendacijų, naudojant RLB-F2, RLB-R2 pradmenis. Kaip teigiamos kontrolės, naudotos *Babesia* spp., *Babesia divergens* DNR (Lyginamosios tropinės medicinos ir parazitologijos institutas, Vokietija).

Pradmenų sekos (Gubbels ir kt., 1999):

RLB-F2 5'> GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G <3'

RLB-R2 5'> biotin-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT <3'

Termociklerio PGR programa:

1. 94°C 3 min
2. 94°C 20 s, 67-57°C 30 s, 72°C 30 s - 1°C per ciklą
3. 94°C 20 s, 57°C 30 s, 72°C 30 s - 40 ciklą
4. 72°C 10 min
5. 4°C

2. 4. 2. 6. *Borrelia* spp. 5S-23S rDNR intarpo polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama naudojant **Mastercycler gradient** PGR aparatą, laikantis gamintojo rekomendacijų, naudojant B-5SBor, 23SBor pradmenis. Kaip teigiamos kontrolės naudotos *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* DNR (Lyginamosios tropinės medicinos ir parazitologijos institutas, Vokietija).

Pradmenų sekos (Alekseev ir kt., 2001):

B-5SBor 5'> biotin-GAG TTC GCG GGA GAG TAG GTT ATT <3'

23SBor 5'> TCA GGG TAC TTA GAT GGT TC CTT <3'

Naudota PGR programa:

1. 94°C 3 min
2. 94°C 20 s, 60-52°C 30 s, 72°C 30 s - 1°C per ciklą
3. 94°C 20 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s - 40 ciklą

4. 72°C 7 min
5. 4°C

2. 4. 2. 7. *Babesia* spp. ir *Borrelia burgdorferi* sensu lato RLB hibridizacija

RLB hibridizacija atliekama naudojant polimerazės grandininės reakcijos produktus, kurie hibridizuojami su specifiniais zondais, kurių 5' gale *N*-(trifluoroacetamidoheksil-cianoetil, *N,N*-diisopropil fosforamido [TFA])-C6 amino žymuo:

Babesia:

***Babesia* spp. Z7 5'> amino-TAA TGG TTA ATA GGA RCR GTT G <3'**

***Babesia microti* Z8 5'> amino-CTT CCG AGC GTT TTT TTA TT <3'**

***Babesia divergens* Z9 5'> amino-GTT AAT ATT GAC TAA TGT CGA <3'**

Borrelia:

***B. burgdorferi* sensu lato Z1 5'> amino-CTT TGA CCA TAT TTT TAT CTT CCA <3'**

***B. burgdorferi* sensu stricto Z2 5'> amino-AAC ACC AAT ATT TAA AAA ACA TAA <3'**

***B. garinii* Z3 5'> amino-CAA AAA CAT AAA TAT CTA AAA ACA TAA <3'**

***B. afzelii* Z4 5'> amino-AAC ATT TAA AAA ATA AAT TCA AGG <3'**

***B. valaisiana* Z5 5'> amino-TAT ATC TTT TGT TCA ATC CAT GT <3'**

***B. lusitaniae* Z6 5'> amino-TCA AGA TTT GAA GTA TAA AAT AAA A <3'**

Membranos paruošimas. Atkerpamas reikiamas dydis membranos, membrana susukama ir dedama į hibridizacijos butelį, į kurį įpilama šviežiai paruošto 10 ml 16% EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil) karbodiimido) tirpalo. Membrana inkubuojama 10 min kambario temperatūroje hibridizacijos krosnelėje. Membrana po inkubacijos skalaujama distiliuotu vandeniu 2 min. Po plovimo membrana nusausinama ir perkeliama į minibloterį. Iš minibloterio kanalų išsiurbiamas skysčio perteklius; į kanalus užnešami atskiesti (75pmol/150µl) zondai (skiedžiama 500 mM NaHCO₃ pH 8,8 buferiu), inkubuojama 1 min. Po inkubavimo zondu tirpalai nusiurbiami. Membrana perkeliama į 100 ml 100mM NaOH, inkubuojama 10 min. Tada membrana skalaujama distiliuotu vandeniu ir perkeliama į hibridizacijos butelį, kur yra plaunama 5 min 60°C temperatūroje 125 ml 2 x SSPE-0,1 % SDS tirpalo.

PGR produktų paruošimas. 110 µl 2 x SSPE-0,1 % SDS tirpalo suspenduojama 40 µl PGR produkto. Kaitinama 10 min 99°C temperatūroje, po kaitinimo mėgintuvėliai atšaldomi šaldančiame stovelyje. Prieš atidarant mėgintuvėliai nucentrifuguojami (1 min/2000 aps/min).

Hibridizavimas. Membrana dedama į minibloterį taip, kad zondų takelių ir PGR produktų takelių kryptys susikirstų 90 laipsniu kampu. Į kanalėlius užnešami PGR produktai ir inkubuojama hibridizacijos krosnelėje 1 val. 42°C temperatūroje. Po inkubacijos membrana plaunama du kartus po 10 min 125 ml 2 x SSPE-0,5 % SDS tirpalo 51°C temperatūroje. Po plovimo membrana perkeliama į hibridizacijos butelį, į kurį įpilama 10 ml 1:4000 skiesto peroksidaze žymėto streptavidino (skiestas 2 x SSPE-0,5 % SDS), inkubuojama 40 min 42°C temperatūroje. Po inkubavimo membrana plaunama du kartus po 10 min 125 ml 2 x SSPE-0,5 % SDS tirpalo 42°C temperatūroje. Po to membrana plaunama du kartus po 5 min 125 ml 2 x SSPE tirpalo kambario temperatūroje. Po plovimo membrana perkeliama į hibridizacijos butelį, į kurį įpilama 10 ml šviežiai paruošto ECL tirpalo, inkubuojama 2 min kambario temperatūroje. Po inkubacijos membrana nusausinama ir perkeliama ant plėvelės.

Hibridizavimo produktų vizualizavimas. Membrana uždengta plėvele įdedama į fokasetę, uždengiama ECL hiperfilmu ir inkubuojama 1 min. Po inkubavimo membrana perkeliama į ryškalą (Kodak), laikoma 1 min. Skalaujama distiliuotu vandeniu ir 1 min laikoma fiksaže (Kodac). Visi etapai atliekami tamsoje.

3. Darbo rezultatai ir jų aptarimas

3. 1. Erkių nukleino rūgščių ekstrakcija

Darbo metu naudotos gegužės-rugpjūčio mėnesiais surinktos *Ixodes ricinus* erkės. Šis laikotarpis pasirinktas todėl, kad šie mėnesiai laikomi *Ixodes ricinus* erkių aktyvumo pikais ne tik Lietuvoje, bet ir visoje Europoje (Žygutienė M., 2008).

Darbo metu buvo tiriama 1200 erkių, iš kurių 1000 buvo supuluota po penkias į 200 pulų ir 200 pavienių erkių. Iš pulų ir pavienių erkių atlikta DNR ir RNR ekstrakcija. Supuluotų erkių nukleino rūgštys (DNR, RNR) buvo skirtos erkinio encefalito viruso RNR, *Anaplasma phagocytophilum* (DNR) ir *Babesia* spp. (DNR) nustatymui. Pavienių erkių nukleino rūgštys skirtos *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNR nustatymui. Iš pavienių erkių iškirta DNR ir RNR taip pat buvo naudota ir kitų erkių platinamų ligų sukėlėjų nustatymui; prieš tai nukleino rūgštys buvo supuluotos po ekstrakcijos proceso. Viso sudaryti 44 pulai. 1 priede yra pateikta atliktų tyrimų schema.

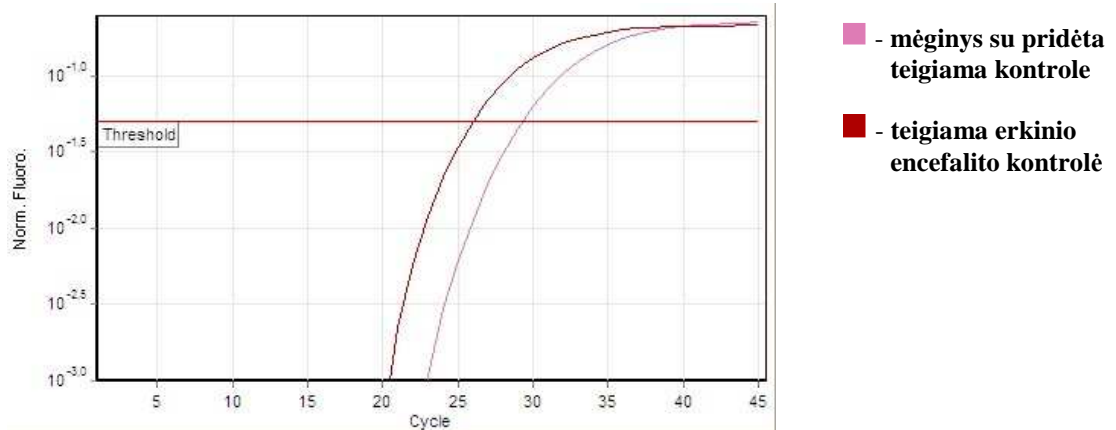
Siekiant iširti kuo didesnę erkių skaičių ir nustatyti erkių platinamų ligų sukėlėjų paplitimą Lietuvos erkėse, buvo iširtas papildomas erkių skaičius. Erkinio encefalito viruso ir *Borrelia burgdorferi* sensu lato nustatymui buvo papildomai atlikta RNR ir DNR ekstrakcija iš 1000 erkių (kurios buvo supuluotos į 200 pulų).

Tyrimų metu norint įsitikinti, kad vykdant RNR ekstrakciją neprarandamos nukleino rūgštys, buvo atlikti keli eksperimentai:

- naudotas glikogenas, kuris išryškina RNR nuosėdas mėgintuvėlyje;
- pridedama teigiamos kontrolės į erkių homogenizatą.

Glikogenas buvo pridedamas į mėgintuvėlį po antrojo centrifugavimo, prieš įpilant etanolį. Po paskutiniojo centrifugavimo, mėgintuvėlio dugne buvo matomos baltos nuosėdos, t.y. RNR nuosėdos. Atliekant RNR skyrimo procedūrą be glikogeno RNR nuosėdų nebuvo matomos.

Kito eksperimento metu, erkių homogenizavimo protokole buvo padaryti keli pakeitimai: buvo paimtas didesnis PBS buferio kiekis ir supilsčius homogenizatą įprastinei nukleino rūgščių ekstrakcijai, buvo paimtas papildomas mėgintuvėlis, į kurį buvo įpilta 70 µl homogenizato. Vieno mėginio RNR buvo skiriama dviem egzemplioriais, į vieną pridėjus teigiamos kontrolės, o į kitą ne. Po ekstrakcijos buvo atlikta tikralaikė PGR ir nustatyta, kad mėginyje su pridėta teigiama kontrole yra nustatoma erkinio encefalito viruso RNR, o tas pats mėginys be pridėtos teigiamos kontrolės yra neigiamas (9 pav.).



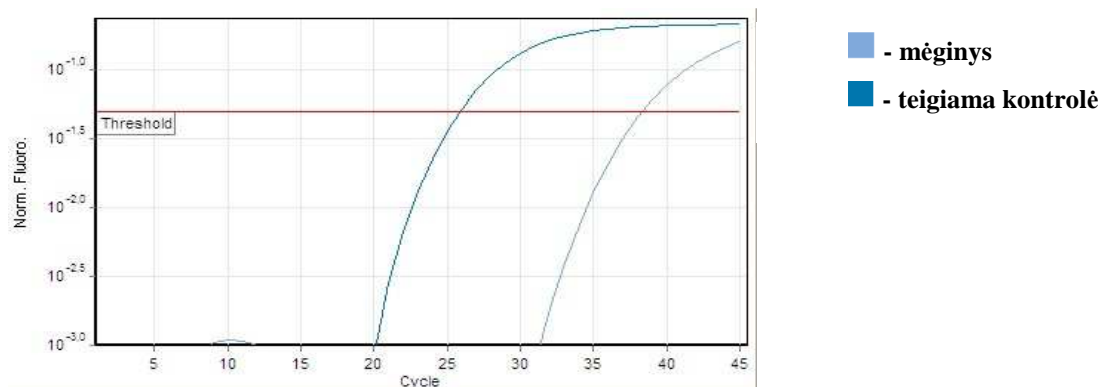
9 pav. Tikralaikės polimerazės grandininės reakcijos (PGR) rezultatai.

Eksperimentų metu nustatyta, kad atliekant RNR skyrimą nukleino rūgštys nėra prarandamos ir RNR išskiriama iš kiekvieno erkių homogenizato mėginio.

3. 2. Erkinio encefalito viruso RNR nustatymas tikralaikės polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu

Erkinio encefalito viruso tyrimams buvo naudota iš erkių homogenizatų išskirta RNR. Tyrimai atlikti naudojant atvirkštinės transkriptazės tikralaikę polimerazės grandininę reakciją, kuri literatūros duomenimis yra naudojama erkinio encefalito viruso diagnostikoje (Süss J. 2007).

Atlikus 200 RNR pulų tikralaikę polimerazės grandininę reakciją, buvo nustatytas vienas teigiamas erkinio encefalito viruso mėginys. 10 paveiksle yra parodytas tikralaikės PGR rezultatas.

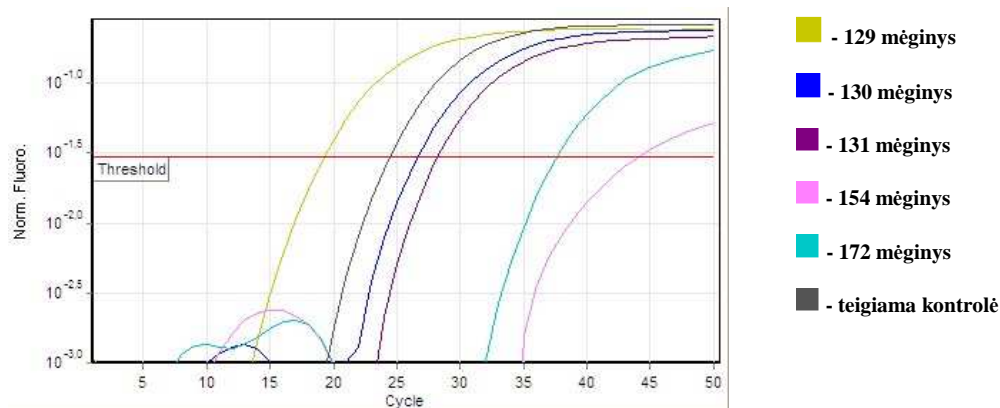


10 pav. Tikralaikės PGR metu nustatytas teigiamas erkinio encefalito mėginys.

Teigiamas mėginys buvo nustatytas Utenos rajone surinktose erkėse. Epidemiologiniais duomenimis šiame rajone erkinio encefalito užfiksuotų atvejų skaičius siekia 0-6 atvejų 100000 gyventojų.

Literatūros šaltinių duomenimis didžiausias erkinio encefalito atvejų skaičius užfiksuojamas Šiaulių, Kauno ir Panevėžio apskrityse (Žygutienė M., 2008, Süss ir kt., 2008), todėl norint įsitikinti, kad erkinio encefalito viruso nėra Radviliškio ar Kėdainių rajonuose surinktose erkėse, buvo atlikti papildomi erkių nukleino rūgščių tyrimai.

Atlikus papildomų erkių RNR ekstrakciją ir tikrąją PGR nustatyti dar penki teigiami erkinio encefalito mėginiai (11 pav.). Visi penki mėginiai buvo nustatyti surinktose Radviliškio raj. Linkaičių miške erkėse. Iš kitų rajonų surinktose erkėse teigiamų erkinio encefalito viruso mėginių nebuvo nustatyta.



11 pav. Erkinio encefalito nustatymo tikrąją PGR rezultatai.

Papildomai atlikti tikrąją PGR rezultatai patvirtino literatūros šaltiniuose minimus duomenis apie erkinio encefalito viruso paplitimą Šiaulių apskrityje (Žygutienė M., 2008, Süss ir kt., 2008).

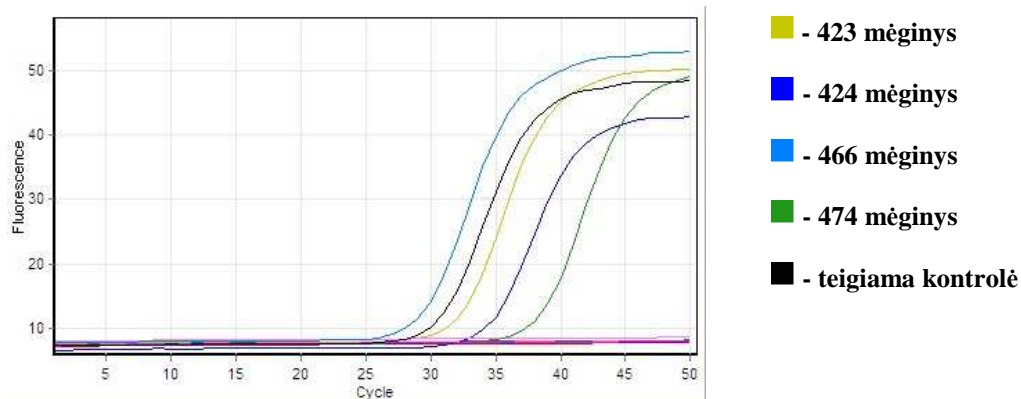
Tyrimų metu erkinio encefalito viruso RNR buvo nustatyta erkėse suaugėliuose ir nimfose: 3 teigiami mėginiai nustatyti patelėse, Radviliškio raj. ir 3 – nimfose, iš kurių du mėginiai buvo Radviliškio raj. ir vienas Utenos raj. surinktose nimfose. Duomenys apie erkinio encefalito paplitimą įvairiose erkių vystymosi stadijose nėra pateikiami, tačiau yra minima, kad EEV nešiotojais yra visų vystymosi stadijų erkės (Bormane A., 2007).

Visų teigiamų mėginių RNR buvo liofilizuota ir išsiųsti patvirtinimui į Lyginamosios tropinės medicinos ir parazitologijos institutą, Vokietija. Visų erkinio encefalito mėginių rezultatai buvo patvirtinti.

3. 3. *Anaplasma phagocytophilum* nustatymas tikralaikės polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu

Erkių platinamo sukėlėjo *Anaplasma phagocytophilum* diagnostikai buvo naudojama iš tiriamų erkių išskirta DNR. Šio mikroorganizmo DNR buvo ieškoma 1000 supuluotų erkių mėginiuose, t.y. ištirta 200 pulų ir 200 individualių erkių, supuluotų į 44 pulus, mėginiuose. Viso ištirta 244 DNR pulai. Tikralaikė PGR buvo atliekama naudojant *Anaplasma phagocytophilum* *msp2* geno fragmento taikinį.

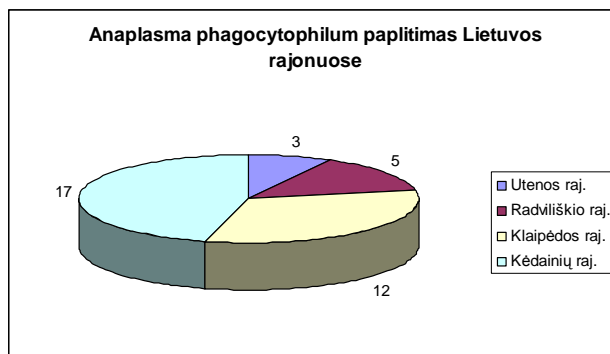
Atlikus 244 pulų DNR tyrimus, buvo nustatyti 37 (3 % tirtų mėginių) teigiami *Anaplasma phagocytophilum* mėginiai. Dalis gautų teigiamų mėginių PGR rezultatai yra pateikti 12 pav.



12 pav. *Anaplasma phagocytophilum* tikralaikės PGR rezultatai.

Lyginant gautus tyrimų rezultatus (nustatyta 3 % teigiamų *Anaplasma phagocytophilum* mėginių) su literatūros šaltiniuose minimais duomenimis, nustatyta, kad gauti rezultatai sutampa su ankstesnių Lietuvoje atliktų tyrimų rezultatais, kurie svyravo tarp 0-19,6 % (Paulauskas ir kt., 2008).

Tyrimų metu nustatytas *Anaplasma phagocytophilum* bakterijų skaičiaus pasiskirstymas tarp tirtų Lietuvos rajonų (13 pav.).

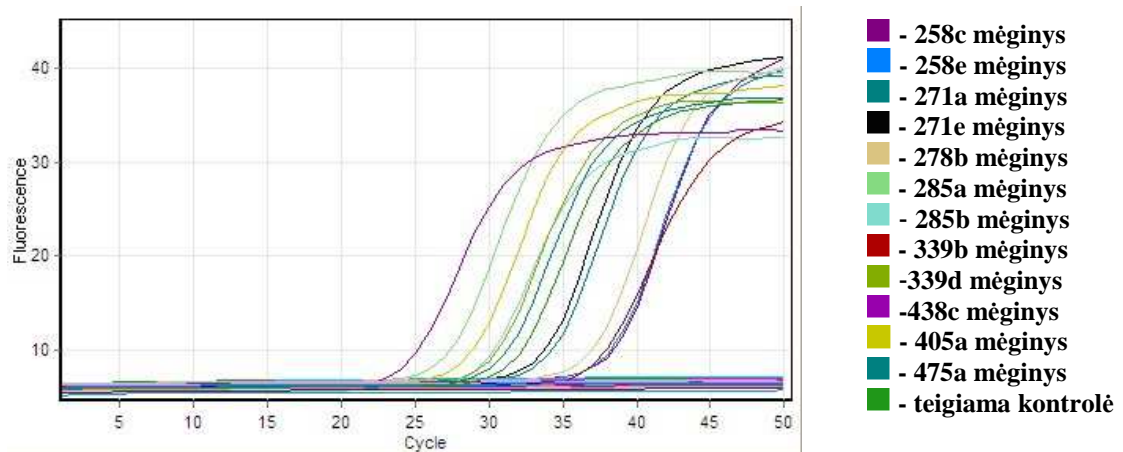


13 pav. Tyrimų metu nustatytų *Anaplasma phagocytophilum* pasiskirstymas Lietuvos rajonuose.

Didžiausias teigiamas *Anaplasma phagocytophilum* mėginių skaičius nustatytas Kėdainių raj., kur rasta 17 teigiamų mėginių (46 %). Klaipėdos raj. nustatyta 12 mėginių (32 %), Radviliškio raj. – 5 (14 %) ir mažiausias skaičius - 3 mėginiai (8 %) – Utenos raj.

Tyrimų metu pastebėtas ir *Anaplasma phagocytophilum* infekcijų pasiskirstymas tarp įvairių erkių vystymosi stadijų. Nustatyta, kad didesnė dalis teigiamų mėginių – 30 mėginių (81 %) - yra rasta erkių suaugėlių mėginiuose ir tik 7 teigiami mėginiai (19 %) – nimfose. Šie duomenys patvirtina literatūroje pateikiamus duomenis, kad *Anaplasma phagocytophilum* mikroorganizmai labiau paplitę erkių suaugėliuose nei nimfose (Grzeszcuk A., 2006, Derdàková ir kt., 2003).

Taip pat buvo palygintas pulų ir individualių erkių *Anaplasma phagocytophilum* bakterijų pasiskirstymas. Iš 44 DNR pulų gauti teigiami *Anaplasma phagocytophilum* mėginiai buvo ištirti individualiai. Gautų rezultatų duomenys pateikiami 14 pav.



14. pav. Individualių erkių *Anaplasma phagocytophilum* tikralaikės PGR rezultatai.

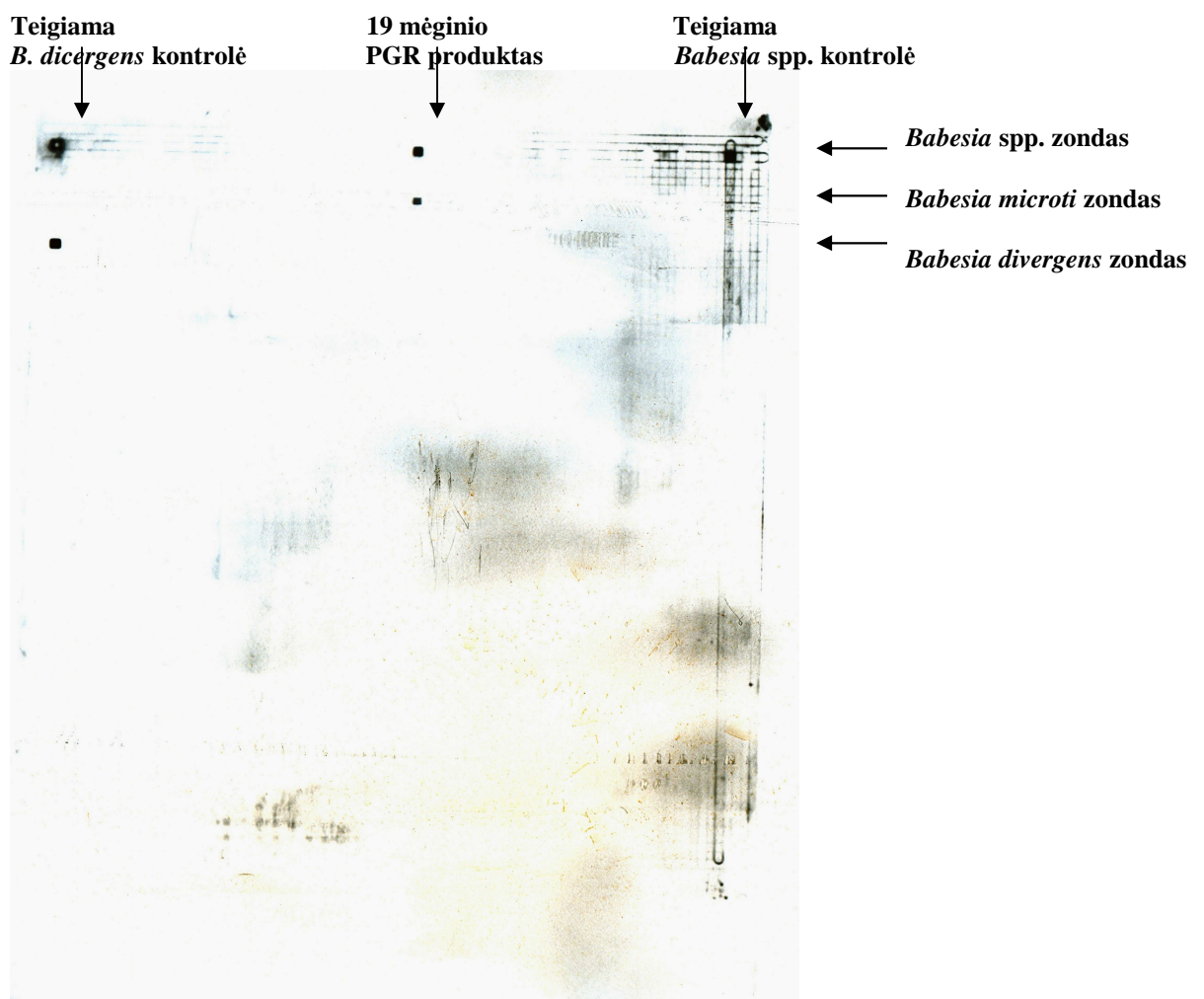
Nustatyta, kad anksčiau tirtuose penkių erkių DNR puluose teigiamą rezultatą duodavo iš vienos ar dviejų erkių išskirtos *Anaplasma phagocytophilum* DNR. Po du teigiamus *Anaplasma phagocytophilum* DNR mėginius buvo nustatyta 258 (c,e), 271 (a,e) ir 285 (a,b) mėginiuose. Kituose - 278 (b), 438 (c), 405 (a) ir 475 (a) - puluose teigiamą rezultatą davė viena iš penkių erkių.

Visi teigiami puluoti DNR mėginiai buvo išsiųsti patvirtinimui į Lyginamosios tropinės medicinos ir parazitologijos institutą, Vokietija. Visų mūsų tyrimuose gautų teigiamų *Anaplasma phagocytophilum* DNR mėginių rezultatai buvo patvirtinti.

3. 4. *Babesia* spp. nustatymas PGR ir RLB hibridizavimo metodais

Erkių platinamų sukėlėjų *Babesia microti* ir *Babesia divergens* nustatymui buvo naudoti supuluoti DNR mėginiai. Šiuose tyrimuose buvo naudota 18S rDNR polimerazės grandininė reakcija, kurios produktai buvo hibridizuojami su specifiniais zondais. Šios metodikos literatūros šaltiniuose minimos, kaip jautriausios, specifiškiausios ir labiausiai tinkančios *Babesia* pirmuonių nustatymui įvairiuose mėginiuose (Skotarczak B., 2008, Agüero-Rosenfeld M. E. M. D., 2003, İÇA ir kt., 2007).

Atlikus 244 pulų DNR polimerazės grandininę reakciją ir tolimesnę RLB hibridizaciją su specifiniais zondais, nustatytas tik vienas teigiamas *Babesia microti* mėginys. Teigiamas *Babesia microti* mėginys buvo nustatytas Utenos raj. surinktose erkėse, tyrimų eigoje supuluotoje individualių erkių DNR. Teigiamas šio tyrimo rezultatas pavaizduotas 15 paveiksle.



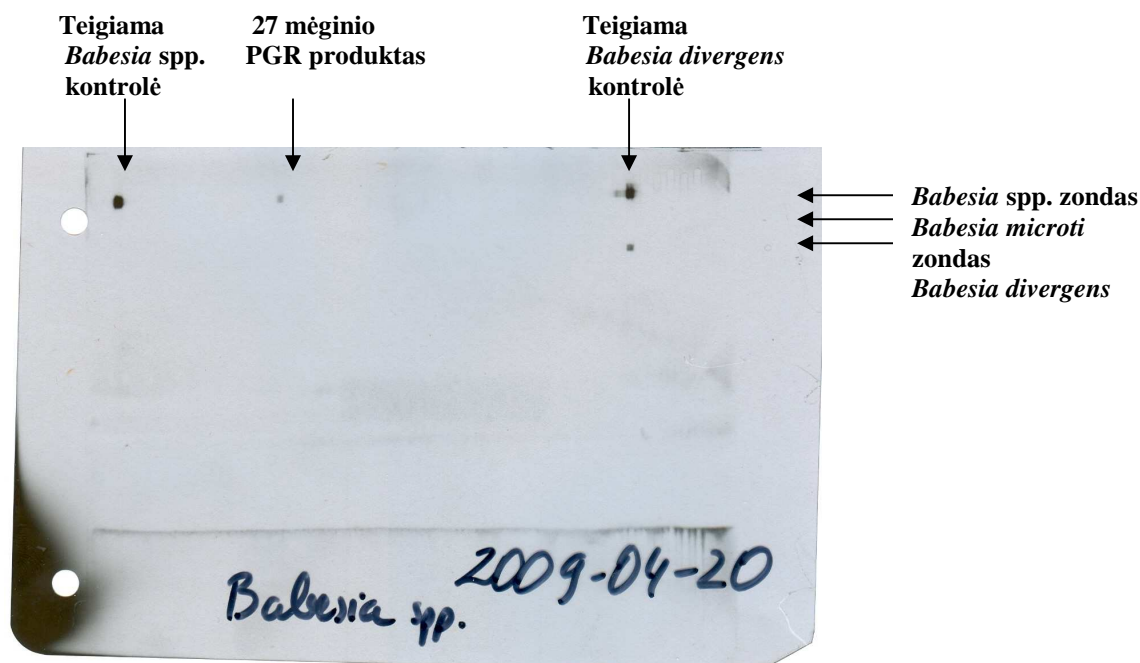
15 pav. *Babesia* spp. RLB hibridizacijos rezultatai, gauti hibridizuojant PGR produktus su specifiniais *Babesia* spp. hibridizavimo zondais. Rodyklėmis pavaizduota zondų ir PGR produktų įnešimo kryptys.

Iš hibridizacijos nuotraukos matosi, kaip teigiamų kontrolių produktai kartu su jiems specifiniais zondais formuoja hibridizacijos produktus. Pagal taškų išsidėstymą buvo nustatyta, kad 19 mėginys yra *B. microti* teigiamas, nes mėginio PGR produktas sureagavo su *Babesia* spp. ir *Babesia microti* zondais ir nebuvo reakcijos su *B. divergens* zonu.

Teigiamas *Babesia microti* mėginys nustatytas erkių suaugėlių mėginyje.

Atliekant tolimesnius erkių DNR tyrimus, buvo nustatyti du *Babesia* spp. teigiami mėginiai. Vienas šių mėginių buvo nustatytas Utenos raj., o kitas Radviliškio raj. surinktose erkių nimfose. Teigiamas RLB hibridizacijos rezultatas parodytas 16 pav.

Kaip matyti nuotraukoje, mėginio PGR produktas sureagavo tik su *Babesia* spp. zonu, su *Babesia microti* ir *B. divergens* zondais teigiamų rezultatų nedavė.



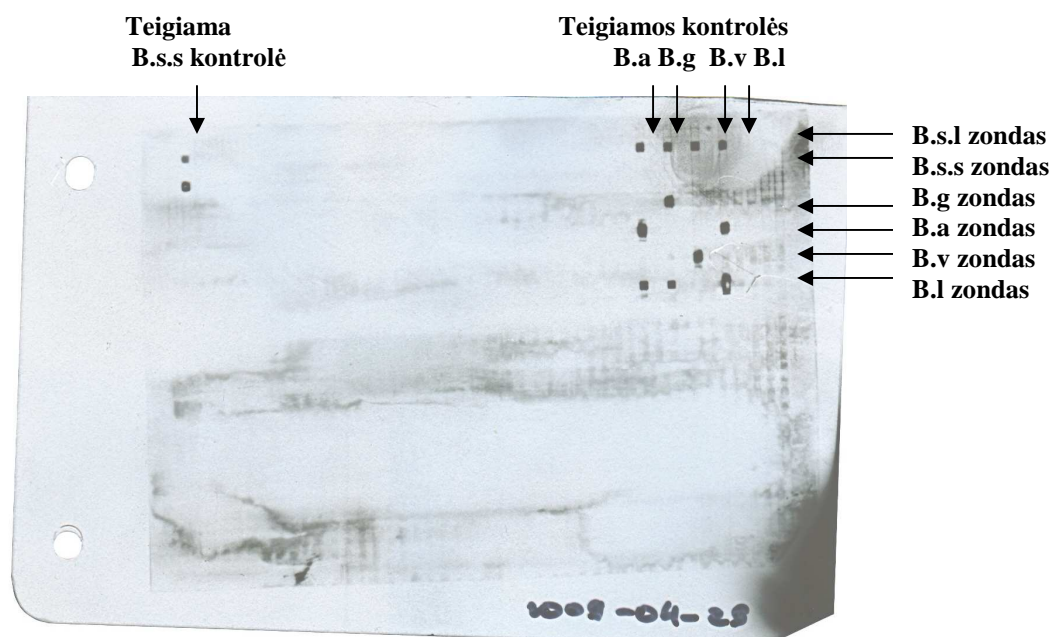
16 pav. *Babesia* spp. RLB hibridizacijos rezultatai, gauti hibridizuojant PGR produktus su specifiniais *Babesia* spp. hibridizavimo zondais. Rodyklėmis pavaizduota zondų ir PGR produktų įnešimo kryptys.

Tyrimų metu gauti tik trys teigiami mėginiai, iš kurių vienas buvo *Babesia microti*, o kiti du *Babesia* spp. Šių tyrimų rezultatai iš dalies sutampa su literatūros šaltiniuose minimais teiginiais, kad Europoje paplitusios *B. divergens* ir *B. microti* rūšys (Skotarczak B., 2008). Kadangi anksčiau Lietuvoje nebuvo atliekami tokio tipo tyrimai, o ir šis erkių platinamų ligų sukėlėjas nėra dar labai ištirtas, neįmanoma lyginti šių tyrimų rezultatus su kitų šalių tyrimais ir daryti išvadas apie *Babesia* spp. paplitimą Lietuvoje.

Teigiami mėginiai buvo išsiųsti patvirtinimui į Lyginamosios tropinės medicinos ir parazitologijos institutą, Vokietija. Mūsų tyrimuose gauti rezultatai buvo patvirtinti.

3. 5. *Borrelia burgdorferi* sensu lato nustatymas PGR ir RLB hibridizacijos metodais

Borrelia burgdorferi sensu lato tyrimuose buvo naudota 5S-23S rDNR intarpo amplifikacija ir šių PGR produktų RLB hibridizacija. Naudojant šiuos metodus buvo ištirti 444 DNR mėginiai, iš kurių 200 individualių erkių ir 244 supuluotų erkių. Negavus nei vieno teigiamo *Borrelia burgdorferi* sensu lato mėginio, dar papildomai buvo tirta 200 pulų. Tačiau ir šių tyrimų metu nebuvo nustatyti teigiami *Borrelia burgdorferi* sensu lato mėginiai. Vienas iš *Borrelia burgdorferi* sensu lato RLB hibridizacijos rezultatų yra parodytas 17 paveiksle.



17 pav. *Borrelia burgdorferi* sensu lato RLB hibridizacijos rezultatai, gauti hibridizuojant PGR produktus su specifiniais *Borrelia burgdorferi* sensu lato zondais. Rodyklėmis parodyta zondų ir PGR produktų užnešimo kryptys. *Borrelia burgdorferi* sensu lato sutrumpinimai: B.s.l – *Borrelia burgdorferi* sensu lato, B.s.s – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, B.a – *Borrelia afzelii*, B.g – *Borrelia garinii*, B.v – *Borrelia valaisiana*, B.l – *Borrelia lusitaniae*.

Kodėl nebuvo nustatyti teigiami *Borrelia burgdorferi* sensu lato mėginiai sunku paaiškinti. Literatūros šaltiniuose buvo minimi tokie atvejai, kai PGR metodu nebuvo nustatomos *Borrelia burgdorferi* sensu lato rūšys (Alekseev ir kt., 2001). Tačiau mūsų tyrimų metu rezultatų nebuvimo negalima aiškinti polimerazės grandininės reakcijos inhibicija, kaip jų eksperimentų atveju.

Tiriant mėginius buvo naudotos teigiamos kontrolės DNR, išskirta iš *Ixodes ricinus* erkių, jų PGR produktus panaudojus RLB hibridizacijai, kiekvieną kartą buvo gaunamas teigiamas rezultatas.

Tikėtina, kad galėjo įvykti DNR degradacija, arba naudota metodika nėra labiausiai tinkama *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNR nustatymui *Ixodes ricinus* erkėse.

Kaip rodo kitų tyrimų rezultatai, Laimo ligos sukėlėjas Lietuvoje yra plačiai paplitęs. Todėl norint nustatyti priežastis, kodėl visi tirti mėginiai buvo neigiami bus atliekami tolimesni erkių tyrimai.

Apibendrinant atliktą darbą galima teigti, kad buvo 2200 erkių DNR ir RNR ekstrakcija. Išskirtos nukleino rūgštys tolimesniuose tyrimuose naudotos erkių platinamų ligų sukėlėjų diagnostikai.

Darbo metu nustatyti šeši teigiami erkinio encefalito viruso mėginiai, iš kurių penki nustatyti Radviliškio raj. surinktose erkėse, kur yra fiksuojamas didelis erkinio encefalito susirgimų skaičius ir vienas teigiamas mėginys rastas Utenos raj.

Atliekant *Anaplasma phagocytophilum* diagnostiką, buvo nustatyti 37 (3 %) teigiami mėginiai. Didžioji dalis teigiamų mėginių buvo nustatyta erkių suaugėliuose (81 %) ir tik nedidelė dalis (19 %) nimfose. Didžiausias *Anaplasma phagocytophilum* bakterijų paplitimas nustatytas Kėdainių (46 %) ir Klaipėdos (32 %) rajonuose.

Pirmuonių *Babesia* spp. tyrimų metu buvo nustatytas vienas teigiamas *Babesia microti* mėginys Utenos raj. ir du *Babesia* spp. mėginiai (Utenos ir Radviliškio raj.).

Borrelia burgdorferi sensu lato tyrimų metu nustatyti nepavyko. Toks rezultatas gautas dėl DNR degradacijos arba metodikos netinkamumo šių bakterijų diagnostikai *Ixodes ricinus* erkėse.

Išvados

1) Atlikta 2200 *Ixodes ricinus* erkių nukleino rūgščių (DNR ir RNR) ekstrakcija. Nukleino rūgštys tolimesniuose tyrimuose naudotos įvairių erkių platinamų ligų sukėlėjų: erkinio encefalito viruso, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. ir *Borrelia burgdorferi* sensu lato diagnostikai.

2) Atlikus tikralaikės polimerazės grandininės reakcijos tyrimus nustatyti 6 teigiami erkinio encefalito RNR mėginiai. Vienas teigiamas mėginys nustatytas Utenos raj., kiti 5 Radviliškio raj.

3) Atlikus tikralaikę *msp2* geno fragmento polimerazės grandininę reakciją nustatyti 37 (3 %) teigiami *Anaplasma phagocytophilum* mėginiai, iš kurių 81 % mėginių nustatyti erkių suaugėliuose ir 19 % teigiamų mėginių - nimfose. Šių erkių platinamų ligų sukėlėjų didžiausias paplitimas nustatytas Kėdainių ir Klaipėdos rajonuose.

4) Panaudojus 18S rDNR geno fragmentų amplifikavimą ir šių produktų RLB hibridizavimą, atlikta *Babesia* spp. diagnostika visuose DNR mėginiuose. Nustatytas vienas *Babesia microti* atvejis ir du *Babesia* spp.

5) Pritaikius PGR 5S-23S rDNR intarpo polimerazės grandininę reakciją ir panaudojus amplifikavimo produktus RLB hibridizacijai, *Borrelia burgdorferi* sensu lato bakterijos nebuvo nustatytos.

Summary

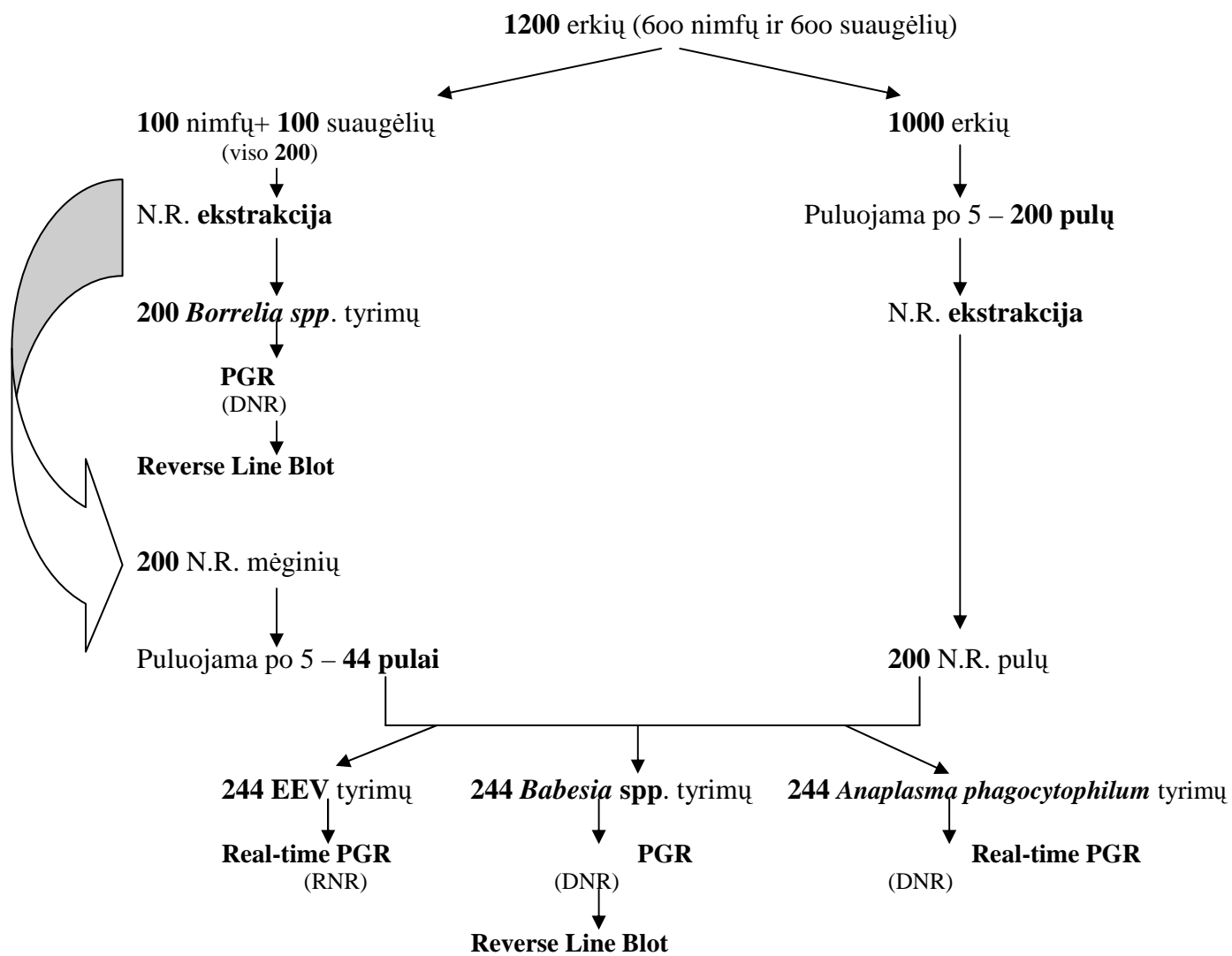
Ticks of genus *Ixodes* that infect livestock, deer, dogs, and a wide variety of other species including humans. *Ixodes ricinus* can also transmit numerous diseases including tick-borne encephalitis, Lyme diseases (*Borrelia burgdorferi* sensu lato infections), babesiosis (*Babesia microti* and *Babesia divergens* infections). It can also spread *Anaplasma phagocytophilum* bacteria.

Now tick-borne infections are the most frequent human vector-borne infections in Europe, the incidence of these infections has been on rise, and new infections have emerged.

The study and identification of tick transmitted pathogens is complicated as required investigation of the pathogen-host system. Several methods have been developed for direct detection of pathogens in infected vectors, host tissue, and clinical specimens from patient. However, detection methods used till yet are time-consuming, or have limited specificity and sensitivity. In recent years, molecular detection methods based on PCR amplification of the nucleic acids of pathogens and Reverse Line blot hybridization have been showed to be effective, sensitive and specific methods for diagnosis of tick-borne diseases.

In this work were used molecular detection methods for tick-borne pathogens: tick-borne encephalitis virus (TBEV), *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Babesia* spp., diagnostics in 2200 ticks collected in four Lithuanian regions forests. During investigation were identified six cases of TBEV, which five positive samples were from ticks collected in Radviliškis region and one from Utenos region forest. *Anaplasma phagocytophilum* bacteria infections were most frequent in Lithuanian ticks, during researches were identified 37 (3 %) cases (17 (46 %) in Kėdainių region, 15 (32 %) – Klaipėdos, 5 (14 %) – Radviliškio, and 3 (8 %) – Utenos region). In these 81 % were in adult ticks and 19 % - in nymphs. During investigation of *Babesia* species were identified one *Babesia microti* in Utenos region and 2 *Babesia* spp. cases (Utenos, Radviliškio region forests). *Borrelia burgdorferi* sensu lato investigation gave no results.

Erkių platinamų ligų sukėlėjų tyrimų schema



N.R. – nukleino rūgštys

EEV – Erkinio encefalito virusas

Reverse Line Blot – RLB hibridizacija

Literatūros sąrašas

1. Alekseev A. N., Dubinina H. V., Van de Pol I., and Schouls L. M. 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 39, 2237-2242.
2. Agüero-Rosenfeld M. E. M. D. 2003. Laboratory Aspects of Tick-Borne Diseases: Lyme, Human Granulocytic Ehrlichiosis and Babesiosis. *Journal of Medicine*, Vol. 70, 197-206.
3. Biaduń W., Rzymowska J., Stiępień-Rukasz H., Niemczyk M., and Chybowski J. 2007. Occurrence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from roe deer and deer shot in the south-east of Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, Vol. 51, 212-217.
4. Blaschitz M., Narodslavsky-Gföller M., Kanzler M., Stanek G., and Walochnik J. 2008. *Babesia* Species Occuring in Austrian *Ixodes ricinus* Ticks. *Applied and Env. Microbiology*, Vol. 74, 4841-4846.
5. Bormane A., Zeltina A., Lucenko I., Mavčutko V., Duks A., Pujate E., Ranka R., Baumanis V. 2004. Tick-borne encephalitis – pathogen, vectors and epidemiological situation in Latvia 2002-2003. *Biology*, Vol. 676, 27-37.
6. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R. J., Bjoërsdorff A., Caruso G., Cinco M., Fournier P. E., Francavilla E., Jensenius M., Kazar J., Laferl H., Lakos A., Furlan S. L., Maurin M., Oteo J. A., Parola A., Perez-Eid C., Postic D., Raoult D., Tellez A., Tselensis Y. and Wilske B. 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology*, Vol. 10, 1108-1132.
7. Courtney J. W., Kostelnik L. M., Zeidner N., and Massung R. F. 2004. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, 3164-3168.
8. Derdáková M., Halánová M., Stanko M., Štefančíková A., Čisláková L., Pet'ko B. 2003. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med*, Vol. 10, 269-271.
9. Dumler J. S., Choi K.-S., Garcia-Garcia J. C., Barat N. S., Scorpio D. G., Garyu J. W., Grab D. J., and Bakken J. S. 2005. Human Granulocytic Anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectiuos Disease*, Vol. 11, 1828-1833.
10. Dumpis U., Crook D., and Oksi J. 1999. Tick-Borne Encephalitis. *CID*, Vol. 28, 882-890.

11. Poupon M.-A., Lommano E., Humair P.-F., Douet V., Rais O., Schaad M., Jenni L., and Gern L. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Ticks Collected from Migratory Birds in Switzerland. *APPL. AND ENVIRON. MICROBIOL*, Vol. 72, 976-979.
12. Hanincová K., Liveris D., Sandigursky S., Wormser G. P., and Schwartz I. 2008. *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto Is Clonal in Patients with Early Lyme Borreliosis. *APPL. AND ENVIRON. MICROBIOL*, Vol. 74, 5008-5014.
13. Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. 2003. Tick-borne encephalitis . *Antiviral Research*, Vol. 57, 129-146.
14. Grzeszczuk A. 2006. *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and human granulocytic anaplasmosis seroprevalence among forestry rangers in Bialystok region. *Advances in Medical Science*, Vol. 51, 283-286.
15. Gubbels J. M., De Vos A. P., Van der Weide M., Viseras J., Schouls L. M., De Vries E., and Jongelan F. 1999. Simultaneous Detection of Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37, 1782-1789.
16. İÇA A., İNCİ A., Yildirim A. 2007. Parasitological and Molecular Prevalence of Bovine and *Babesia* Species in the Vicinity of Kayseri. *J. Vet. Anim.* Vol. 31, 33-38.
17. Jääskeläinen A. E., Tikkakoski T., Uzcátegui N. Y., Alekseev A. N., Vaheri A., and Vapalahti O. 2006. Siberian Subtype Tickborne Encephalitis Virus, Finland. *DISPATCES*, Vol. 12, 1568-1571.
18. Lindquis L., Vapalahti O. 2008. Tick-borne encephalitis. *Lancet*, Vol. 371, 1861-1871.
19. Liveris D., Gazumyan A., and Schwartz I. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. 1995. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 33, 589-595.
20. Lucenco I., Jansone I., Velicko I., and Pujate I. 2004. Tickborne encephalitis in Latvia. *Eurosurveillance*, Vol. 8, 1-2.
21. Mantke O. D., Schädler R., Niedrig M. 2008. A survey on cases of ticks-borne encephalitis in European countries. *Eurosurveillance*, Vol. 13, 1-8.
22. Mickienė A., Laiškoniš A., Günther G., Lundkvist A., and Lindquis L. 2002. Tickborne Encephalitis in an Area of High Endemicity in Lithuania: Disease Severity and LongTerm Prognosis. *CID*, Vol. 35, 650-658.

23. Paulauskas A., Radzijeuskaja J., Ambrasienė D., Rosef O. 2008. Detection of tick-borne pathogens by molecular methods. *Biologija*, Vol. 54, 192-197.
24. Radzišauskienė D., Ambrozaitis A., Balčiūnienė L. 2008. Erkinis encefalitas: klinikinis atvejis ir literatūrinė apžvalga. *Biomedicinos teorija ir praktika*, Vol. 14, 290-295.
25. Randolph S. E. 2001. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *The Royal Society*, Vol. 356, 1045-1056.
26. Ranka R., Bormane A., Salmina K., and Baumanis V. 2004. Identification of Three Clinically Relevant *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospieces by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S-23S Ribosomal DNA Spacer Amplicons. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, 1444-1449.
27. Rijpkema S. G. T., Molkenboer M. J. C. H., Scouls L. M., Jongelan F., and Schellekens J. F. P. 1995. Simultaneous Detection and Genotyping of Three Genomic Groups of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks by Characterization of the Amplified Intergenic Spacer Region between 5S and 23S rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 33, 3091-3095.
28. Rudolf I., Golovchenko M., Šikutová S., Rudenko N., Grubhoffer L., and Hubálek Z. 2005. *Babesia microti* (Piroplasmida: Babesiidae) in nymphal *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the Czech republic. *Folia Parasitologica*, Vol. 52, 274-276.
29. Schouls L. M., Van de Pol I., Rijpkema S. G. T., and Schot C. S. 1999. Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37, 2215-2222.
30. Skotarczak B. 2008. Babesiosis as a disease of people and dogs. Molecular diagnostics: a review. *Veterinarni Medicina*, Vol. 53, 229-235.
31. Süß J. 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – Epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance*, Vol. 13, 1-8.
32. Schwaiger M., Cassinotti P. 2003. Development of quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology*, Vol. 27, 136-145.
33. Žygutienė M. 2008. *Ixodes ricinus* erkės ir jų platinamos ligos. *Epidemiologijos žinios*, Vol. 6, 1-3.
34. Žygutienė M., Alekseev A., Dubinina H., Kazlauskienė R. 2008. Evidence for a risk of tick-borne infection in the city parks of Vilnius, Lithuania. *Ekologija*, Vol. 54, 40-43.

35. Žygutienė M., Ranka R., Salmina K. 2003. Genospecies of *Borrelia burgdorferi* S. L. in *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania. *Acta Zoologica Lithuania*, Vol. 13, 385-389.
36. Wodecka B. 2003. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* Ticks in North-Western Poland. *Ann Agric Environ Med*. Vol. 10, 171-178.