

Vilniaus Universitetas
Gamtos mokslų fakultetas
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

**LAIMO LIGOS SUKĖLĖJO *BORRELIA BURGDORFERI*
SENSU LATO PAPLITIMAS GRAUŽIKUOSE IR JŲ
EKTOPARAZITUOSE *IXODES RICINUS* L. ERKĖSE**

Eglės Šivytės

Magistrinis darbas

Darbo vadovas:
doc. dr. J. Turčinavičienė

Vilnius 2010

TURINYS

ĮVADAS	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA	4
1.1. Laimo ligos sukėlėjas.....	4
1.1.1. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato kompleksas.....	4
1.1.2. Morfologinė <i>B. burgdorferi</i> s.l. struktūra.....	5
1.1.3. <i>B. burgdorferi</i> s.l. paplitimas.....	5
1.1.4. <i>B. burgdorferi</i> s.l. tyrimai Lietuvoje.....	6
1.2. <i>B. burgdorferi</i> s.l. vektoriai.....	7
1.2.1. Pagrindiniai erkių biologiniai bruožai.....	8
1.2.2. Vektoriai Europoje.....	9
1.2.3. Vektorių apsikrėtimo borelijomis būdai.....	10
1.2.4. Vektoriaus <i>B. burgdorferi</i> s.l. perdavimas šeimininkui.....	11
1.3. Rezervuariniai šeimininkai.....	12
1.3.1. Borelijų išsilaikymas rezervuariniuose šeimininkuose.....	13
1.3.2. Rezervuarinio šeimininko nustatymo būdai.....	14
1.3.3. Rezervuariniai šeimininkai Europoje.....	15
1.3.4. Bioįvairovės svarba Laimo ligos ekologijai.....	16
1.3.5. Graužikai – pagrindiniai <i>B. burgdorferi</i> s.l. rezervuariniai šeimininkai.....	17
1.4. <i>B. burgdorferi</i> s.l. tyrimo metodai.....	18
1.5. PCR reakcijos aprašymas.....	19
1.6. <i>B. burgdorferi</i> s.l. prevencija.....	20
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	21
2.1. Graužikų gaudymas, juos parazitavusių erkių nurinkimas bei fiksavimas.....	21
2.2. Graužiko amžiaus nustatymas.....	22
2.3. Aktyvių erkių surinkimas ir fiksavimas.....	22
2.4. Erkių rūšių identifikavimas.....	23
2.5. Molekuliniai tyrimai.....	23
2.5.1. DNR iš graužiko audinių skyrimas.....	23
2.5.2. DNR iš erkių audinių skyrimas.....	24
2.5.3. PGR metodas <i>I. ricinus</i> identifikavimui.....	24
2.5.4. PGR metodas <i>B. burgdorferi</i> s.l. identifikavimui.....	25
2.5.5. PGR metodas <i>B. burgdorferi</i> s.l. genotipų identifikavimui.....	25
2.6. Statistinė analizė.....	26
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
3.1. <i>I. ricinus</i> erkių nuo augmenijos užsikrėtimo <i>B. burgdorferi</i> s.l. tyrimai.....	28
3.2. Graužikų užsikrėtimas <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	29
3.3. <i>B. burgdorferi</i> s.l. genotipų graužikuose nustatymas.....	32
3.4. <i>B. afzelii</i> paplitimas graužikuose ir nuo augmenijos surinktose <i>I. ricinus</i> nimfose.....	32
3.5. Graužikų užsikrėtimas <i>I. ricinus</i> erkėmis.....	33
3.6. Graužikų užsikrėtimas <i>I. ricinus</i> nimfomis ir <i>B. afzelii</i> spirochetomis.....	34
3.7. Užsikrėtimo nimfomis skirtumai tarp rūšių.....	35
3.8. Užsikrėtimas <i>I. ricinus</i> nimfomis skirtingose graužikų lytyse.....	36
3.9. Sukėlėjo perdavimas <i>I. ricinus</i> lervoms.....	38
3.10. Graužikų užsikrėtimas <i>I. ricinus</i> lervomis.....	39
IŠVADOS.....	42
SUMMARY	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	45

IVADAS

Laimo liga arba Laimo boreliozė yra labiausiai Europoje, Šiaurės Amerikoje, Rusijoje ir Tolimuosiuose Rytuose plintanti, erkių pernešama zoonozė (Masuzawa, 2004, Wang ir kt., 1999, Sinski ir kt., 2006, Barbour, 1998). Tai yra dažniausia *Ixodes ricinus* erkių pernešama infekcija (Krupka ir kt., 2007, Žakovska ir kt., 2008). Daugiausia jos atvejų užfiksuojama Centrinėje-Rytų Europoje (Derdakova, Lenčakova, 2005). Laimo boreliozė yra vis didėjanti visuomenės sveikatos problema (Piesman, Gern, 2004, Hillyard, 1996). Kasmet tiek Europoje, tiek Šiaurės Amerikoje užfiksuojama tūktančiai ligos atvejų (Wang ir kt., 1999, Ostfeld, Keesing, 2000, Barbour, 1998).

Pastaraisiais metais vykstant klimato pokyčiams, žmogui vis labiau keičiant jį supančią aplinką, *Ixodes ricinus* erkių gausumas Europoje sparčiai auga. To pasėkoje daugėja ir erkių pernešamų susirgimų (Tsao, 2009, Derdakova, Lenčakova, 2005).

Gamtoje enzootinį Laimo ligos ciklą sudaro: sukėlėjas – *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.), serkė - vektorius, ir rezervuarinis šeimininkas (Humair, Gern, 2000). *B. burgdorferi* s.l. tyrimai sukėlėją platinančiose erkėse ir rezervuariniuose šeimininkuose, kaip ir tikslus *B. burgdorferi* s.l. genotipų nustatymas padėtų tiek suprasti šios ligos ekologiją ir epidemiologiją, tiek nustatyti efektyvias prevencijos priemones (Derdakova, Lenčakova, 2005).

Šio darbo tikslas – įvertinti dviejų pagrindinių rezervuarinių šeimininkų geltonkaklės pelės (*Apodemus flavicollis*) ir rudojo pelėno (*Myodes glareolus*) bei jų ektoparazitų – *Ixodes ricinus* erkių vaidmenį *B. burgdorferi* s.l. enzootiniame cikle.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti nuo augmenijos surinktų *I. ricinus* nesubrendusių vystymosi stadijų erkių užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. lygį, bei identifikuoti genotipus.
2. Ištirti dažniausių Lietuvos graužikų *A. flavicollis* ir *M. glareolus* užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. lygį ir identifikuoti genotipus.
3. Nustatyti graužikų užsikrėtimo *I. ricinus* erkėmis lygį ir ištirti skirtumus tarp graužikų rūšių, amžiaus grupių ir lyties.
4. Įvertinti graužikų *B. burgdorferi* s.l. perdavimo *I. ricinus* lervoms efektyvumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1. 1. Laimo ligos sukėlėjas

1982 metais Willy Burgdorfer ir kolegos nustatė, jog Laimo ligos priežastis yra spirochetos, kurios Šiaurės Amerikoje cirkuliuoja *Ixodes scapularis* erkėse (Wang ir kt., 1999, Schwan, Piesman, 2002, Agüero-Rosenfeld ir kt., 2005). Atradėjo garbei joms suteiktas *Borrelia burgdorferi* vardas. Po metų borelijos identifikuotos ir Europoje *Ixodes ricinus* erkėse (Masuzawa, 2004). Tai yra labai plačiai tyrinėjama mikroorganizmų grupė. Atlikta daugybė tyrimų *B. burgdorferi* s.l. ekologijos, epidemiologijos, mikrobiologijos ir prevencijos srityse (Piesman, Gern, 2004, Agüero-Rosenfeld ir kt., 2005).

Laimo liga yra multisisteminiis uždegiminiis susirgimas (Wilske ir kt., 2007, Derdakova, Lenčakova, 2005). Borelioze serga ne tik žmogus. Ji taip pat kankina naminius gyvūnus - šunis, arklius, kates ir galvijus (Krupka ir kt., 2007). Laimo ligos klinikiniai simptomai dažniausiai pasireiškia palaipsniui. 70 proc. pacientų erkės įkandimo vietoje kelių dienų bėgyje atsiranda taisyklingos apskritimo formos odos paraudimas, vadinamas erythema migrans. Vėliau spirochetos išplinta į kitas organų sistemas (Krupka ir kt., 2007, Derdakova, Lenčakova, 2005, Agüero-Rosenfeld ir kt., 2005, Reed, 2002). Borelijos aptiktos odos, cerebrospinalinio skysčio, sąnario, endomiokardo, rainelės biopsijose, šlapime (Derdakova, Lenčakova, 2005) ir kraujo pavyzdžiuose (Agüero-Rosenfeld ir kt. 2005). Ūminėje fazėje pacientą kankina gripo simptomai. Negydoma liga komplikuojasi į artritą, odos, neurologinius ar širdies sutrikimus (Krupka ir kt., 2007, Agüero-Rosenfeld ir kt., 2005). Klinikiniai simptomai nebūdingi laukiniams gyvūnams. Tai greičiausiai susiję su ilgai trunkančia borelijų ir jų natūralioje gamtoje gyvenančių šeimininkų evoliucija (Krupka ir kt., 2007, Humair, Gern, 2000).

1.1.1. *Borrelia burgdorferi* sensu lato kompleksas

Borrelia burgdorferi sensu lato yra priskiriama eubakterijų tipui, *Spirochetales* bakterijų eilei, *Treponemataceae* šeimai (Pavilonis ir kt., 2000).

Spirochetos sudaro monofiletinę bakterijų grupę, turinčią tiek parazitines, tiek laisvai gyvenančias formas (Tsao, 2009). *Borrelia* gentyje jau yra nustatytos daugiau nei 37 rūšys, kurių dauguma sukelia žmogaus ir naminių gyvūnų ligas (Schwan, Piesman, 2002). Šios *Borrelia* rūšys remiantis ekologiniais bei genetiniais skirtumais yra išskiriamos į du pagrindinius skyrius: borelijas sukeliančias grįžtamąją šiltinę ir borelijas sukeliančias Laimo

ligą (Wang ir kt., 1999, Masuzawa, 2004). Visos šiuo metu žinomos borelijų rūšys (išskyrus *Borrelia recurrentis*) yra platinamos erkių (Schwan, Piesman, 2002). Laimo borelioze sukeliančias *B. burgdorferi* s.l. platina *Ixodes* genties erkės. Grįžtamąją šiltinę sukeliančias *B. hermsii* ir *B. turicatae* spirochetas platina *Argasidae* erkės (*Ornithodoros sp.*, *Argas persicus*), vienintelę *B. recurrentis* platina žmoginė utėlė (*Pediculus humanus*) (Masuzawa, 2004, Schwan, Piesman, 2002).

Dabar *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) komplekso sąvoka naudojama kalbant bendrai apie visas erkių platinamas *Borrelia* genties rūšis, kurios susijusios su Laimo borelioze (Wang ir kt., 1999). Šiuo metu *B. burgdorferi* s.l. kompleksui priklauso 15 rūšių (Margos ir kt., 2009, Žakovska ir kt., 2008). Iš jų penkios - *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bissettii* ir *B. spielmanii* - yra žmogaus Laimo boreliozės priežastis (Žakovska ir kt. 2008). *B. valaisiana* ir *B. lusitaniae* statusas nėra galutinai nustatytas (Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005). Nors jos buvo rastos Laimo liga sirgusiuose pacientuose (Rauter, Hartung, 2005, Wang ir kt., 1999, Derdakova, Lenčakova, 2005, Richter ir kt., 2005). Nuolat išskiriamos ir aprašomos naujos rūšys, todėl skaičius greičiausiai yra ne galutinis.

1.1.2. Morfolginė *B. burgdorferi* s.l. struktūra

Borrelia burgdorferi s.l. yra vienalastės gram-neigiamos spiralės formos, neturinčios tvirtos sienelės 10-30µm ilgio ir 0,2-0,5µm skersmens bakterijos (Krupka ir kt., 2007, Agüero-Rosenfeld ir kt., 2005, Wang ir kt., 1999, Gassman ir kt., 1991). Spirochetų forma priklauso nuo 7 – 11 periplazminėje erdvėje esančių žiuželių. Žiuželiai prisitvirtinę ląstelės galuose, apsvynioję aplink ląstelės cilindą ir persidengia ties ląstelės viduriu. Asimetrinis periplazminių žiuželių sukimasis sukelia kelių tipų judesius, leidžiančius borelijoms judėti net labai tankiuose audiniuose, kurių neįveikia kitos bakterijų grupės (Tsao, 2009). Išimtis 2-4 žiuželius turinti, ir dėl to nejudri *B. sinica* (Krupka ir kt., 2007). Beveik 1500 bp dydžio borelijų genomą sudaro viena linijinė chromosoma, bei kelios žiedinės ir linijinės plazmidės (Tsao, 2009).

1.1.3. *B. burgdorferi* s.l. paplitimas

Laimo boreliozė paplitusi šiauriniame pusrutulyje, (Wilske ir kt., 2007, Humair, Gern, 2000) vidutinio klimato juostoje (Tsao, 2009, Rauter, Hartung, 2005, Barbour, 1998). Laimo liga praktiškai neaptinkama pietinėse JAV ar Europos dalyse (Gray, 2001). Pavieniai ligos

atvejai užfiksuoti ir pietiniame pusrutulyje – Pietų Amerikoje, Afrikoje, Australijoje, tačiau sukėlėjai nebuvo rasti vietinėse *Ixodes* genties erkėse ar kituose numanomuose vektoriuose (Wang ir kt., 1999).

Rusijoje ir Tolimųjų Rytų Azijos šalyse cirkuliuoja šešios *B. burgdorferi* s.l. rūšys. *B. garinii* ir *B. afzelii* randamos *I. persulcatus* erkių areale. *B. japonica*, *B. tanukii* ir *B. turdi* aptinkamos tik Japonijoje (Wang ir kt., 1999, Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005). Šiaurės Amerikoje identifikuotos trys rūšys: vyraujančioji *B. burgdorferi* s.s., *B. bissettii* ir *B. andersonii* (Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005).

Per pastaruosius du dešimtmečius atlikta daugybė darbų *B. burgdorferi* s.l. paplitimo bei jo genetinės įvairovės Europoje tematika. Laimo liga paplitusi visoje Europoje, neaptinkama tik pietiniame ir šiauriniame pakraščiuose (Derdakova, Lenčakova, 2005). Europoje aptiktos septynios *B. burgdorferi* s.l. rūšys: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii* ir *B. spielmanii* (Žakovska ir kt., 2008). Geografinis skirtingų *B. burgdorferi* s.l. komplekso rūšių paplitimas yra nevienodas. Jis gali varijuoti net gana mažose teritorijose, taip pat skirtis laiko atžvilgiu (Derdakova, Lenčakova, 2005, Wilske ir kt., 2007). Daugumoje Europos valstybių patys dažniausi yra *B. afzelii* ir *B. garinii* genotipai (Žakovska ir kt., 2008, Derdakova, Lenčakova, 2005). *B. burgdorferi* sensu stricto labiausiai paplitusi Vakarų Europoje, nors aptinkama ir rytinėje Europos dalyje (Piesman, Gern, 2004, Wilske ir kt., 2007). Paukščių platinamos *B. valaisiana* gana plačiai paplitusi visoje Europoje, tuo tarpu su driežais siejama *B. lusitaniae* aptinkama gana retai. *B. spielmani* aptikta tik keliuose valstybėse (Tsao, 2009, Derdakova, Lenčakova, 2005).

1.1.4. *B. burgdorferi* s.l. tyrimai Lietuvoje

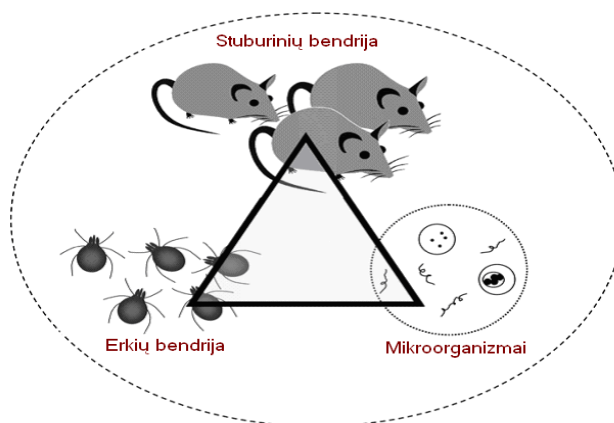
Lietuvoje pirmieji *B. burgdorferi* s.l. tyrimai erkėse pradėti 1987 metais naudojant tamsaus lauko mikroskopiją (Radzijeuskaja ir kt., 2006). PGR metodas pirmą kartą panaudotas 2001 metais (Ambrasienė ir kt., 2004, Radzijeuskaja ir kt., 2006).

Lietuvoje vienintelis žinomas *B. burgdorferi* s.l. vektorius – *I. ricinus* erkės. Erkių užsikrėtimas borelijomis buvo tirtas skirtingose jų gyvenimo stadijose, lytyse, skirtinguose geografiniuose regionuose ir skirtinguose biotopuose (Turčnavičienė ir kt., 2006). *B. burgdorferi* s.l. tyrimai rezervuariniuose šeimininkuose atliekami nuo 2005 metų naudojant PGR metodą. Sukėlėjas rastas *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus agrarius*, *Rattus norvegicus* ir *Mus*

musculus graužikuose. Taip pat atliekami šiuos graužikus parazitavusių *Ixodes ricinus* lervų ir nimfų tyrimai (Radzijeuskaja ir kt., 2006).

1.2. *B. burgdorferi* s.l. vektoriai

Enzootinis *B. burgdorferi* s.l. ciklas vyksta erkės-vektoriaus ir jos parazituojamo šeimininko dėka (Piesman, Gern, 2004) (1 pav.).



1pav. *B. burgdorferi* s.l. enzootiniame cikle dalyvaujančios gyvūnų grupės (Pagal Tsao, 2009).

Erkių rūšis dalyvauja ligos sukėlėjo cikle ir priskiriama vektoriams jeigu tenkina tris reikalavimus: (i) jeigu maitinimosi metu įgyja sukėlėją iš parazituojamo šeimininko, (ii) išlaiko sukėlėją nėrimosi metu – vykstant vystymosi stadijų kaitai, (iii) perduoda sukėlėją kitam rezervuariniui šeimininkui kito maitinimosi metu (Tsao, 2009).

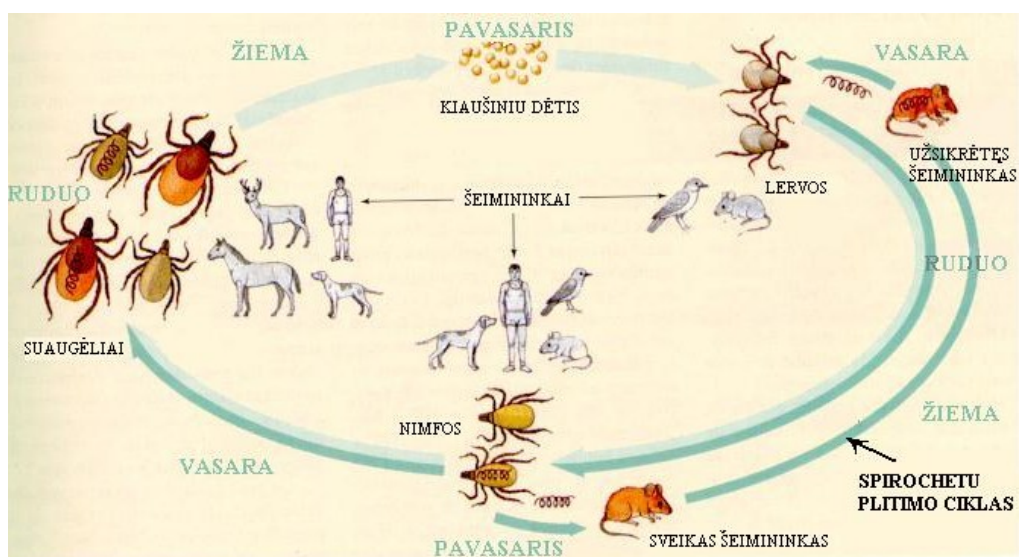
Šiuo metu *I. ricinus-persulcatus* kompleksui priklausančios erkės - *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus*, *I. persulcatus* - yra vienintelės pripažintos *B. burgdorferi* s.l. vektoriais, galinčiais perduoti sukėlėją ir žmogui (Derdakova, Lenčakova, 2005, Wang ir kt., 1999, Barbour, 1998). Vektoriai, kurie gali turėti kontaktą su žmogumi vadinami zoonotiniai vektoriai (bridge vectors). Tačiau ciklo palaikyme gamtoje vektoriais tarnauja ir kitos iksodinių erkių rūšys, su kuriomis žmogus nesusiduria - tai enzootiniai vektoriai (cryptic vectors) (Tsao, 2009).

Borelijos taip pat rastos uoduose (Krupka ir kt., 2007), sparvose, *Stomoxydae* musėse, blusose, utelėse ir *Ixodidae* šeimai nepriklausančiose erkėse, tačiau jų galimybės perduoti sukėlėją šeimininkui nėra ištyrta, todėl jie laikomi nešiotojais (carrier). Nešiotojai gali perduoti borelijas vykstant vystymosi stadijų kaitai, tačiau nesugeba spirochetų perduoti šeimininkui (Derdakova, Lenčakova, 2005).

1.2.1. Pagrindiniai erkių biologiniai bruožai

Erkės yra maitinimosi metu tvirtai prie odos prisikabinantys (Hillyard, 1996) obligatiniai kraujasiurbiai parazitai (Schwan, Piesman, 2002). Jos maitinasi ant įvairių stuburinių gyvūnų (Masuzawa, 2004): tiek žinduolių, tiek paukščių, roplių (Barbour, 1998) ir retkarčiais varliagyvių (Hillyard, 1996). Dėl maitinimosi krauju erkės yra svarbūs laukinių gyvūnų bei naminių galvijų ligų pernešėjai (Buczek ir kt., 2006b). Visame Pasulyje erkių pernešamų organizmų kiekis ir įvairovė greičiausiai yra didesnis nei bet kurių kitų nariuotakojų. Daugybė virusų, bakterijų, protistų, perduodama arba tiesiogiai įkandus erkei, arba netiesiogiai - užkrečiant išskyromis, išmatomis ar sutraiškytais erkių kūnais. Pasulyje erkės perduoda daugiau nei 100 iš 500 žinomų nariuotakojų platinamų virusų (Hillyard, 1996).

Iksodinėms erkėms būdingos trys postembrioninio vystymosi stadijos: lervos, nimfos ir suaugėlio – patino ir patelės (2 pav.). Kiekvienoje vystymosi stadijoje erkės maitinasi stuburinio gyvūno krauju. Maitinimosi metu vyksta borelijų perdavimas tarp erkės ir jos šeimininko. Išsiritusi erkė lervinėje stadijoje įgyja sukėlėją maitindamasi užsikrėtusio šeimininko krauju. Spirochetos išlaikomos erkėje jai neriantis (vykstant gyvenimo stadijų kaitai). *B. burgdorferi* s.l. ciklas baigiasi kuomet naujai išsinėrusi nimfa užkrečia kitą stuburinį šeimininką. Manoma, kad toks sukėlėjo perdavimas vienos kartos nimfų kitos kartos lervoms rezervuarinių šeimininkų dėka vaidina kartinį vaidmenį Laimo ligos sukėlėjo palaikyme gamtoje (Tsao, 2009) (2 pav.).



2 pav. *I. ricinus* erkių ir erkių parazituojamų gyvūnų įtaka *B. burgdorferi* s.l. plitime.

<http://anne.decoester.free.fr/spiro/borcycle.jpg>

Vektoriaus biologija yra svarbus veiksnys ligos epidemiologijoje. Erkės pagal gyvenamąją vietą/būdą skirstomos į dvi grupes: eksofilinės (non-nidiculous) ir endofilinės (nidiculous). Eksofilinės erkės (pvz.: *I. ricinus*) aukos laukia ant augmenijos, tuo tarpu endofilinės (*I. hexagonus*, *I. uriae*) gyvena aukos lizde ar jai labai artimoje aplinkoje. Todėl žmogus retai susiduria su endofilinėmis erkėmis (Tsao, 2009, Piesman, Gern, 2004, Buczek ir kt., 2006a).

1.2.2. Vektoriai Europoje

Europoje trys iksodinių erkių rūšys yra pripažintos *B. burgdorferi* s.l. vektoriais: *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus* ir *Ixodes uriae*. Jos tarpusavyje skiriasi savo ekologija, visos skirtingose gyvenimo stadijose (lervos, nimfos ir suaugusios patelės) parazituoja skirtingus šeimininkus, bei parazituoja gana skirtingą šeimininkų ratą (Piesman, Gern, 2004).

Ixodes ricinus yra svarbiausias erkių pernešamų zoonozių vektorius Europoje (Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005). Ji žmogui bei gyvūnams perduoda tiek virusus (pvz.: erkinį encefalitą), bakterijas (pvz.: *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*), tiek protistus (*Babesia microtii*, *Babesia divergens*) (Derdakova, Lenčakova 2005, Gray, 2001, Barbour, 1998).

Tai yra labai plačiai Europoje paplitusi rūšis, aptinkama nuo 65° iki 39° platumos. Labiausiai paplitusi lapuočių ir mišrių miškų biotopuose, kadangi erkėms būtina drėgna aplinka (Piesman, Gern, 2004). *I. ricinus* išgyvena tik jei vidutinis mikroaplinkos drėgnumas didesnis nei 80 proc. (Gray, 2001, Barbour, 1998). Didelis drėgnumas randamas augmenijos apatiniame sluoksnyje ir lapų nuokritose (Piesman, Gern, 2004). Skirtingose vystymosi stadijose erkės pasižymi nevienodu jautrumu drėgmės svyravimams. Dėl šios priežasties skirtingose stadijose erkės šeimininko laukia skirtingame augmenijos aukštyje (Tsao, 2009). O tai įtakoja skirtingą parazituojamų šeimininkų ratą (Buczek ir kt., 2006b). Nesubrendusiose stadijose (lervos ir nimfos) erkės gyvūno laukia žemesniame aukštyje, todėl parazituoja tiek smulkius, tiek stambesnius gyvūnus. Tuo tarpu subrendusioje (suaugėlės) stadijoje eksofilinės erkės šeimininko laukia aukščiau, bei parazituoja vidutinio dydžio ir stambiusius žinduolius. Šeimininko paieškai eksofilinės erkės reaguoja į šviesą, CO₂, temperatūrą bei gyvūno kvapą (Tsao, 2009). Vidutinio klimato ir subarktinuose regionuose erkių elgsenai sezono metu didžiausią reikšmę turi dienos trukmė ir temperatūra (Buczek ir kt., 2006a b). *I. ricinus* komplekso erkės geba daugintis ir išgyventi nuo -10 iki +35°C temperatūros intervale ir tik trumpai toleruoja kraštutines sąlygas (Barbour, 1998). Todėl daugumoje rūšių šaltu ir sausu

metų laiku yra stabdomas vystymasis. Dėl šios priežasties daugumoje arealų šeimininkų ieškojimas yra aktyviausias pavasarį (Gray, 2001), kai temperatūra pakyla iki +3-4°C (Walker, 2001) ir ankstyvą vasarą, o vidurvasarį aktyvumas krenta. Bendras temperatūros kilimas gali padidinti erkių tankumą ir išplitimą, kadangi tai prailgina jų vystymosi periodą, padidina augalų augimą ir tokiu būdu išplečia erkėms tinkamus arealus ir pagerinant šeimininkų suradimo galimybes (Gray, 2001). Erkių populiacijų tankumas yra dažnai kur kas didesnis mažuose, žmogaus dirbamais laukais izoliuotuose plotuose negu dideliuose miškuose. Tai sąlygoja mažesnis rezervuarinių šeimininkų plėšrūnų kiekis ir didesnės maisto atsargos. Todėl miškų vientisumo pažeidimas gali sukelti Laimo ligos protrūkius (Ostfeld, Keesing, 2000).

Nuo augmenijos surinktų *Ixodes ricinus* erkių užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. bakterijomis varijuoja nuo 0 iki 11 proc. lervoms (vidurkis 1,9 proc.), nuo 2 iki 43 proc. nimfoms (vidurkis 10,8 proc.), bei nuo 3 iki 58 proc. suaugėlėms (vidurkis 17,4 proc.). Retkarčiais nustatomas ir didesnis užsikrėtimo lygis, dažniausiai remiantis PGR analize.

Ixodes hexagonus yra viena dažniausių endofilinių erkių rūšis Europoje. Gyvena kiaušinių gyvūnėlių urvuose ir ežių lizduose. Retais atvejais parazituoja naminius gyvūnus, tokius kaip šunys ir katės. Esant tokiam gyvenimo būdui, *I. hexagonus* tik atsitiktinai parazituoja žmogų. Kita plačiai Europoje paplitusi rūšis, kuri galbūt atlieka antrinį vaidmenį enzootiniame *B. burgdorferi* s.l. cikle yra *Ixodes trianguliceps*. Šios erkės daugiausia parazituoja graužikus. Jose buvo nustatyta *B. burgdorferi* s.l. (Piesman, Gern, 2004)

Trečiasis *B. burgdorferi* s.l. vektorius Europoje yra *Ixodes uriae* erkės. Jos parazituoja jūros paukščius, bei gyvena jų lizduose (Piesman, Gern, 2004).

1.2.3. Vektorių apsikrėtimo borelijomis būdai

I. ricinus lervos, nimfos ir suaugusios patelės borelijas įgyja keturiais būdais:

1) erkei maitinantis borelijomis užsikrėtusio rezervuarinio šeimininko krauju.

2) maitinantis šalia neužsikrėtusiai erkei greta užsikrėtusios (co-feeding). Tokiu atveju infekcija gali būti neišplitusi po parazituojamo šeimininko audinius. Kuo daugiau erkių maitinasi toje pačioje vietoje tuo didesnis sukėlėjo perdavimo efektyvumas.

Užkrėstai erkei pasimaitinus ir palikus šeimininką, spirochetos gali išlikti stuburinio gyvūno odoje iki keturių savaičių, prisisiurbimo vietoje. Ten pat besimaitindama neužsikrėtusi erkė gali įgyti sukėlėją. (localized extended co-feeding).

3) erkei neriantis borelijos išlieka sekančioje gyvenimo stadijoje – tai transtadijinis perdavimo būdas.

4) labai retais atvejais borelijos gali migruoti į suaugusios patelės ovarijas ir būti perduodamos transovariniu būdu (Tsao, 2009, Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005, Alekseev, Dubinina, 2002).

Kadangi toje pačioje teritorijoje gali cirkuliuoti kelios *B. burgdorferi* s.l. rūšys, erkėse aptinkama mišri, kelių rūšių infekcija. Mišri infekcija pasitaiko rečiau nei užsikrėtimas viena rūšimi (Rauter, Hartung, 2005). Mišri infekcija iš kelių *B. burgdorferi* s.l. rūšių buvo aptikta erkėse, rezervuariniuose šeimininkuose ir pacientuose. Mišrios infekcijos paplitimas erkėse skirtinguose geografiniuose regionuose varijuoja nuo 5 iki 40 procentų (Wang ir kt., 1999). *I. ricinus* erkėse buvo aptiktos dviejų, trijų borelijų genomorūšių skirtingos mišrios infekcijos kombinacijos. Daugumoje atvejų tai buvo *B. garinii* ir *B. valaisiana*, mažiau *B. garinii* ir *B. afzelii*. Kelias borelijų rūšis erkės įgauna besimaitindamos keliomis rūšimis infekuoto šeimininko krauju arba skirtingais genotipais jos pasikeičia tarpusavyje besimaitindamos greta (co-feeding). Jeigu iksodinės erkės išlaiko borelijas vykstant vystymosi stadijų kaitai, skirtingos borelijų rūšys gali būti įgyjamos kelių metų bėgyje iš skirtingų šeimininkų. Mišri infekcija dažniausiai nustatoma PGR metodu. Kultivavimo metodu tokią infekciją nustatyti sunkiau, kadangi viena rūšis gali nustelbti kitą (Piesman, Gern, 2004).

1.2.4. Vektoriaus *B. burgdorferi* s.l. perdavimas šeimininkui

Ankščiau buvo manoma, jog spirochetos perduodamos erkei atryjant ar tuštinantis (Schwan, Piesman, 2002). Dabar žinoma, jog *B. burgdorferi* s.l. stuburiniui šeimininkui yra perduodama erkės maitinimosi metu, jos seilių pagalba. Daugumoje alkanų *I. ricinus* nimfų ir suaugėlių erkių, spirochetos randamos vidurinėje žarnoje (Piesman, Gern, 2004, Gray, 1998, Schwan, Piesman, 2002). Erkei pradant maitintis plonoji žarna pripildoma krauju ir borelijos ima dalintis (Barbour, 1998, Schwan, Piesman, 2002). Erkei maitinantis, borelijos per žarnos sienelę migruoja į hemocelį bei pasiekia jos seilių liaukas, iš kurių seilių pagalba pasiekia šeimininką (Humair, Gern, 2000, Barbour, 1998, Gray, 2001). Prisikabinusi erkė išskiria kraujagysles plečiančius mediatorius ir imunomodulatorius, kurie sukelia kraujoplūdį ir palengvina sukėlėjo perdavimą (Derdakova, Lenčakova, 2005, Gray, 2001).

Šiaurės Amerikoje efektyviausias *B. burgdorferi* s.s. perdavimas *I. scapularis* erkių prasideda tik po 48 valandų (Tsao, 2009, Piesman, Gern, 2004, Derdakova, Lenčakova, 2005). Europoje vidutiniškai praėjus 24 valandoms po erkės prisisiurbimo, tačiau bandymuose gaunami skirtingi rezultatai, kas rodo esant skirtingą įvairių *Borrelia* rūšių judėjimą *I. ricinus* erkėse (Derdakova, Lenčakova, 2005). Taip pat mikroskopiniai alkanų *I. ricinus* erkių tyrimai

rodo, jog spirochetos gali būti seilių liaukose dar prieš prisisiurbimą. Tais atvejais sukėlėjas perduodamas daug greičiau (Piesman, Gern, 2004).

Patekusi į žinduolio audinius, ji kurį laiką išbūna prisisiurbimo vietoje, bei migruoja į kitas gyvūno organų sistemas (Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005). Stuburiniuose žinduoliuose borelijos tirtos įvairiuose organuose: odoje, kraujyje, sąnariuose, blužnyje, širdyje, kepenyse, šlapimo pūslėje, inkstuose, nervų sistemoje (Humair, Gern, 2000).

1.3. Rezervuariniai šeimininkai

Iš visų pagrindinių *B. burgdorferi* s.l. vektorių, *I. ricinus* parazituoja didžiausią stuburinių gyvūnų ratą, daugiau nei 300 stuburinių rūšių. (Piesman, Gern, 2004, Derdakova, Lenčakova, 2005) Tai yra dažniausiai žmogų parazituojanči erkė. *I. ricinus* parazituoja ypatingai platų gyvūnų spektrą, nuo smulkiųjų, iki stambiųjų žinduolių, paukščių, driežų. Iki šiol keletas jų patvirtinti kaip rezervuariniai *B. burgdorferi* s.l. šeimininkai (Piesman, Gern, 2004).

Reiktų atskirti gyvūnų rūšis, kurios yra tik erkių šeimininkai (t.y. erkės maitinasi jų krauju, tačiau juose retai arba visiškai nerandamos *B. burgdorferi* s.l. bakterijos) ir tikruosius rezervuarinius šeimininkus, kurie nešioja borelijas, bei kurių pagalba didžioji dalis erkių nesubrendusiose gyvenimo stadijose įgyja *B. burgdorferi* s.l. spirochetą (Piesman, Gern, 2004).

Rezervuarinis šeimininkas turi: (i) būti pakankamai dažnai parazituojamas erkių-vektorių, (ii) įgyti sukėlėją iš jų parazituojančios erkės, (iii) leisti sukėlėjui pasidauginti bei išlikti audiniuose ilgesnį laiką, (iv) perduoti sukėlėją kitai parazituojančiai erkei (Tsao, 2009).

B. burgdorferi s.l. nustatymas šeimininko audiniuose rodo jo imlumą infekcijai, tačiau tai nerodo, jog jis yra rezervuarinis šeimininkas. Jis turi efektyviai perduoti sukėlėją besimaitinančiai erkei. Gerais rezervuariniais šeimininkais yra laikomos gyvūnų rūšys, kurios įgijusios sukėlėją sugeba jį išlaikyti ilgą laiką, bei tarnauja kaip infekcijos šaltinis parazituojančioms erkėms-vektoriams (Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005). Smulkieji graužikai apkrėsti erkių išlaiko spirochetas žiemos metu iki pavasario, kai erkės vėl suaktyvėja (Humair, Gern, 2000).

Skirtingos *Borrelia burgdorferi* s.l. rūšys cirkuliuoja skirtinguose rezervuariniuose šeimininkuose. Taip pat netgi tas pats erkės šeimininkas gali perduoti skirtingas *B. burgdorferi* s.l. rūšis skirtingu efektyvumu (Humair, Gern, 2000, Wang ir kt., 1999).

Apodemus ir *Myodes* genties graužikuose dažniausiai randama *B. afzelii*, žymiai rečiau *B. burgdorferi* s.s.. *B. burgdorferi* s.s. cirkuliuoja ir paukščių pagalba. *B. garinii* siejama su paukščiais, bei retais atvejais *B. garinii* Osp 4 serotipas (*B. bavariensis* sp. nov. (Margos ir kt.,

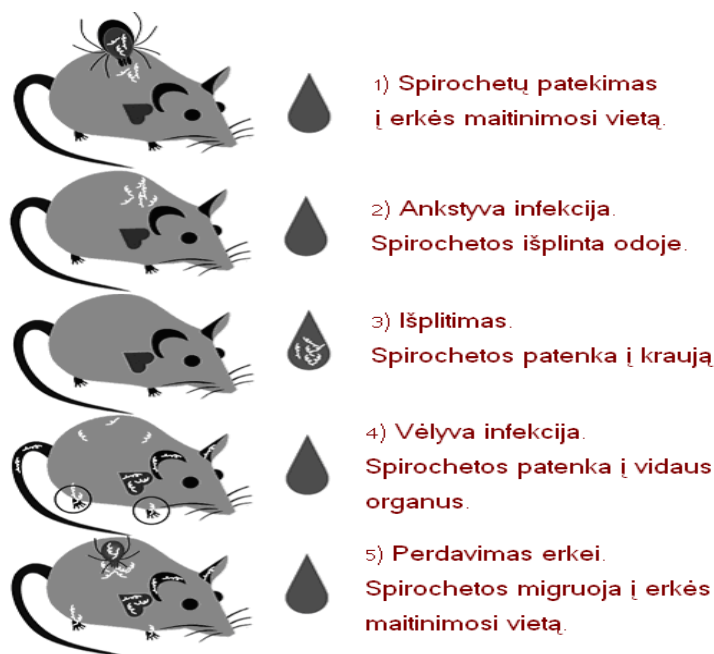
2009)) aptinkamas graužikuose. *B. valaisiana* aptinkama išimtinai tik paukščiuose (Margos ir kt., 2009, Humair, Gern, 2000, Piesman, Gern, 2004). Todėl skirtingų *B. burgdorferi* s.l. rūšių paplitimas erkių populiacijose priklauso nuo rezervuarinių šeimininkų tose vietovėse įvairovės ir tankumo (Humair, Gern, 2000).

Iškelta hipotezė, jog tokia skirtingų *B. burgdorferi* s.l. genotipų asociacija su skirtingais rezervuariniais šeimininkais Europoje susijusi su pastarųjų kraujo serumo komplementu. Tam tikro šeimininko komplementas gali lizuoti skirtingas borelijų rūšis, priklausomai nuo to, ar jos jam jautrios, ar atsparios. (Piesman, Gern, 2004, Derdakova, Lenčakova, 2005, Humair, Gern, 2000) Pagal šią teoriją, *B. afzelii*, *B. bavariensis* sp. nov., *B. japonica* ir *B. bisettii* yra atsparios graužikų komplementui, ir dėl šios priežasties graužikai yra šių rūšių rezervuariniai šeimininkai. *B. garinii* ir *B. valaisiana* atsparios paukščių komplementui. *B. burgdorferi* s.s. atsparus tiek paukščių, tiek graužikų komplementui, todėl gali užkrėsti abi grupes. Šeimininko komplementas taip pat gali lizuoti borelijas, kurios jau yra erkės vidurinėje žarnoje. Elnių serumas sunaikina visas *B. burgdorferi* s.l. rūšis, kas sutampa su jo kaip netinkamo rezervuarinio šeimininko statusu (Derdakova, Lenčakova, 2005).

1.3.1. Borelijų išsilaikymas rezervuariniuose šeimininkuose

Tai priklauso nuo rezervuarinių šeimininkų gimstamumo ir mirštamumo santykio populiacijoje. Taip pat Laimo ligos sukėlėjas patekęs į stuburinio gyvūno kūną turi jame išgyventi kol bus perduotas kitai erkei t.y. išvengti gyvūno imuninio atsako (Tsao, 2009).

Erkei maitinantis spirochetos lokalizuojasi prisisiurbimo vietoje (3 pav.). Vėliau patenka į kraujotakos sistemą, bei galiausiai išplinta įvairiuose organuose (sąnariuose, sausgyslėse, širdyje, šlapimo pūslėje). Manoma, jog borelijos išlieka šių organų tarpląstelinėje medžiagoje, taip išvengdamos šeimininko imuninio atsako kol ateina galimybė būti perduotoms erkei. Prisisiurbus kitai erkei, borelijos telkiasi jos maitinimosi vietoje. Didesnis bakterijų kiekis lemia efektyvesnę perdavimą. Manoma, jog link erkės prisisiurbimo vietos spirochetos juda chemotaksio dėka. *In vitro* parodyta, jog erkės seilės *B. burgdorferi* s.l. veikia kaip atraktantas (Tsao 2009).



3 pav. *B. burgdorferi* s.l. išplitimas stuburinio gyvūno audiniuose (Pagal Tsao, 2009).

1.3.2. Rezervuarinio šeimininko nustatymo būdai

Rezervuarinio šeimininko statusas gali būti patvirtinamas keliais būdais. Pats vertingiausias metodas yra gyvūno ksenodiagnostiniai tyrimai su neinfekuotomis erkėmis. Infekuotas gyvūnas apkrečiamas laboratorijoje išsiritusiomis lervinės stadijos erkėmis. Jeigu naujai išsinėrusiose nimfos stadijos erkėse randamas sukėlėjas, gyvūnas pripažįstamas kaip rezervuarinis. Tokiu būdu galima nustatyti, kokias *B. burgdorferi* s.l. rūšis gyvūnas perduoda. Tačiau šis metodas ne visada įvykdomas, kadangi ne visus gyvūnus įmanoma laikyti laboratorinėmis sąlygomis (Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005).

Kaip alternatyvus metodas gali būti erkių, kurios parazitavo laukinius gyvūnus natūralioje gamtoje ištyrimas. Tyrimo vietovėje palyginamas surinktų nuo gyvūno ir nuo augmenijos erkių užsikrėtimo lygis. Jei surinktų nuo šeimininko erkių užsikrėtimas didesnis nei nuo augmenijos, vadinasi gyvūnas dalyvauja sukėlėjo cikle. Tačiau tokiu metodu sunku atskirti, ar erkė užsikrėtė tiesiogiai nuo šeimininko, ar taip įvyko, kadangi kelios erkės maitinosi greta. Vis dėl to šis metodas plačiai naudojamas tiriant įvairias stuburinių rūšis (Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005).

Taip pat galima tirti iksodines erkes surinktas nuo augmenijos, ir molekuliniais metodais nustatyti, kokį stuburinį šeimininką užsikrėtusi erkė parazitavo prieš tai buvusioje vystymosi stadijoje (Derdakova, Lenčakova, 2005).

1.3.3. Rezervuariniai šeimininkai Europoje

Europoje gerais *B. burgdorferi* s.l. rezervuariniais šeimininkais laikomos 9 smulkiųjų žinduolių, 7 vidutinio dydžio žinduolių ir 16 paukščių rūšių (Derdakova, Lenčakova 2005).

Enzootiniame cikle dalyvaujančios *I. ricinus* lervos ir nimfos dažniausiai parazituoja smulkiuosius žinduolius, todėl iki šiol tai yra labiausiai tyrinėjama gyvūnų grupė. Ypatingai *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Myodes glareolus*. Mažiau tyrinėtas kitų graužikų grupių - *Microtus agrestis*, *Glis glis*, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* - vaidmuo *B. burgdorferi* s.l. cikle. Iš vabzdžiaėdžių *Neromys fodiens*, *Sorex minutus*, *Sorex araneus* *B. burgdorferi* s.l. buvo rasta pačiuose gyvūnuose arba nuo jų nurinktose erkėse. Aptiktas didelis erkių, nurinktų nuo *Sciurus vulgaris*, *Sciurus carolinensis* užsikrėtimas spirochetomis. *Erinaceus europaeus* taip pat perduoda sukėlėją *I. hexagonus* erkėms. *Lepus europaeus*, *Lepus timidus* ypatingai didelį vaidmenį atlieka salose, kur yra vieninteliai sausumos žinduolių atstovai (Piesman, Gern, 2004).

Vulpes vulpes nėra geras rezervuarinis šeimininkas, kadangi nepaisant to, jog spirochetos aptinkamos pačiame gyvūne, jos sunkiai perduodamos besimaitinančiai erkei (Piesman, Gern, 2004).

Ne visi erkių šeimininkai yra rezervuariniai *B. burgdorferi* s.l. šeimininkai (Ostfeld, Keesing, 2000). Stambieji žinduoliai, tokie kaip *Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus*, *Cervus nipon yesoensis*, *Alces alces*, *Dama dama*, *Bos taurus*, *Ovis ovis*, laikomi netinkamais rezervuariniais šeimininkais. Šie šeimininkai gali sumažinti borelijomis užsikrėtusių erkių kiekį (dilution effect). Kita vertus netinkami rezervuariniai šeimininkai didina pačių erkių populiaciją. Taip pat net netinkami šeimininkai gali dalyvauti *B. burgdorferi* s.l. cirkuliavime jeigu erkės maitinasi greta (co-feeding) (Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005, Piesman, Gern, 2004, Tsao, 2009). Tokiu būdu Didžiojoje Britanijoje prie enzootinio ciklo prisideda avys (Piesman, Gern, 2004).

Paukščiai ne tik gerai perduoda borelijas besimaitinančioms erkėms, bet ir prisideda prie *B. burgdorferi* s.l. plitimo jų migracijos keliuose (Derdakova, Lenčakova, 2005, Humair, Gern, 2000).

1.3.4. Bioįvairovės svarba Laimo ligos ekologijai

Esant dideliai šeimininkų įvairovei, erkės savo gyvenamojoje vietoje gali būti kelių sukėlėjų pernešėjais. Infekcijos paplitimas priklauso ne tik nuo erkių gausos, bet ir nuo šeimininkų bendrijos sudėties (Schauber, Ostfeld, 2002).

Naujausi ekologiniai tyrimai teigia, kad bioįvairovė gali būti ypač svarbi didinant ir mažinant zoonotinių ligų plitimą (Giardina ir kt., 2000). Šeimininkų bendrijose, kurios rūšių prasme skurdžios, gali būti didelis procentas tinkamų rezervuarinių šeimininkų, sąlygojančių didelį užsikrėtimą sukėlėjais (Ostfeld, Keesing, 2000), tuo tarpu bendrijose, kurios yra turtingos netinkamais sukėlėjo perdavimui šeimininkais, būdingas infekcijos silpninimo efektas (Giardina ir kt., 2000). Todėl didinant šeimininkų įvairovę atitinkamai turėtų mažėti infekcijos paplitimas erkių populiacijose (Sinski ir kt., 2006).

Kadangi *I. ricinus* erkės nėra išrankios šeimininkams, tikimybė, kad ji parazituos tam tikros rūšies individą priklauso nuo tos rūšies proporcijos visoje šeimininkų bendrijoje. Didesnis nedalyvaujančių *B. burgdorferi* s.l. cikle šeimininkų procentas mažina *I. ricinus* nimfų galimybę kontaktuoti su rezervuariniais šeimininkais. Taip sumažinamas rezervuarinių šeimininkų galimybę užsikrėsti sukėlėju. (Ostfeld, Keesing, 2000).

Europos šalyse egzistuoja gyvūnų bendrijos su keliais tinkamais rezervuariniais šeimininkais. Tokiu atveju ligos pasireiškimas išlieka stabilus, net jeigu rezervuarinių šeimininkų populiacijos svyruoja. Pvz., pelėnai (*Myodes sp.*), pelės (*Apodemus sp.*) ir voverės (*Sciurus sp.*) yra tinkami rezervuariniai šeimininkai ir vieno iš jų populiacijos sumažėjimas turės mažai arba visai neturės įtakos, nes enzootinis ciklas bus palaikomas kitų šeimininkų (Ostfeld, Keesing, 2000). Grauzikų populiacijoms būdingi dideli svyravimai (Giardina ir kt., 2000) skirtingose vietovėse ir skirtingais metais (Schauber, Ostfeld, 2002) susiję su maisto ištekliais (pvz., gilių kiekio) ir plėšrūnų gausa (Giardina ir kt., 2000). Konkuruojančių ar grauzikus medžiojančių rūšių papildymas sumažintų grauzikų kiekį ir tuo pačiu padidintų ligos sukėlėjo plitimui netinkamų rūšių kiekį. Šiuo metu yra per mažai informacijos, kad būtų galima prognozuoti kaip alternatyvių šeimininkų gausa galėtų sumažinti riziką rezervuariniams šeimininkams užsikrėsti Laimo ligos spirocheta. (Schmidt, Ostfeld, 2001).

1.3.5. Graužikai – pagrindiniai *B. burgdorferi* s.l. rezervuariniai šeimininkai

Graužikai tikriausiai yra didesnės dalies erkių šeimininkai nei bet kurie kiti gyvūnai. Daugiau nei 50% iksodinių nesubrendusios vystymosi stadijos erkių bei kelios *Ixodes* genties rūšys suaugusios erkės stadijoje maitinasi būtent ant graužikų (Hillyard, 1996).

Graužikai yra pagrindiniai rezervuariniai šeimininkai, palaikantys ir didinantys Laimo ligos sukėlėjo populiacijas (Schmidt, Ostfeld, 2001) Graužikai gali perduoti *B. burgdorferi* s.l. nuo 7 iki 40 mėnesių (Štefančikova ir kt., 2004), taigi gali išlaikyti borelijas ir žiemos metu (Pawelczyk, Sinski, 2000). Atskiros graužikų rūšys gali skirtis sugebėjimu įgyti, išlaukyti ir perduoti Laimo ligos spirochetą (Sinski ir kt., 2006).

Erkių lervos ir nimfos į enzootinį ciklą įtraukiamos joms užsikrečiant *B. burgdorferi* s.l. maitinimosi ant savo šeimininko metu. Smulkieji žinduoliai yra dažni šių vystymosi stadijų šeimininkai ir yra iki šiol neabejotinai plačiausiai Europoje ir Šiaurės Amerikoje tyrinėjama erkių šeimininkų grupė (Piesman, Gern, 2004).

Ankstesni tyrimai parodė, jog Centrinėje Europoje *B. burgdorferi* s.l. palaikomas smulkiųjų žinduolių, ypač *A. flavicollis* ir *M. glareolus* populiacijų. Šie graužikai tarnauja kaip Laimo ligos rezervuaras, ir kadangi jų santykinis populiacijos tankumas kinta, tai turi įtakos jų užsikrėtimui erkėmis ir erkių perduodamų ligų dinamikoms. Net šeimininkų rūšys, kurios gyvena tame pačiame areale, tokios kaip *A. flavicollis* ir *M. glareolus*, gali gana skirtis užsikrėtimu erkėmis. Kiti faktoriai, tokie kaip graužikų amžinė struktūra ir lytis taip pat įtakoja užsikrėtimą erkėmis skirtingu metų laiku (Sinski ir kt., 2006).

Lietuvoje paplitusi geltonkaklė pelė priklauso nominaliniam porūšiui *Apodemus f. flavicollis*. Aptinkama visoje teritorijoje. Pagal gausumą tarp miškuose gyvenančių graužikų užima antrą vietą, o kai kuriuose biotopuose yra dominuojanti. Veikli ištisus metus, bet aktyvumas sezoniškai kinta: pavasarį pamažu didėja, vasarą būna didžiausias, rudenį mažėja. Žiemą mažiausiai aktyvi. Bėgioja paprastai naktį, kartais – ir dieną. Geltonkakles peles parazituoja 14 rūšių erkių. Lietuvoje ant *Muridae* šeimos atstovų dažniausiai aptinkamos erkės – *Ixodes ricinus*, *I. laguri*, *I. trianguliceps*, *Laelaps agilis*, *Eulaelaps stabularis*, *Haemogamasus nidi*, *Haemolaelaps glasgowi*, *Histionyssus isabelinus* ir kt. (Lietuvos fauna, 1998).

Lietuvoje gyvenantis rudasis pelėnas priklauso *Myodes glareolus suecicus* porūšiui. Lietuvoje aptinkamas beveik visuose miškuose, dominuojanti pelinių graužikų rūšis. Gana sėslus. Veiklūs ištisus metus. Aktyvesnis naktį ir rytą, bet bėgioja ir dieną (Lietuvos fauna, 1998). *M. glareolus* būdingi tiek metiniai populiacijos svyravimai, tiek svyravimai tarp metų

(kas 3-5 metai jų gerokai pagausėja). Metiniai svyravimai pasireiškia populiacijos sumažėjimu žiemos pabaigoje ir pavasario pradžioje, kadangi žiemos laikotarpiu *M. glareolus* individai paprastai yra reprodukciškai neaktyvūs (Gipps 1985m). Ruduosius pelėnus parazituoja 17 rūšių erkės. Lietuvoje *Cricetidae* šeimą parazituojančios erkės – *Laelaps agilis*, *L. pawlowskyi*, *Eulaelaps stabularis*, *Hyperlaelaps arvalis*, *Haemogamasus nidi*, *Hirstionyssus isabelinus*, *Poecilochirus necrophori*, *I. ricinus* ir kt. (Lietuvos fauna, 1998)

1.4. *B. burgdorferi* s.l. tyrimo metodai

Laboratorinėje diagnostikoje Laimo ligos nustatymui naudojami keturi analizės būdai: kultivavimas, mikroskopinė analizė, *B. burgdorferi* s.l. DNR ar baltymų nustatymas (Aguero-Rosenfeld ir kt. 2005).

Borrelia kultivuojamos Barbous-Stonner-Kely (BSK) terpėje su keliomis modifikacijomis (Krupka ir kt., 2007, Wilske ir kt., 2007). BSK kultivavimo privalumas yra tas, kad gaunamos aktyvios spirochetos, o tai rodo, jog infekcija vyksta esamu laiku (Humair, Gern, 2000). Kultivavimo metodas naudojamas kai tyrinėjama sukėlėjo struktūra, molekulinės, antigenetinės, patogeninės savybės (Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005). Tačiau *Borrelia burgdorferi* s.l. bakterijos yra sunkiai ir ilgai auginamos. (Humair, Gern, 2000, Wilske ir kt., 2007).

B. burgdorferi s.l. tyrimai mikroskopijos metodais: gyvi mikroorganizmai matomi tamsaus lauko (dark-field) ar fazių kontrasto (phase-contrast) mikroskopijos pagalba. Taip pat šviesos mikroskopu, jei dažomi sidabro dažais, arba fluorescentiniais mikroskopiniais metodais (Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005).

PGR metodas yra labai jautrus. Galima aptikti nuo 1-10 spirochetų (Humair, Gern, 2000). Didžiausi užsikrėtimo *B.burgdorferi* s.l. lygiai Europoje buvo užfiksuoti naudojant PGR metodą (Rauter, Hartung, 2005). PGR rezultatai gali būti kokybiniai (naudojamos standartinė ar lizdinė PGR) arba kiekybinė (naudojamos konkurencinė (competitive) ar tikro-laiko PGR). Kiekvienas iš šių metodų turi privalumų ir trūkumų. Laboratorinėje *B. burgdorferi* s.l. diagnostikoje dažniausiai pakanka kokybinės PGR. PGR efektyvumas priklauso nuo kelių faktorių. Svarbiausi yra tinkamos DNR sekos-taikinio ir pradmenų pasirinkimas. Dažniausiai naudojami chromosomoje esantys 16S rRNR, 23S rRNR genai, 5S-23S rRNR tarpentinis tarpiklis, *flaB*, *recA*, *p66*, bei plazmidėje esantys *ospA* (Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005) ir *ospB* (Wilske ir kt. 2007). Realus laiko ir dauginė PGR naudojamos patogeninių *B. burgdorferi* s.l. rūšių nustatymui. PGR yra labai jautrus metodas, tačiau tyrimo rezultatai priklauso ir nuo

pasirinkto analizei audinio/organo (Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005, Wilske ir kt., 2007). Trūkumas, kad aptinkama tiek gyvybingų, tiek neaktyvių bakterijų DNR. Todėl medicininėje diagnostikoje nerodo tikrosios ligos stadijos (Humair, Gern, 2000).

Medicininėje diagnostikoje Laimo ligos nustatymui pacientuose naudojami imunologiniai metodai: IFA, FIAX, ELISA, ELFA. Analizei pasirenkami OspC, FlaA, FlaB, BmpA antigenai (Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005). Kultivavimas ir PGR analizė atliekama tik jei imunologiniai tyrimai ir klinikiniai tyrimai pateikia dviprasmiškus rezultatus (Wilske ir kt., 2007).

1.5. PGR reakcijos aprašymas

Polimerazinė grandininė reakcija pirmą kartą aprašyta 1985 metais R. K. Saiki ir kolegų vadovaujant K. Mullisui. Tai yra greitas, jautrus, specifiškas ir lankstus fermentinis *in vitro* metodas naudojamas genomines DNR ar kDNR fragmento pagausinimui (Jurgelevičius, 1999).

Pirma PGR analizė, kur *B. burgdorferi* s.l. nustatymui buvo naudotas chromosomoje koduojamas genas, paskelbta 1989 metais. Dabar sukurta ypatingai daug šio sukėlėjo analizės PGR metodu variantų. PGR analizė naudojama 1) ligos diagnostikoje, 2) molekuliniam rūšių išskyrimui (identifikacijoje), 3) mišrios *B. burgdorferi* s.l. bei kitų erkių platinamų sukėlėjų infekcijos nustatymui (Aguero-Rosenfeld ir kt., 2005).

Standartinės PGR reakcijos ciklą sudaro trys etapai:

1. DNR denatūravimas. Dvigrandė DNR atskiriama, kad galėtų tapti PGR matrica. Pradinis denatūravimas trunka 3-5 min. inkubuojant 92-96°C temperatūroje kadangi tenka denatūruoti didelius dvigrandės DNR fragmentus. Vėlesniuose cikluose dvigrandė DNR denatūruodama inkubuojant 0,5-2 min.

2. Pradmenų prijungimas. Specifinė oligonukleotidinių pradmenų pora, kuri yra komplementari įreminančioms norimą amplifikuoti DNR fragmentą nukleotidų sekoms, sumažinus temperatūrą prisijungia prie matricinės DNR grandinių. Reakcija vyksta 37-68°C intervale priklausomai nuo pradmens nukleotidų sekos. Optimali pradmens prisijungimo temperatūra priklauso nuo duplekso lydimosi temperatūros, reakcijos mišinio sudėties, etapo trukmės.

3. Komplementarios DNR grandinės sintezė (pradmens pratęsimas). Komplementarios amplifikuojamo DNR fragmento grandinės sintezė vyksta 5' → 3' kryptimi. Terpės temperatūra parenkama optimali naudojamai DNR polimerazei. *Tag* polimerazės atveju komplementarios DNR grandinės sintezė vyksta 70-75°C (dažniausiai 72°C) temperatūroje. Vidutiniškai šis etapas trunka 0,5-2 min.

Pasibaigus paskutiniam DNR sintezės ciklui, mėginiai papildomai inkubuojami 5-15 min., kad *Tag* polimerazė užpildytų likusius viengrandžius amplifikuoto produkto galus (Jurgelevičius, 1999).

1.6. *B. burgdorferi* s.l. prevencija

Paprastai Laimo liga lengvai pasiduoda gydymui, tačiau gydymas brangus. Taip pat liga gali išsivystyti į lėtinę formą. Todėl ieškomos prevencijos priemonės (Tsao, 2009).

Sukurti efektyvūs akaricidai, tačiau jie brangūs bei ne visada pasiteisina natūraliomis gamtos sąlygomis todėl nėra plačiai taikomi praktikoje. Taip pat sukurti repelentai nuo erkių briedžiams ir graužikams, tačiau ir jie kol kas nėra plačiai taikomi (Tsao, 2009). Nespecifinių pesticidų naudojimas ar erkėms bei šeiminingams tinkamų biotopų naikinimas sukelia neprognozuojamas ekologines pasekmes. Be to, erkių ir šeiminingų naikinimo programomis retai pasisekdavo likviduoti ligą (Schmidt, Ostfeld, 2001).

JAV vakcina žmonėms sukurta 1998 metais, OspA rekombinantinio baltymo pagrindu. Tačiau po keturių metų, esant mažai paklausai, ji buvo išimta iš rinkos. Europoje pagrindinė kliūtis efektyvios vakcinės kūrimui yra didelis *B. burgdorferi* s.l. komplekso vidinis heterogeniškumas (Derdakova, Lenčakova, 2005), lemiantis skirtingą OspA ekspresiją. Nors Europoje buvo sukurta žmogui tinkama vakcina prieš *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. ir *B. garinii* turinti kelis OspA antigenus, kuri laboratorinėmis sąlygomis efektyviai veikė pelėse, po JAV vakcinės išėmimo tolesni darbai buvo nutraukti (Piesman, Gern, 2004).

Pastaraisiais metais sparčiai daugėjant Laimo ligos susirgimų, tikėtina, jog žmogui tinkamos vakcinės paklausa galiausiai išaugs. Taip pat bandoma sukurti efektyvią vakciną laukiniams gyvūnams, kuri padėtų valdyti ligos protrūkius endeminėse vietovėse (Tsao, 2009).

B. burgdorferi s.l. tyrimai sukėlėją platinančiose erkėse ir rezervuariniuose šeimininguose, kaip ir tikslus *B. burgdorferi* s.l. genotipų nustatymas padėtų suprasti šios ligos ekologiją, epidemiologiją ir nustatyti efektyvias prevencijos priemones (Derdakova, Lenčakova, 2005).

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Tyrimams pasirinktas fragmentuoto mišraus lapuočių – spygliuočių miško su tankiu pomiškiu biotopas. Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, jog tokiam biotope yra didelis erkių gausumas (Ambrasienė 2007). Tanki lapų laja apsaugo erkes nuo saulės spindulių, o lapų nuokritos paklotėje sukuria drėgną mikroaplinką, kuri yra ypatingai svarbi erkių išgyvenimui. Tokiam biotope gausiai gyvena ir dvi dažniausios Lietuvos graužikų rūšys geltonkaklė pelė (*Apodemus flavicollis*) ir rudasis pelėnas (*Myodes glareolus*) (Lietuvos fauna, 1998). Žinoma, jog enzootinis *B. burgdorferi* s.l. ciklas vyksta esant tarpiniam kontaktui tarp vektoriaus ir stuburinio gyvūno. Kadangi fragmentuotame mišraus miško kraštovaizdyje yra didelis erkių bei erkių šeimininkų gausumas, jie tampa Laimo ligos sukėlėjo dauginimosi ir plitimo židiniai.

Graužikai gaudyti 33 naktis penkiose vietaose nuo kitos nutolusiose vietovėse (2.1 lentelė). Tose pačiose vietose nuo augmenijos rinktos *I. ricinus* lervinės ir nimfos vystymosi stadijos erkės.

2.1 lentelė. Tyrimo medžiagos rinkimo vietos ir laikas.

Rajonas	koordinatės	gaudymo periodas	naktų sk.
Utena	55°29' N 25°39' E	2009 05 26 - 07 02	13
Joniškis	56°14' N 23°40' E	2009 06 20 - 06 26	7
Lazdijai	54°14' N 23°33' E	2009 07 07 - 07 11	5
Kėdainiai	55°19' N 23°59' E	2009 07 20 - 07 23	4
Jurbarkas	55°04' N 22°30' E	2009 08 11 - 08 14	4

2.1. Graužikų gaudymas, juos parazitavusių erkių nurinkimas bei fiksavimas

Graužikai gaudomi naktimis, kadangi tuo metu jie yra labiausiai aktyvūs. Tyrime naudota 80 gyvagaudžių spąstų. Spąstai sudedami 4 eilėmis po 20 išlaikant 5 metrų atstumą tarp jų (Hanincova, 2003). Spąstai užtaisomi vakare 19 – 21 val., jaukui naudojant aliejuje mirkytą duonos gabaliuką, surenkami ryte (kuo anksčiau), paprastai 8 – 10 val. Sugautas graužikas pasveriamas, pagal išorinius morfologinius požymius nustatoma rūšis (Lietuvos fauna, 1998) ir lytis. Graužiko kailiukas detaliam apžiūrinimui, ypač apie ausis, snukutį, priekines letenėles. Su pincetu ištrauktos gyvūną parazitavusios erkės įdedamos į 1,5 ml mėgintuvėlį su 70% etanolio tirpalu. Nukerpama graužiko ausis taip pat patalpinama į 1,5 ml mėgintuvėlį su 70% etanolio tirpalu. Surinkti pavyzdžiai koduojami nurodant rajoną, kuriame sugautas graužikas, graužiko

eilinį numerį, ir graužiko sugavimo datą. Surinkta medžiaga iki tyrimų saugoma +4°C temperatūroje.

2.2. Graužiko amžiaus nustatymas

Pagal svorį graužikai suskirstyti į amžiaus grupes – juvenile (jaunikliai), subadult (subrendę, bet dar nesiveisiantys) ir adult (suaugę ir besiveisiantys). *M. glareolus* jauniklių grupei priskiriami individai sveriantys < 15 g (iki 1,5 mėn.), subrendusių grupei 15-19,5 g (1,5-2,5 mėn.), suaugusių grupei > 19,5 g (2,5 mėn. ir daugiau). *A. flavicollis* jauniklių grupei priskiriami individai sveriantys < 20 g (iki 3,5 mėn.), subrendusių 20-30 g (3,5-7 mėn.), sveriantys > 30 g (7 mėn. ir daugiau) priskirti suaugusių grupei (Sinski ir kt., 2006).

2.2 lentelė. Tyrimo vietovėse sugauti graužikai ir juos parazitavusios *Ixodes* genties erkės.

Rajonas	sugauti graužikai	sugautų individų sk.	<i>Ixodes ricinus</i>		<i>Ixodes trianguliceps</i>	
			lervų sk.	nimfų sk.	lervų sk.	nimfų sk.
Utena	<i>Myodes glareolus</i>	42	1209	54		
	<i>Apodemus flavicollis</i>	16	813	50		
	viso	58	2022	104		
Joniškis	<i>Myodes glareolus</i>	42	1868	35		
	<i>Apodemus flavicollis</i>	14	1783	52		
	<i>Apodemus agrarius</i>	1				
	viso	57	3651	87		
Lazdijai	<i>Myodes glareolus</i>	47	408	28	1	
	<i>Apodemus flavicollis</i>	19	125	13	11	1
	viso	66	533	41	12	1
Kėdainiai	<i>Myodes glareolus</i>	20	430	38		
	<i>Apodemus flavicollis</i>	30	1234	196		
	viso	50	1664	234		
Jurbarkas	<i>Myodes glareolus</i>	44	222	2	243	83
	<i>Apodemus flavicollis</i>	23	267	8	7	4
	<i>Apodemus agrarius</i>	4				
	viso	71	489	10	250	87
	VISO	302	8359	476	262	88

2.3. Aktyvių erkių surinkimas ir fiksavimas

Ixodes ricinus lervinės ir nimfos vystymosi stadijos erkės nuo augmenijos renkamos paskutinę graužikų gaudymo dieną spąstų sudėjimo vietose. Erkės renkamos naudojant „vėliavėlės“ metodą. Prie medinio strypo pritvirtinamas 1 x 0,5 metro grublėtas baltos spalvos audinys. Vėliavėlė lėtai braukiama žemės paviršiumi. Kas du metrus patikrinama, ar nėra prie

audinio prikibusių erkių. Prisikabinusios erkės įdedamos į 1,5 ml mėgintuvėlį su 70% etanolio tirpalu. Saugomos +4°C temperatūroje.

2.4. Erkių rūšių identifikavimas

Nimfos vystymosi stadijoje esančios erkių rūšys nustatytos remiantis raktu (Hillyard 1996 m.). Lervinėje stadijoje erkių rūšis apibudinti sunku, todėl iš dviejų morfologiškai besiskiriančių grupių buvo paimta po 6 *Ixodes* genties lervas, ir rezultatai patvirtinti PGR metodu naudojant *I. ricinus* rūšiai specifinius IxriF/IxriR pradmenis (Radzijeuskaja ir kt., 2005).

2.5. Molekuliniai tyrimai

2.5.1. DNR iš graužiko audinių skyrimas

Graužiko DNR skiriama iš jo vienos ausies audinio. Skyrimas atliekamas su 'Genomic DNA Purification Kit rinkiniu (Fermentas, Lietuva) vadovaujantis gamintojo instrukcijomis su keliomis modifikacijomis.

Darbo eiga:

1. Iš mėgintuvėlio su 70% etanolio tirpalu ištrauktos graužiko ausys nusauginamos ant popierinio rankšluosčio. Audinys susmulkinamas steriliomis žirkutėmis į 1,5 ml mėgintuvėlį ir užpilamas 200µl TE buferio. Kiekvienam mėginiui instrumentai sterilinami liepsnoje ir atšaldomi 70% etanolyje.
2. Į tą patį mėgintuvėlį įpilama 400 µl lizavimo tirpalo (*lysis solution*) ir valandą kaitinama 65°C temperatūroje kas 5 min. švelniai pavartant.
3. Paruošiamas 800 µl nusodinimo tirpalas (*precipitation solution*) sumaišant 80 µl 10x koncentratą su 720 µl bidistiliuoto vandens. Nusodinimo tirpalo koncentratas, jeigu yra susidariusių kristalinių struktūrų, palaikomas 37°C temperatūroje.
4. Iš termostato ištraukti mėgintuvėliai centrifuguojami 3 sekundes ir traukos spintoje užpilami 600 µl chloroformo.
5. Mėginiai kelis kartus pavartomi ir centrifuguojami 2 min. 10.000 aps./min. greičiu.
6. Viršutinė frakcija perkeliama į paruoštą nusodinimo tirpalą, pavartoma 2 min., ir 2 min. centrifuguojama 10.000 aps./min. greičiu. Išskirta DNR nusėda ant mėgintuvėlio sienelės.

7. Nusiurbiamas supernatantas, o išsiskyrusi DNR užpilama 100 µl 1.2M NaCl ir švelniai tirpinama.
8. Pilnai ištirpus DNR, į mėgintuvėlį įpilama 300 µl 96% šalto etanolio ir paliekama bent 10 min. -20°C temperatūroje.
9. DNR nusodinama 6 – 7 min. centrifuguojant 10.000 aps./min. greičiu. Etanolis iš mėgintuvėlių išpilamas.
10. Mėgintuvėliai kaitinami 37°C temperatūroje, kol nuo sienelių nugaruoja visas etanolis.
11. Įpilama 100 µl bidistiliuoto vandens ir švelniai tirpinama. DNR laikoma +4°C temperatūroje, saugoma -20°C temperatūroje.

2.5.2. DNR iš erkių audinių skyrimas

DNR skiriama naudojant 2,5% amonjako tirpalą (Stanczak ir kt., 1999).

Darbo eiga:

1. Paruošiamas 2,5% amonjako tirpalas (10 ml 25% NH₄OH x 90 ml dH₂O).
2. Steriliu pincetu erkės išimamos iš mėgintuvėlio su 70% etanoliumi ir džiovinamos 5 min. kambario temperatūroje.
3. Erkės įdedamos į 0,5 ml mėgintuvėlius ir užpilamos 2,5% amonjako tirpalu. Neprisisiurbusioms lervinės stadijos erkėms pilama 40 µl, prisisiurbusioms lervoms 50 µl, nimfoms 80 µl amoniako.
4. Mėgintuvėliai sandariai uždaromi ir inkubuojami termostate 25 min. 99°C temperatūroje ir centrifuguojami 1 min. 13000aps./min. greičiu.
5. Mėgintuvėliai atkemšami ir inkubuojami termostate 15 min. 99°C temperatūroje kad išgaruotų visas amonjakas.
6. Mėgintuvėliai iš karto įdedami į ledo padėklą 2 – 3 minutėms. Centrifuguojama 1 min. 13000aps./min. greičiu. DNR laikoma +4°C temperatūroje, saugoma -20°C temperatūroje.

2.5.3. PGR metodas *I. ricinus* identifikavimui.

Ixodes ricinus rūšies identifikavimui gausinamas 150 bp 5.8S RNR geno fragmentas. Naudojami specifiniai IxriR/IxriF pradmenys (Radzijeckaja ir kt., 2005) (2.5 lentelė) ir 2x PGR Mix (Fermentas, Lietuva). Reakcija vyksta 12,5 µl tūryje su 1,5 µl erkės DNR tirpalu (2.2 lentelė).

2.2 lentelė. Reakcijos mišinio reagentų kiekiai.

Reagentai	kiekis (µl) vienam pavyzdžiui
2x Mix	6,3
IxriF (10 pM/µl)	0,5
IxriR (10 pM/µl)	0,5
ddH ₂ O	3,7

PGR reakcija vyksta pagal 2.6 lentelėje nurodytas sąlygas. Pagausinti produktai frakcionuojami 1,5% agarozės gelyje, 0,5xTBE buferyje su etidžio bromido tirpalu. Elektroforezė vyksta esant 100V įtampai, 100 mA srovei. Rezultatai analizuojami UV šviesoje.

2.5.4. PGR metodas *B. burgdorferi* s.l. identifikavimui

Endoparazito *B. burgdorferi* s.l. nustatymui gausinamas flagelino geno (*fla*) 276 bp fragmentas (Picken, 1991 m.) naudojant specifinius FL6/FL7 (Stanczak ir kt., 1999) pradmenis (2.5 lentelė). Fragmentas amplifikuojamas 25 µl tūryje (2.3 lentelė). Jei *B. burgdorferi* s.l. nustatynėjama erkėse, reakcijoje naudojami 4 µl DNR tirpalo, jei graužike, reakcijoje naudojami 4 µl DNR kurios kiekis apie 500 µg.

2.3 lentelė. *B. burgdorferi* s.l. nustatymui naudojamų reagentų kiekiai.

Reagentai	kiekis (µl) vienam pavyzdžiui
10xPGR buferis	2,5
10 mM dNTP	0,625
FL6 (10 pM/µl)	1,5
FL7 (10 pM/µl)	1,5
Dream Taq polimerazė (5u/µl)	0,2
ddH ₂ O	14,675

PGR reakcija vyksta pagal 2.6 lentelėje nurodytas sąlygas. Pagausinti produktai frakcionuojami 2% agarozės gelyje, 0,5xTBE buferyje su etidžio bromido tirpalu. Elektroforezė vyksta esant 80V įtampai, 100 mA srovei. Rezultatai analizuojami UV šviesoje.

2.5.5. PGR metodas *B. burgdorferi* s.l. genotipų identifikavimui

Endoparazito *B. burgdorferi* s.l. genotipų *B. afzelii*, *B. garinii* ir *B. burgdorferi* s.s identifikavimui atliekama dauginė PGR (multiplex PGR) reakcija. Gausinami *ospA* geno fragmentai. Naudojamos specifinių pradmenų poros (2.5 lentelė), amplifikuojančios 189 bp (*B.*

afzelii), 345 bp (*B. garinii*) ir 544 bp (*B. burgdorferi* s.s.) fragmentus (Ambrasienė ir kt., 2004). Reakcija vyksta 50µl tūryje su 2.4 lentelėje nurodytais reagentais, naudojant 5µl DNR tirpalo.

2.4 lentelė. *B. burgdorferi* s.l. genotipų nustatymui naudojamų reagentų kiekiai.

Reagentai	kiekis (µl) vienam pavyzdžiui
10xPGR buferis	5
25mM MgCl ₂	5
10 mM dNTP	1
GI-L (10 pM/µl)	2,8
GI-R (10 pM/µl)	2,8
GII-L (10 pM/µl)	2,8
GII-R (10 pM/µl)	2,8
GIII-L (10 pM/µl)	2,8
GIII-R (10 pM/µl)	2,8
Hot start Taq polimerazė (5u/µl)	0,3
ddH ₂ O	16,9

PGR reakcija vyksta pagal 2.6 lentelėje nurodytas sąlygas. Pagausinti produktai frakcionuojami 2% agarozės gelyje, 0,5xTBE buferyje su etidžio bromido tirpalu. Elektroforezė vyksta esant 80V įtampai, 100 mA srovei. Fragmentų ilgiai analizuojami UV šviesoje.

2.6. Statistinė analizė

Graužikų užsikrėtimas erkėmis buvo įvertintas panaudojant parazitologinius indeksus.

Užsikrėtimo erkėmis ekstensyvumas (prevalence of infestation) – graužikų, užsikrėtusių erkėmis procentas imtyje. **Užsikrėtimo erkėmis gausumas** (abundance of infestation) – vidutinis graužikų užsikrėtimas erkėmis visoje graužikų imtyje (Sinski ir kt., 2006, Hanincova ir kt., 2003).

Užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. įvertinamas kaip procentinis infekcijos paplitimas tarp erkių ar graužikų.

Skaičiavimai atlikti su STATISTIKA 8 ir Microsoft Excel. Rezultatų patikimumas tikrinamas Pirsono χ^2 kriterijumi ir Mano-Vitnio-Vilkoksono (Mann-Withney U-Test) rangų sumų kriterijumi nepriklausomoms imtims.

2.5 lentelė. Molekuliniuose tyrimuose naudojami oligonukleotidiniai pradmenys.

Tiriamas objektas	Pradmenų sekos	PGR produkto ilgis (bp)	Šaltinis
<i>Ixodes ricinus</i>	Ixri F: 5' GGA AAT CCC GTC GAC G 3' Ixri R: 5' CAA ACG CGC CAA CGA AC 3'	150	Radzijeuskaja ir kt., 2005
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	FL6: 5' TTC AGG GTC TCA AGC GTC TTG GAC T 3' FL7: 5' GCA TTT TCA ATT TTA GCA AGT GAT G 3'	276	Stanczak ir kt., 1999
<i>Borrelia afzelii</i>	GIII-L: 5' TAA AGA CAA AAC ATC AAC AGA TGA AAT G 3' GIII-R: 5' TTC CAA TGT TAC TTT ATC ATT AGC TAC TT 3'	189	Demaerschaleck ir kt., 1995; Ambrasienė ir kt., 2004
<i>Borrelia garinii</i>	GII-L: 5' TGA TAA AAA CAA CGG TTC TGG AAC 3' GII-R: 5' GTA ACT TTC AAT GTT GTT TTG CCG 3'	345	Demaerschaleck ir kt., 1995; Ambrasienė ir kt., 2004
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	GI-F: 5' AAC AAA GAC GGC AAG TAC GAT CTA ATT 3' GI-R: 5' TTA CAG TAA TTG TTA AAG TTG AAG TGC C 3'	544	Demaerschaleck ir kt., 1995; Ambrasienė ir kt., 2004

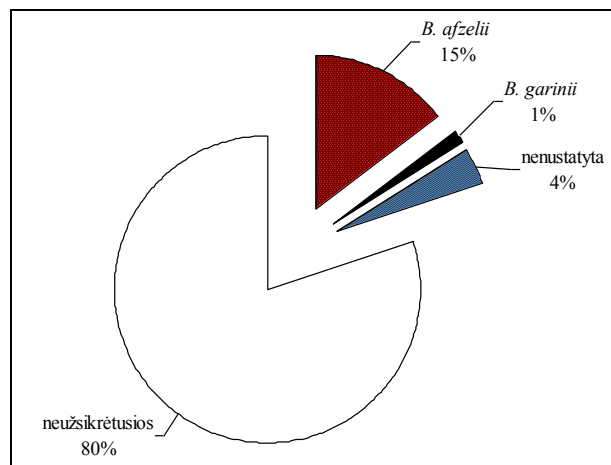
2.6 lentelė. Tiriamo objekto DNR gausinimui naudotos PGR programos.

PGR programa	Pradinis denatūravimas t°C, trukmė	Denatūravimas t°C, trukmė	Pradmenų prijungimas t°C, trukmė	Amplifikacija t°C, trukmė	Ciklų sk.	Papildoma inkubacija t°C, trukmė
<i>I. ricinus</i>	94°C, 3min	94°C, 30s	51°C, 30s	72°C, 30s	26	72°C, 3min
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	94°C, 1min	94°C, 30s	56°C, 30s	72°C, 1min	40	72°C, 3min
<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi</i> s.s.	95°C, 4min	94°C, 1min	65°C, 1min	72°C, 1min	40	72°C, 7min

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. *I. ricinus* erkių nuo augmenijos užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. tyrimai

Siekiant nustatyti kiekvienos vietovės užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. lygį, visuose tiriamuose rajonuose PGR metodu buvo ištirta po 50 nuo augmenijos nurinktų *I. ricinus* nimfų (3.1 lentelė). Kiekviena erkė buvo analizuojama atskirai. Tirtuose rajonuose *I. ricinus* nimfų užsikrėtimas Laimo ligos spirocheta siekia 20% (50/250). (3.1 pav.). Užsikrėtimo lygis *B. burgdorferi* s.l. skirtinguose rajonuose variavo nuo 14% Lazdijų rajone iki 24% Jurbarko. Europoje nuo augmenijos nurinktų *I. ricinus* nimfų užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. vidurkis 10,8% (nuo 2% iki 43%) (Piesman, Gern, 2004), todėl galima teigti, jog Lietuvoje yra gana aukštas erkių užsikrėtimo Laimo ligos sukėlėju lygis.



3.1 pav. *I. ricinus* nimfų užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. bei jos genotipais fragmentuoto mišraus miško biotope.

Nustatyta, jog fragmentuotame mišraus miško biotope enzootiniame cikle cirkuliuoja *B. afzelii* genotipo bakterijos: *I. ricinus* nimfų užsikrėtimas šiuo genotipu sudarė 15%. *I. ricinus* nimfų užsikrėtimas *B. afzelii* genotipu atskiruose rajonuose pasiskirstė nevienodai. Mažiausias *I. ricinus* nimfų užsikrėtimas *B. afzelii* aptiktas Lazdijų rajone (8%), didžiausias Joniškio ir Kėdainių rajonuose (20% ir 18% atitinkamai). *B. garinii* genotipas *I. ricinus* nimfose nuo augmenijos rastas tik Jurbarko rajone ir sudarė 6% nuo visų toje vietovėje tirtų erkių. *B. burgdorferi* s.s. genotipas tirtose erkėse nebuvo nustatytas. Ankstesniuose tyrimuose Lietuvos teritorijoje lapuočių ir mišrių miškų biotope *I. ricinus* erkėse taip pat dominavo *B. afzelii* (Ambrasienė 2007). Nors ankstesniuose darbuose mišraus miško biotope buvo aptikta mišri

kelių *B. burgdorferi* s.l. genotipų infekcija (Ambrasienė 2007), šio tyrimo metu nei viena *B. afzelii*, *B. garinii* ir *B. burgdorferi* s.s. genotipų kombinacija *I. ricinus* nimfose nebuvo rasta. Taip pat 10 *B. burgdorferi* s.l. teigiamų mėginių nebuvo priskirti nei vienam iš trijų tirtų genotipų. Europoje aptiktos septynios *B. burgdorferi* s.l. kompleksui priklausančios rūšys (Žakovska ir kt., 2008), todėl greičiausiai šie mėginiai priklauso kitam genotipui.

3.1 lentelė. *B. burgdorferi* s.l. bei jos genotipų paplitimas *I. ricinus* nimfose nuo augmenijos.

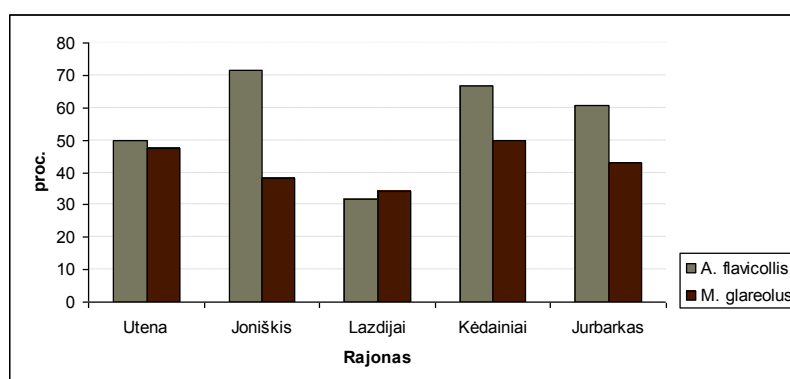
Rajonas	ištirtų <i>I. ricinus</i> nimfų sk.	<i>B. burgdorferi</i> s.l.		<i>B. garinii</i>		nenustatyta
		užsikrėtę	proc.	užsikrėtę	proc.	
Utena	50	9	18%	6	12%	3
Joniškis	50	11	22%	10	20%	1
Lazdijai	50	7	14%	4	8%	3
Kėdainiai	50	11	22%	9	18%	2
Jurbarkas	50	12	24%	8	16%	3

Taip pat tyrimo vietose buvo surinktos *I. ricinus* lervos. Nuo augmenijos surinktų *I. ricinus* lervų užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. lygis Europoje svyruoja nuo 0% iki 11% (vidurkis 1,9%) (Piesman, Gern 2004) Tik iš kiaušinių dėties išsiritusios *I. ricinus* lervos *B. burgdorferi* s.l. gali būti įgijusios transovariniu būdu, kai spirochetos migruoja į suaugusios patelės ovarijas ir taip perduodamos erkių palikuonims (Tsao, 2009, Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005). Tyrimo metu išanalizuota 114 Kėdainiuose ir Joniškėje nuo augmenijos surinktų *I. ricinus* lervų. 3,5% jų nešiojo graužikų platinamą *B. afzelii*.

3.2. Graužikų užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l.

Iš viso sugauti 302 graužikai priklausantys 3 rūšims – 195 *M. glareolus*, 102 *A. flavicollis* ir 5 *A. agrarius* (2.2 lentelė). Didžiausias apsikrėtimas Laimo ligos sukėlėjų nustatytas *A. flavicollis* (57%) pelėse, mažesnis *M. glareolus* (42%) pelėnuose ir *A. agrarius* (40%) pelėse. Ankstesniuose tyrimuose Lietuvoje buvo nustatytas mažesnis užsikrėtimo lygis graužikuose (Radzijeuskaja, 2007), taip pat užsikrėtimas kitaip pasiskirstė tarp tos pačios rūšies graužikų: didžiausias *M. glareolus* (21%) mažesnis *A. flavicollis* (10,5%) ir mažiausias *A. agrarius* (6,7%). Skirtinguose rajonuose nustatytas skirtingas *A. flavicollis* ir *M. glareolus* užsikrėtimo Laimo ligos sukėlėju lygis. Ankstesniuose tyrimuose, įvykdytuose 2005 – 2006 metais (Radzijeuskaja, 2007), *M. glareolus* užsikrėtimas svyravo nuo 0% iki 71,4%, *A. flavicollis* nuo 0% iki 50%. Šio tyrimo metu (2009 metais) nustatyto *B. burgdorferi* s.l. paplitimas skirtingose

vietovėse *M. glareolus* tarpe svyravo nuo 34% iki 50%, *A. flavicollis* nuo 31,6% iki 71,4% (3.2 pav.). Slovakijoje atliktų tyrimų metu (Hanincova, 2003) nustatytas didesnis *A. flavicollis* užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. nei *M. glareolus* (29% ir 18% atitinkamai). Šio tyrimo metu *A. flavicollis* didesnis užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. nei *M. glareolus* nustatytas trijuose rajonuose – Joniškėje, Kėdainiuose ir Jurbarkoje (3.2 pav., 3.2 lentelė) tačiau statistiškai patikimai užsikrėtimas tarp rūšių skyrėsi tik Joniškėje (χ^2 testas, $p < 0,05$).



3.2 pav. Skirtingų graužikų rūšių užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. skirtingose vietovėse.

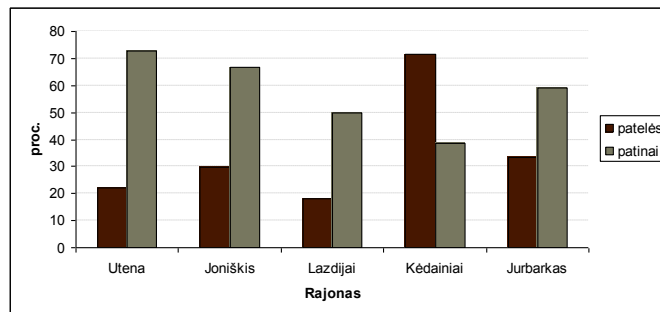
3.2 lentelė. *B. burgdorferi* s.l. paplitimas visose tirtose vietovėse, sukėlėjo pasiskirstymas tarp rūšių ir amžiaus grupių.

Rajonas	amžiaus grupė	<i>Myodes glareolus</i>		<i>Apodemus flavicollis</i>		bendras graužikų užsikrėtimas
		ištirta	užsikrėtę	ištirta	užsikrėtę	
Utena	juvenile	2	0			
	subadult	3	1			
	adult	37	19	16	8	
	visi	42	20 (47,6%)	16	8 (50%)	48%
Joniškis	juvenile	3	0	3	1	
	subadult	8	1	1	0	
	adult	31	15	10	9	
	visi	42	16 (38%)	14	10 (71,4%)	46%
Lazdijai	juvenile	1	0	1	0	
	subadult	9	1	4	0	
	adult	37	15	14	6	
	visi	47	16 (34%)	19	6 (31,6%)	33%
Kėdainiai	juvenile			3	0	
	subadult	11	5	9	4	
	adult	9	5	18	16	
	visi	20	10 (50%)	30	20 (66,7%)	60%
Jurbarkas	juvenile	4	0	1	0	
	subadult	16	6	3	2	
	adult	24	13	19	12	
	visi	44	19 (43,2%)	23	14 (60,9%)	49%

Sukėlėjo paplitimo skirtingose amžiaus grupėse palyginimui, sugauti individai buvo pasverti ir pagal svorį suskirstyti į amžiaus grupes – juvenile (jaunikliai), subadult (subrendę, bet dar nesiveisiantys) ir adult (suaugę ir besiveisiantys).

M. glareolus atveju užsikrėtimas didėjo priklausomai nuo graužiko amžiaus: iš 10 *M. glareolus* jauniklių, nei viename nebuvo nustatyta Laimo ligos spirocheta, subrendusiuose užsikrėtimas siekia 30%, suaugusiuose 49% (χ^2 testas, $p < 0,05$). *A. flavicollis* jauniklių (12.5%) ir subrendusių (35%) individų užsikrėtimas buvo žymiai mažesnis nei suaugusiuose (66%) (χ^2 testas, $p < 0,05$). Taigi, didėjant amžiui didėja ir užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. lygis (3.2 lentelė). Tiek Slovakijoje, tiek Lietuvoje ankstesnių tyrimų metu nustatyta, jog suaugę graužikai labiau buvo užsikrėtę Laimo ligos spirocheta nei jaunikliai ir subrendę individai. Tą patį patvirtina ir šio tyrimo duomenys.

Sukėlėjo paplitimui skirtingose lytysėse analizuojami subrendę ir suaugę abiejų rūšių graužikai. *M. glareolus* graužikuose Utenos, Joniškio ir Lazdijų rajonuose *B. burgdorferi* s.l. patikimai nešiojo patinai (χ^2 testas, $p < 0,05$) (3.3 pav., 3.3 lentelė). Tuo tarpu *A. flavicollis* atveju užsikrėtimo *B. afzelii* tarp lyčių ryškių tendencijų neaptikta.



3.3 pav. Skirtingų *M. glareolus* lyčių užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l.

3.3 lentelė. Užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. skirtumai tarp graužikų lyčių

Rajonas	lytis	<i>Myodes glareolus</i>		<i>Apodemus flavicollis</i>		
		ištirt	užsikrėtę	ištirt	užsikrėtę	
					proc.	
Utena	patelė	18	4	8	4	50%
	patinas	22	16	8	4	50%
Joniškis	patelė	27	8	10	8	80%
	patinas	12	8	1	1	
Lazdijai	patelė	22	4	6	5	83,3
	patinas	24	12	12	1	8,3%

Kėdainiai				71,4			54,5
	patelė	7	5		11	6	
	patinas	13	5	38,5	16	14	87,5
Jurbarka				33,3			66,7
	patelė	18	6		9	6	
	patinas	22	13	59,1	13	8	61,5

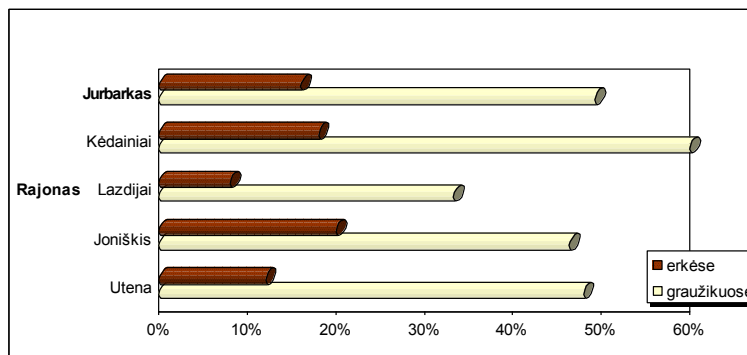
3.3. *B. burgdorferi* s.l. genotipų graužikuose nustatymas

Slovakijos ir Lietuvos ankstesnių metų tyrimų duomenys rodo, jog graužikuose dominuoja *B. afzelii* genotipas. Slovakijoje vienas *A. flavicollis* individas buvo užsikrėtęs *B. garinii* genotipu.

Šiame tyrime genotipų analizė patvirtino jog *B. afzelii* yra absoliučiai dominuojanti rūšis graužikų tarpe. Ją nešiojo visi išskyrus tris graužikus (*A. flavicollis* Joniškyje ir du *M. glareolus* Lazdijuose), kurių genotipas nebuvo nustatytas. Taip pat graužikuose rasta dviguba infekcija: Joniškyje *A. flavicollis* nešiojo *B. afzelii* + *B. burgdorferi* s.s., Kedainiuose *A. flavicollis* nešiojo *B. afzelii* + *B. garinii* ir Jurbarkoje *M. glareolus* nešiojo *B. afzelii* + *B. garinii* genotipus.

3.4. *B. afzelii* paplitimas graužikuose ir nuo augmenijos surinktose *I. ricinus* nimfose

Skirtingose vietovėse aptiktas skirtingas graužikų užsikrėtimo sukėlėju lygis (3.2 lentelė). Didžiausias užsikrėtimas Kėdainių rajone (60%), mažiausias Lazdijuose (33%). Lazdijuose taip pat užfiksuotas mažiausias *I. ricinus* nimfų nuo augmenijos užsikrėtimo *B. afzelii* lygis – 8%, Kėdainiuose *B. afzelii* nešiojo žymiai daugiau – 18% *I. ricinus* nimfų (3.1 lentelė). Utenos, Joniškio ir Jurbarko rajonuose *B. afzelii* graužikuose sudarė 48%, 46% ir 49% atitinkamai, tuo tarpu *I. ricinus* nimfų nuo augmenijos tose pačiose vietovėse užsikrėtimas šiuo genotipu siekė 12%, 20% ir 16% atitinkamai (3.4 pav.). Taigi, graužikų užsikrėtimo Laimo ligos sukėlėju lygis iš dalies priklauso nuo toje vietovėje esančių jų ektoparazitų – *I. ricinus* nimfos vystymosi stadijos erkių – užsikrėtimo lygio.



3.4 pav. Graužikų ir nuo augmenijos nurinktų *I. ricinus* nimfų užsikrėtimas *B. afzelii*.

Tačiau palyginus graužikų ir *I. ricinus* nimfų užsikrėtimo *B. afzelii* lygius Joniškyje, Utenoje ir Kėdainiuose, matyti, jog egzistuoja ir kiti faktoriai įtakojantys tokį aukštą graužikų užsikrėtimą. Graužikų galimybė užsikrėsti ligos sukėlėju priklauso ir nuo nimfų parazitavimo lygio, t.y. nuo to kaip pačios *I. ricinus* nimfos pasiskirsto graužikų populiacijoje. Kuo dažniau ir intensyviau *I. ricinus* nimfomis parazituojamas gyvūnas, tuo didesnė tikimybė jam įgyti ligos sukėlėją.

3.5. Graužikų užsikrėtimas *I. ricinus* erkėmis

2009 metais sugauti graužikai buvo ypatingai parazituojami nesubrendusiomis *I. ricinus* stadijomis. Nuo 302 graužikų buvo nurinktos 9185 erkės. *I. ricinus* sudarė 96% (476 nimfos ir 8359 lervos) visų nuo graužikų nurinktų erkių. Likusius 4% sudarė *Ixodes trianguliceps* (88 nimfų ir 262 lervų) erkės. Suaugusių *Ixodes* genties erkių neaptikta. Skirtingose vietovėse graužikai nevienodai buvo apsikrėtę abiejų rūšių erkėmis. Absoliuti dauguma *I. trianguliceps* erkių graužikus parazitavo Jurbarko rajone, ir tik kelios rastos Lazdijuose (3.5 lentelė).

Ankstesniuose tyrimuose Lietuvoje 2005 – 2006 metais (Radzijeuskaja, 2007) *M. glareolus* graužikuose užsikrėtimo *I. ricinus* lervomis ekstensyvumas siekė 24,6%, užsikrėtimo nimfomis ekstensyvumas 10,5%. Šio tyrimo metu nustatytas užsikrėtimo lervomis ekstensyvumas *M. glareolus* siekė 91%, nimfomis 34,2%. *A. flavicollis* graužikuose 2005 - 2006 metais graužikų užsikrėtimo *I. ricinus* lervomis ekstensyvumas siekė 48,2%, o nimfomis – 10,6%, tuo tarpu 2009 metais užsikrėtimo lervomis ekstensyvumas - 95,8%, o nimfomis - 61,6%.

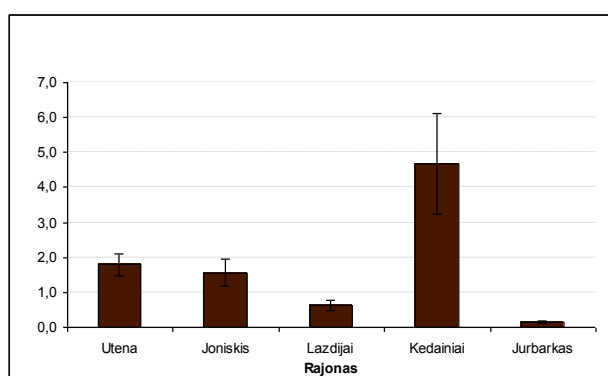
Ankstesniuose tyrimuose Lietuvoje 2005 – 2006 metais (Radzijeuskaja 2007) *M. glareolus* graužikuose nustatytas vidutinis apsikrėtimo *I. ricinus* lervomis lygis siekė 1.7 ± 0.58 , tuo tarpu 2009 metais dešimt kartų didesnis – siekė 21.2 ± 2.2 . Šios rūšies apsikrėtimas

nimfomis buvo 0.9 ± 0.6 , 2009 metais 0.8 ± 0.13 . *A. flavicolis* graužikuose vidutinis apsikrėtimas *I. ricinus* lervomis siekė 2.1 ± 0.47 , šio tyrimo metu dvidešimt kartų didesnis 41.4 ± 7.34 . Užsikrėtimas nimfomis 0.25 ± 0.1 pakilo daugiau nei dešimt kartų, iki 3.13 ± 0.74 . Tokie dideli užsikrėtimo *I. ricinus* erkėmis skirtumai taip pat gali būti gaunami, kadangi 2009 metais medžiaga rinkta erkių aktyvumo piko metu.

Didesnis graužikų kontaktas su *B. burgdorferi* s.l. vektoriais padidina Laimo ligos sukėlėjo cirkuliaciją natūralioje gamtoje. Didesnis apsikrėtimas *I. ricinus* nimfomis padidina galimybę graužikui užsikrėsti *B. burgdorferi* s.l. spirocheta. Didesnis graužikų apsikrėtimas *I. ricinus* lervomis padidina galimybę, jog ligos sukėlėjas bus perduotas erkei.

3.6. Graužikų užsikrėtimas *I. ricinus* nimfomis ir *B. afzelii* spirochetomis

Kėdainiuose *I. ricinus* nimfos parazitavo didžiausią graužikų procentą (užsikrėtimo erkėmis ekstensyvumas 70%), Joniškyje mažesnę (užsikrėtimo erkėmis ekstensyvumas 46%) (3.4 lentelė). Kėdainiuose graužikai taip pat buvo vidutiniškai labiau apsikrėtę *I. ricinus* nimfomis nei Joniškyje (Mann-Whitney U-Test, $p < 0,05$) (3.5 pav.), todėl nepaisant to, jog Joniškyje *I. ricinus* nimfų nuo augmenijos užsikrėtimas *B. afzelii* genotipu didesnis nei Kėdainiuose, esant didesniai graužikų apkrovimui erkėmis, sukėlėjas graužikui perduodamas efektyviau (3.4 lentelė).



3.5 pav. Vidutinis graužikų užsikrėtimas *I. ricinus* nimfomis tirtose vietovėse (vidurkis \pm standartinė paklaida).

Lyginant graužikus Utenoje ir Joniškyje, jų užsikrėtimo lygis *B. afzelii* panašus, nors *I. ricinus* nimfų nuo augmenijos užsikrėtimas Utenoje žymiai mažesnis nei Joniškyje (12% ir 20% atitinkamai). Ir nors graužikų vidutinis apsikrėtimas *I. ricinus* nimfomis buvo panašus,

Utenoje buvo didesnis užsikrėtimo erkėmis ekstensyvumas, t.y. didesnis graužikų procentas buvo parazituojamas *I. ricinus* nimfų.

3.4 lentelė. *B. afzelii* paplitimas tarp graužikų, *I. ricinus* nimfų, ir šių reiškinių sąsaja per graužikų užsikrėtimo erkėmis ekstensyvumą.

	Utena	Joniškis	Lazdijai	Kėdainiai	Jurbarkas
<i>I. ricinus</i> nimfų užsikrėtimo <i>B. afzelii</i> lygis	12%	20%	8%	18%	16%
ekstensyvumas	55%	46%	33%	70%	12%
graužikų užsikrėtimo <i>B. afzelii</i> lygis	48%	46%	33%	60%	49%

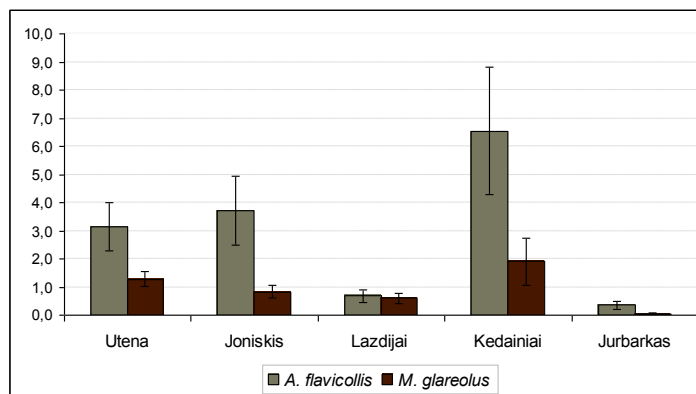
Lazdijuose nustatytas mažiausias *I. ricinus* nimfų užsikrėtimo *B. afzelii* lygis, taip pat žemiausias užsikrėtimo erkėmis ekstensyvumas ir graužikus vidutiniškai parazitavo mažiausias erkių skaičius, todėl nenuostabu, kad, lyginant tarp visų rajonų, sukėlėją įgavo mažiausias procentas graužikų.

Tačiau Jurbarkas šios tendencijos neatspindi: vietovėje stebimas didelis tiek graužikų (49%), tiek nimfų (16%) užsikrėtimo *B. afzelii* lygis, nors nimfomis buvo apsikrėtęs mažiausias procentas graužikų bei aptiktas labai žemas vidutinis apsikrėtimas *I. ricinus* nimfomis. Viena vertus, šioje vietovėje graužikai buvo gaudyti vėliausiai, rugpjūčio viduryje, kuomet baigiasi *I. ricinus* nimfų aktyvumo pikas, todėl palyginus tarp visų rajonų nuo graužikų buvo nurinkta mažiausiai nimfų. Kita vertus, Jurbarko nuo graužikų nurinktos 87 *I. trianguliceps* nimfos, kurių vaidmuo *B. burgdorferi* s.l. enzootiniame cikle nėra aiškus. Tai yra plačiai Europoje paplitusi erkių rūšis, kuri galbūt atlieka antrinį vaidmenį enzootiniame *B. burgdorferi* s.l. cikle. Šios erkės daugiausia parazituoja graužikus ir nurinktose nuo graužikų erkėse buvo nustatyta *B. burgdorferi* s.l. (Piesman, Gern 2004). Tiesa, išlieka neaišku ar šios erkės išlaiko įgytą sukėlėją per vystymosi stadijų kaitą ir gali jį perduoti kitam šeimininkui. Tyrimus apsunkina jų biologija: tai endofilinės erkės, gyvenančios graužikų urvuose ir nėra randamos ant augmenijos.

3.7. Užsikrėtimo nimfomis skirtumai tarp rūšių

Utenos, Joniškio ir Kėdainių rajonuose *A. flavicollis* buvo labiau parazituojamas *I. ricinus* nimfų nei *M. glareolus*. Šiuose rajonuose *I. ricinus* nimfos vidutiniškai gausiau parazitavo *A. flavicollis* nei *M. glareolus* (Mann-Whitney U-Test, $p < 0,05$) (3.6 pav.) taip pat parazitavo didesnę *A. flavicollis* individų procentą populiacijoje (didesnis užsikrėtimo erkėmis

ekstensyvumas). Joniškyje *A. flavicollis* buvo labiau apsikrėtęs *B. burgdorferi* s.l. spirocheta nei *M. glareolus* (χ^2 testas, $p < 0,05$).



3.6 pav. vidutinis skirtingų rūšių graužikų apsikrėtimas *I. ricinus* nimfomis (vidurkis \pm standartinė paklaida).

Tuo tarpu Slovakijoje (Hanincova ir kt., 2003) tarp abiejų graužikų rūšių užsikrėtimo *I. ricinus* nimfomis skirtumų nebuvo nustatyta.

3.8. Užsikrėtimas *I. ricinus* nimfomis skirtingose graužikų lytyse

Užsikrėtimo *I. ricinus* nimfomis tarp lyčių skirtumams nustatyti analizuojami subrendę ir suaugę abiejų rūšių graužikai.

Utenoje ir Joniškyje *M. glareolus* patinai buvo labiau parazituojami *I. ricinus* nimfų nei patelės (Mann-Withney U-Test, $p < 0,05$). Tuose rajonuose patinuose nustatytas didesnis apsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. (χ^2 testas, $p < 0,05$). Kėdainiuose *I. ricinus* nimfų vidutiniškai labiau parazituojamos buvo patelės (Mann-Withney U-Test, $p < 0,05$). Tačiau apsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. nesiskyrė (χ^2 testas, $p < 0,05$). Lazdijuose ir Jurbarkoje tarp *M. glareolus* lyčių užsikrėtimo *I. ricinus* nimfomis skirtumo nebuvo, tačiau patinai Lazdijuose buvo labiau užsikrėtę *B. burgdorferi* s.l.

A. flavicollis patinai buvo labiau užsikrėtę *I. ricinus* nimfomis nei patelės tik Utenos rajone (Mann-Withney U-Test, $p < 0,05$), tačiau abejose lytyse nustatytas toks pats užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. lygis.

3.5 lentelė. Graužikus užsikrėtimo erkėmis ekstensyvumas ir vidutinis apsikrėtimo lygis.

Rajonas	sugauti graužikai	<i>Ixodes ricinus</i>								<i>Ixodes trianguliceps</i>			
		nurinkta		ekstensyvumas		vidutinis erkių gausumas				nurinkta		ekstensyvumas	
		lervų	nimfų	lervų	nimfų	lervų	±se	nimfų	±se	lervų	nimfų	lervų	nimfų
Utena	<i>M. glareolus</i>	1209	54	95 (40/42)	45 (19/42)	28,8	3,98	1,3	0,27				
	<i>A. flavicollis</i>	813	50	100 (16/16)	81 (13/16)	50,8	9,46	3,1	0,86				
	visi	2022	104	97 (56/58)	55 (32/58)	34,9	4,06	1,8	0,32				
Joniškis	<i>M. glareolus</i>	1868	35	98 (41/42)	36 (15/42)	44,5	7,08	0,8	0,23				
	<i>A. flavicollis</i>	1783	52	100 (14/14)	79 (11/14)	127,4	42,62	3,7	1,23				
	visi	3651	87	98 (55/56)	46 (26/56)	65,2	12,6	1,6	0,38				
Lazdijai	<i>M. glareolus</i>	408	28	85 (40/47)	30 (14/47)	8,7	1,60	0,6	0,18	1		2 (1/47)	
	<i>A. flavicollis</i>	125	13	79 (15/19)	42 (8/19)	6,6	1,36	0,7	0,23	11	1	11 (2/19)	5 (1/19)
	visi	533	41	83 (55/66)	33 (22/66)	8,1	1,20	0,6	0,15	12	1	5 (3/66)	2 (1/66)
Kėdainiai	<i>M. glareolus</i>	430	38	95 (19/20)	55 (11/20)	21,5	6,03	1,9	0,82				
	<i>A. flavicollis</i>	1234	196	100 (30/30)	80 (24/30)	41,1	7,69	6,5	2,27				
	visi	1664	234	98 (49/50)	70 (35/50)	33,3	5,34	4,7	1,43				
Jurbarkas	<i>M. glareolus</i>	222	2	82 (36/44)	5 (2/44)	5,0	0,99	0,05	0,03	243	83	73 (32/44)	55 (24/44)
	<i>A. flavicollis</i>	267	8	100 (23/23)	26 (6/23)	11,6	2,24	0,3	0,13	7	4	22 (5/23)	4 (1/23)
	visi	489	10	88 (59/67)	12 (8/67)	7,3	1,07	0,15	0,05	250	87	52 (37/71)	35 (25/71)

3.9. Sukėlėjo perdavimas *I. ricinus* lervoms

Stuburinio gyvūno vaidmuo Laimo ligos sukėlėjo cikle gali būti įvertinamas keliais būdais. Pats vertingiausias metodas yra gyvūno ksenodiagnostiniai tyrimai laboratorijoje su neinfekuotomis erkėmis. Tačiau šis metodas ne visada įvykdomas, kadangi ne visus gyvūnus įmanoma laikyti laboratorinėmis sąlygomis (Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005). Be to jis neatspindi tikros situacijos gamtiniuose židiniuose.

Kaip alternatyvus metodas gali būti erkių, kurios parazitavo laukinius gyvūnus natūralioje gamtoje ištyrimas. Tyrimo vietovėje palyginamas nurinktų nuo gyvūno ir nuo augmenijos erkių užsikrėtimo lygis. Jei nurinktų nuo šeimininko erkių užsikrėtimas didesnis nei nuo augmenijos, vadinasi gyvūnas dalyvauja sukėlėjo cikle (Humair, Gern, 2000, Derdakova, Lenčakova, 2005).

B. afzelii genotipo perdavimo efektyvumui nustatyti ištirtos pilnai kraujo prisisiurbusios *I. ricinus* lervos nuo 5 *A. flavicollis* ir 9 *M. glareolus* graužikų (3.6 ir 3.7 lentelės), kuriems buvo nustatytas sukėlėjas. Iš viso ištirtos 196 *I. ricinus* lervos. *A. flavicollis* parazitavusių lervų užsikrėtimas sukėlėju variavo nuo 12% iki 50%, *M. glareolus* nuo 33% iki 100%. Tyrimo metu ištirta 114 Joniškyje ir Kėdainiuose nuo augmenijos surinktų *I. ricinus* lervų. 3,5% erkių nešiojo graužikų platinamą *B. afzelii*. Taigi, *M. glareolus* ir *A. flavicollis* neabejotinai dalyvauja *B. afzelii* cikle. Suskaičiuotas bendras *B. afzelii* perdavimo efektyvumas parodė, jog *M. glareolus* (55,4%) geriau nei *A. flavicollis* (31%) perduoda sukėlėją besimaitinančiai *I. ricinus* lervai (χ^2 testas, $p < 0,01$).

Trijuose graužikuose buvo rasta dviguba infekcija: Joniškyje *A. flavicollis* nešiojo *B. afzelii* + *B. burgdorferi* s.s., Kėdainiuose *A. flavicollis* nešiojo *B. afzelii* + *B. garinii* ir Jurbarko *M. glareolus* nešiojo *B. afzelii* + *B. garinii* genotipus. Buvo ištirtos šiuos graužikus parazitavusios *I. ricinus* lervos.

A. flavicollis nešiojantis *B. afzelii* + *B. burgdorferi* s.s dvigubą infekciją besimaitinančiai erkei perdavė 4,5% efektyvumu.

A. flavicollis, kuriam nustatyta *B. afzelii* + *B. garinii*, dvigubą infekciją besimaitinančiai *I. ricinus* lervai perdavė 8,5% efektyvumu. *M. glareolus*, kuriam nustatyta *B. afzelii* + *B. garinii*, jį parazitavusioms *I. ricinus* lervoms perdavė tik *B. afzelii*.

3.6 lentelė. *A. flavicollis* graužikus parazitavusių *I. ricinus* lervų užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l.

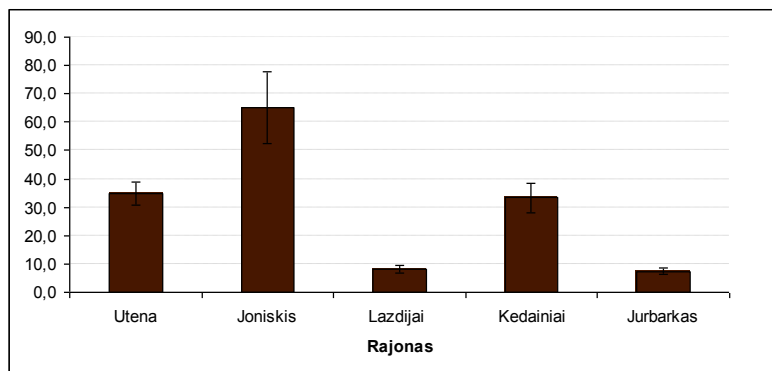
<i>A. flavicollis</i>	ištirta	teigiama	proc.
1	47	9	19%
2	30	15	50%
3	17	2	12%
4	8	4	50%
5	11	5	45%
viso	113	35	31%

3.7 lentelė. *M. glareolus* graužikus parazitavusių *I. ricinus* lervų užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l.

<i>M. glareolus</i>	ištirta	teigiama	proc.
1	7	3	43%
2	10	5	50%
3	9	3	33%
4	19	13	68%
5	8	4	50%
6	8	3	38%
7	3	3	100%
8	8	6	75%
9	11	6	55%
viso	83	46	55,4%

3.10. Graužikų užsikrėtimas *I. ricinus* lervomis

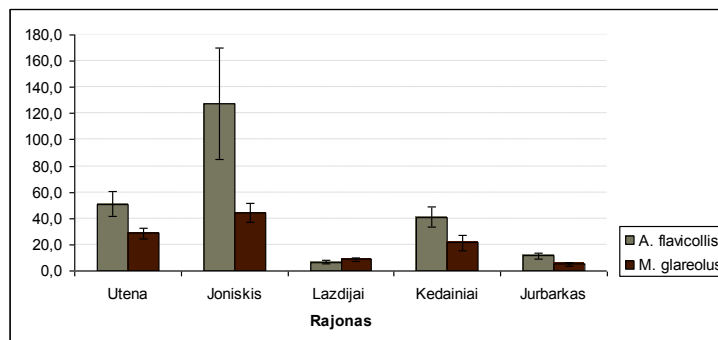
B. burgdorferi s.l. perdavime vienas iš svarbiausių faktorių yra šeimininkų ir vektorių gausumas (Sinski ir kt., 2006). 2009 metais stebimas ypatingai didelis *I. ricinus* lervų aktyvumas. Utenos, Joniškio ir Kėdainių rajonuose graužikų užsikrėtimo *I. ricinus* lervomis ekstensyvumas sudarė 97%, 98% ir 98%. Lazdijuose ir Jurbarke 83% ir 88% atitinkamai (3.4. lentelė). *A. flavicollis* buvo labiau apsikrėtęs *I. ricinus* lervomis nei *M. glareolus*. Panašūs rezultatai aptikti Lenkijoje (Sinski ir kt., 2006). Pirmuosiuose rajonuose taip pat labai didelis vidutinis *I. ricinus* lervų gausumas (3.7 pav.), kas sukuria palankias sąlygas sukėlėjo perdavimui. Kuo didesnis kiekis *I. ricinus* lervų parazituoja užsikrėtusį gyvūną, tuo didesnė erkių dalis įgis sukėlėją.



3.7 pav. Grauzikų apsikrėtimas *I. ricinus* lervomis (vidurkis ±standartinė paklaida).

Taip pat didesnis lervų tankumas ant stuburinio šeimininko padidina galimybę sukėlėją perduoti erkių maitinimosi šalia (co-feeding) būdu. Literatūroje (Humair, Gern 2000, Derdakova, Lenčakova 2005) tikimybė, jog sukėlėjas perduodamas netiesioginiu būdu (maitinantis dviems erkėms šalia) įvardijama kaip tyrimų gamtoje trūkumas, kadangi tokiu būdu sunkiau stuburinių gyvūnų priskirti rezervuariniams šeimininkams.

Tačiau nepriklausomai nuo to, koku būdu sukėlėją įgyja erkė – ar tiesiogiai nuo užsikrėtusio grauziko, ar netiesiogiai, kai dvi erkės maitinasi šalia (co-feeding) ar dėl to, kad sukėlėjas kurį laiką išsilaiko įkandimo vietoje ir erkė įgyja spirochetą, neišplitusią po šeimininko organizmą (localized extended co-feeding) - gamtoje gyvūnas tarnauja kaip tiltas sukėlėjo cirkuliavimui tarp vektorių.



3.8 pav. Skirtingų grauzikų rūšių apsikrėtimas *I. ricinus* lervomis (vidurkis ±standartinė paklaida).

Palyginus *I. ricinus* lervų gausumą tarp dviejų rūšių vidutinis apsikrėtimas 4 iš 5 vietovių didesnis *A. flavicollis* grauzikuose (3.8 pav.) (Mann-Whitney U-Test, $p < 0,05$). Didesnį *A. flavicollis* užsikrėtimą nustatė ir tyrimai Slovakijoje (Hanincova ir kt., 2003) ir Lenkijoje (Sinski ir kt., 2006). Užsikrėtimas lervomis nesiskyrė tik Lazdijuose. Taigi, net mažesnis

sukėlėjo perdavimo efektyvumas *A. flavicollis* gali būti kompensuojamas didesniu apsikrėtimu *I. ricinus* lervomis.

IŠVADOS

1. Mišraus miško biotope *Ixodes ricinus* nimfų užsikrėtimo *B. burgdorferi* sensu lato lygis skirtingose vietovėse svyruoja nuo 14% iki 24%. *I. ricinus* lervų užsikrėtimas siekia 3,5%.

2. *A. flavicollis* pelėse ir *M. glareolus* pelėnuose užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. lygis panašus, išskyrus Joniškio rajone, kur *A. flavicollis* patikimai daugiau užsikrėtęs *B. burgdorferi* s.l. nei *M. glareolus*.

Užsikrėtimo *B. burgdorferi* s.l. lygis priklauso nuo graužiko amžiaus - abiejų rūšių suaugę individai patikimai daugiau užsikrėtę *B. burgdorferi* s.l. nei jaunikliai. *M. glareolus* graužikuose užsikrėtimas priklauso ir nuo lyties - trijose iš penkių vietovių patinai patikimai daugiau užsikrėtę ligos sukėlėju nei patelės.

3. Mišraus miško biotope *B. afzelii* yra dominuojantis genotipas tiek *I. ricinus* erkėse, tiek ir graužikuose. Trijuose graužikuose buvo nustatyta dviguba infekcija: *B. afzelii* + *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* + *B. garinii* ir *B. afzelii* + *B. garinii*.

4. *A. flavicollis* yra labiau parazituojamas *I. ricinus* nimfų nei *M. glareolus* – užsikrėtimas patikimai skyrėsi trijuose iš penkių tyrimo vietovių. Užsikrėtimas sukėlėju tarp graužikų lyčių vieningos tendencijos neparodė.

5. Tiek *A. flavicollis*, tiek *M. glareolus* neabejotinai dalyvauja *B. burgdorferi* s.l. palaikyme gamtiniuose židiniuose, kadangi juos parazitavusių *I. ricinus* lervų užsikrėtimas *B. burgdorferi* s.l. žymiai didesnis nei nuo augmenijos nurinktose *I. ricinus* lervose.

6. *M. glareolus* pelėnai *B. afzelii* perduoda efektyviau parazituojančiai *I. ricinus* lervai nei *A. flavicollis* pelės, tačiau keturiose iš penkių vietovių *A. flavicollis* buvo patikimai gausiau parazituojamas *I. ricinus* lervų, o tai padidina ligos sukėlėjo perdavimo tikimybę. Abi graužikų rūšys yra svarbūs rezervuariniai šeiminkai *B. burgdorferi* s.l. ciklo palaikyme gamtoje.

SUMMARY

The aim of present study was to assess the importance of two main reservoir hosts *A. flavicollis* and *M. glareolus*, and their ectoparasites *I. ricinus* immature ticks in Lyme disease agent *B. burgdorferi* s.l. circulation in natural foci.

The following research tasks were formulated:

1. To establish the infectivity level of questing immature *I. ricinus* ticks with *B. burgdorferi* s.l. and to determine it's genotypes composition.
2. To investigate the infectivity level of two main Lithuania rodent species *A. flavicollis* and *M. glareolus* with *B. burgdorferi* s.l. and to determine it's genotypes composition.
3. To estimate prevalence and abundant of infestation with immature *I. ricinus* ticks in *A. flavicollis* and *M. glareolus* species rodents. To calculate any differences between rodents in species, age and sex level.
4. To evaluate transmittion efficient of *B. burgdorferi* s.l. from rodent to feeding *I. ricinus* larvae.

Field studies were carried out in fragmented mixed forest of five districts of Lithuania – Utena, Joniškis, Lazdijai, Kėdainiai and Jurbarkas. Rodents were trapped with live traps. Each trapped rodent was identified to a species level, sexed, weighed, and examined for feeding tick larvae and nymphs.

DNA from rodents ear-tissues was extracted using 'Genomic DNA Purification Kit' (Fermentas), DNA from ticks was extracted by lysis in ammonium hydroxide. Polymerase chain reaction (PGR) for *B. burgdorferi* s.l. detection was performed using the FL6/FL7 oligonucleotide primers in *fla* gene target sequence (276 bp). Genotyping was performed using primers for *ospA* target sequence amplification – GI-L/GI-R for *B. burgdorferi* s.s., GII-L/GII-R for *B. garinii* and GIII-L/GIII-R for *B. afzelii*. Estimates of host infestation with *I. ricinus* ticks were obtained using prevalence of infestation (percentage of hosts carrying ticks) and abundance of infestation (average number of ticks per host considering the entire host population sampled). Estimates of *B. burgdorferi* s.l. infections were measured as infection prevalence (percentage of ticks or hosts infected).

The infectivity level in questing *I. ricinus* nymphs in fragmented mixed forests of Lithuania was relatively high, and varied in different districts from 14% to 24%. The most prevalent genotype was *B. afzelii*, and only in one district *B. garinii* was found. In case of *I. ricinus* larvae the overall infectivity level with Lyme disease spirochete was 3,5%.

In order to establish the infectivity level with *B. burgdorferi* s.l. in total 302 rodents comprising 3 species - *A. flavicollis*, *M. glareolus* and *A. agrarius* were investigated. The results have showed that in all rodent species the infectivity level with *B. burgdorferi* s.l. was extremely high. It was higher than in previous studies made in Lithuania. Comparing difference of infection of two main species *A. flavicollis* and *M. glareolus* only in one district – Joniškis – infectivity level was significantly higher in *A. flavicollis* than in *M. glareolus*.

There were differences in age categories of both species. It was established, that adult individuals were more infested with *B. burgdorferi* s.l. than juveniles.

In case of *M. glareolus*, in three districts of five males were more infested with *B. burgdorferi* s.l. than females. But there were no such differences between *A. flavicollis*.

B. afzelii was absolutely dominant genotype among rodents. Only in three individuals mixed infection with two genotypes was found: in *A. flavicollis* – *B. afzelii* + *B. burgdorferi* s.s. and *B. afzelii* + *B. garinii*, in *M. glareolus* - *B. afzelii* + *B. garinii*.

In 2009 the prevalence and abundance of infestation with immature *I. ricinus* ticks on rodents was extremely higher than in 2005-2006 period. In three districts the prevalence of infestation with *I. ricinus* nymphs was significantly higher in *A. flavicollis* than in *M. glareolus*. In both species no straight tendency of infestation between sex was observed.

There is no doubt, that both *A. flavicollis* and *M. glareolus* species play significant role in *B. burgdorferi* s.l. circulation in endemic foci, because infectivity level from fully engorged *I. ricinus* larvae was higher than in questing ones. The efficiency of *B. burgdorferi* s.l. transmission was significantly higher in *M. glareolus* than in *A. flavicollis*. But in case of infestation with *I. ricinus* larvae, in four of five districts *A. flavicollis* was more infested than *M. glareolus*. So it is hard to predict which species is more important in *B. burgdorferi* s.l. circulation in natural foci.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ambrasienė D. 2007. Distribution of *Ixodes ricinus* L. ticks and prevalence of their endoparasites in Lithuania and its determinant factors. Daktaro disertacijos santrauka. Kaunas. 2007. – 32 p.
2. Ambrasienė D., Turčinavičienė J., Vaščilo J., Žygtienė M., 2004. Ekrių *Ixodes ricinus* užsikrėtimo *Borrelia burgdorferi* nustatymas Lietuvoje, taikant PGR metodą. Veterinarija ir zootechnika. T. 28 (50): 45-47.
3. Jurgelevičius V., Steponavičiūtė D., 1999. Polimerazės grandininė reakcija: principai ir taikymo sritys. Laboratorinė medicina. Nr. 3: 28-34.
4. Lietuvos fauna: žinduoliai, 1998. Vilnius, Mokslas, 294 p.
5. Pavilionis A., Lasinskaitė-Čerkašina A., Vaičiuvėnas V., Akramas L., 2000. Medicinos mikrobiologijos pagrindai. Kaunas, Kauno medicinos universitetas, 368 p.
6. Alekseev A. N., Dubinina H. V., 2002. Stability of parasitic systems under conditions of antropogenic pressure. Contributions from the zoological institute. No 6.
7. Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P., 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 18, No 3: 484-509.
8. Barbour A. G., 1998. Fall and Rise of Lyme Disease and Other *Ixodes* Tick-borne Infections in North America and Europe. British Medical Bulletin. No 54 (3): 647-658.
9. Buczek A., Bartosik K., Olszewski T., 2006 b. Host Specificity of Ticks. In: A. Buczek, C. Blaszak (ed.), Arthropods Epidemiological Importance. Lublin, Koliber: 37-54.
10. Buczek A., Kubrak T., Salata M., Bartosik K., Olszewski T., Stepień K., 2006 a. Biological Features of Non-nidicolous and Nidicolous Ticks. In: A. Buczek, C. Blaszak (ed.), Arthropods Epidemiological Importance. Lublin, Koliber: 55-65.
11. Derdakova M., Lenčakova D., 2005. Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. AAEM (Ann Agric Environ Med): 165-172.
12. Demaerschalek I., BenMessaoud A., De Kesel M., Hoyois B., Lobet Y., Hoet P., Bigaignon G., Bollen A., Goldfroid E., 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. J Clin Microbiol 33(3): 602-8.
13. Giardina A. R., Schmidt K. A., Schaubert E. M., Ostfeld R. S., 2000. Modeling the role of songbirds and rodents in the ecology of Lyme disease. Can. J. Zool. Vol. 78: 2184-2197.

14. Gray J. S., 2001. The biology of Ixodes ticks, with special reference to *Ixodes ricinus* // <http://www.zoeco.org/zoeco/soczee/meetings/CRTBI/abstract/grey.asp>
15. Gray J. S., 1998. The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis // *Experimental & Applied Acarology*. Vol. 22: 249-258.
16. Hillyard P. D., 1996. Ticks of North-West Europe. London, The Natural History Museum, 178 p.
17. Hanincova K., Schafer S. M., Etti S., Sewell H. S., Taragelova V., Ziak D., Labuda M. and Kurtenbach K., 2002. Association of *Borrelia afzeli* with rodents in Europe. *Parasitology* (2003), 126: 11-20.
18. Haumair P., Gern L. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe, 2000. *Microbes and Infections*, 2: 915-922.
19. Krupka M., Raska M., Belakova J., Horynova M., Novotny R., Weigl E. Biological aspects of lyme disease spirochetes: unique barteria of the *Borrelia burgdorferi* species group, 2007. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 151 (2): 175-186.
20. Margos G., Vollmer S. A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K., 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 16: 5410-5416.
21. Masuzawa T., 2004. Terrestrial distribution of Lyme Borreliosis Agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.* Vol. 57: 229-235.
22. Radzijeuskaja J. 2007. Erkių pernešamų patogenų *Borrelia burgdorferi* sensu lato ir *Anaplasma phagocytophilum* rezervuarinių šeimininkų ir vektorių nustatymas Lietuvoje ir Norvegijoje. Daktaro disertacijos santrauka. Kaunas. 2007. – 39 p.
23. Rauter C., Hartung T., 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, No 11: 7203-7216.
24. Ostfeld R. S., 2000. Keesing F. Biodiversity and disease risk: the case of Lyme disease. *Conservation Biology*. Vol. 14, No 3: 722-728.
25. Picken R. N., 1992. Polymerase Chain Reaction Primers and Probes Derived from Flagellin gene Sequences for Specific Detection of the Agents of Lyme Disease and North American Relapsing Fever. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 30, No 1: 99-114.
26. Piesman J., Gern L., 2004. Lyme Borreliosis in Europe and North America. *Parasitology*. No 129: 191-220.

27. Radzijeuskaja J., Indriulytė R., Paulauskas A., Ambrasienė D., Turčinavičienė J., 2005. Genetic Polymorphism Study of *Ixodes Ricinus* L. Populations in Lithuania Using RAPD Markers. *Acta Zoologica Lituanica*. Vol. 15, No 4: 341-348.
28. Radzijeuskaja J., Paulauskas A., Antušaitė A., Turčinavičienė J., Ambrasienė D., Rosef O., 2006. Infestation of Small Mammals by *Ixodes Ricinus* Ticks and Their Infection with *Borrelia Burgdorferi* sensu lato in Lithuania and Norway. In: A. Buczek, C. Blaszk (ed.), *Arthropods Epidemiological Importance*. Lublin, Koliber: 167-174.
29. Schaubert E. M., Ostfeld R. S., 2002. Modeling the effects of reservoir competence decay and demographic turnovers in Lyme disease ecology. *Ecological applications*. Vol. 12, No 4: 1142-1162.
30. Schmidt K. A., Ostfeld R. S., 2001. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology*. Vol. 82, No. 3: 609-619.
31. Schwan T. G., Piesman J., 2002. Vector Interactions and Molecular Adaptations of Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes Associated with Transmission by Ticks. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 8, No 2: 115-121.
32. Sinski A., Pawelczyk A., Bajer A., Behnke J. M., 2006. Abundance of Wild Rodents, Ticks and Environmental Risk of Lyme Borreliosis: a Longitudinal Study in an Area of Mazury Lakes District of Poland. *Ann Agric Environ Med*. Vol. 13: 295-300.
33. Stanczak J., Racewicz M., Kubica-Biernat B., Kruminis-Lozowska W., Dabrowski J., Adamczyk A., Markowska M., 1999. Prevalence of *Borrelia Burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in different Polish woodlands. *Ann Agric Environ Med*. No 6: 127-132.
34. Štefančíková A., Bhide M., Pet'ko B., Stanko M., Mošansky L., Fričova J., Derdakova M., Travníček M. 2004. Anti-Borrelia antibodies in rodents: important hosts in ecology of Lyme disease. *Ann Agric Environ Med*. Vol. 7: 209-213.
35. Turčinavičienė J., Ambrasienė D., Paulauskas A., Radzijeuskaja J., Rosef O., Žygutienė M., 2006. The Prevalence and Distribution of *Borrelia Burgdorferi* Sensu Lato in Host Seeking *Ixodes Ricinus* Ticks in Lithuania. *Biologija*. No 1: 64-68.
36. Tsao J. I. Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles, 2009. *INRA*, 1-42.
37. Walker A. R., 2001. Age structure of a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in relation to its seasonal questing. *Bulletin of Entomological Research*. Vol. 91: 69-78.

38. Wang G., van Dam A. P., Schwartz I., Dankert J., 1999. Molecular Typing of *Borrelia Burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*. No 5: 633-653.
39. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis, 2007. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49: 13-21.
40. Žakovska A., Janouškovcova E., Pejchalova K., Halouzka J., Dendis M. Identification and characterization of 31 isolates of *Borrelia burgdoeferi* (spirochaetales, spirochaetaceae) obtained from various hosts and vectors using PGR-RFLP and SDS-PAGE analysis, 2008. *Acta Parasitologica*, 58(2): 186-192.