

LATVIJAS UNIVERSITĀTE



***Ixodes ricinus* L. un *Ixodes persulcatus* P.Sch.
(Acari: Ixodidae) izplatība, to pārnēsāto infekcijas slimību
nozīme un molekulārā epidemioloģija Latvijā**

Antra Bormane

Promocijas darbs
Rīga, 2007

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

Ixodes ricinus L. un *Ixodes persulcatus* P.Sch.
(Acari: Ixodidae) izplatība, to pārnēsāto infekcijas slimību
nozīme un molekulārā epidemioloģija Latvijā

Darba autore: Antra Bormane

Darba vadītāji: Profesors, Dr. biol., MD Viesturs Baumanis
Asoc. profesors, Dr. biol. Voldemārs Spuņģis

Recenzenti: Profesors, Dr. habil. biol. Pauls Pumpēns (LU)
Profesors, Dr. biol. Viesturs Melecis (LU)
Profesors, Dr. biol. Arvīds Barševskis (DPU)

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Universitātes Bioloģijas
zinātņu Promocijas padomes atklātā sēdē 2007. gada.....pl.....

.....

Promocijas padomes priekšsēdētājs:.....

Saturs

1. Tēmas aktualitāte	5
2. Literatūras apskats	6
2.1. <i>Ixodidae</i> dzimtas ērcu izplatība.....	6
2.2. Ērcu bioloģija un dzīves cikls.....	8
2.3. Ērcu izcelsme un ģenētiskie pētījumi.....	9
2.4. Ērcu pārnesto infekciju ierosinātāji.....	11
2.4.1. Ērcu pārnestie patogēnie vīrusi un to izraisītās infekcijas.....	11
2.4.1.1. Ērcu encefalīta vīrusi.....	11
2.4.1.2. Citi patogēnie vīrusi un ar tiem saistītas infekcijas pasaulē.....	13
2.4.2. Ērcu pārnestas patogēnās baktērijas, riketsijas un protozoa, un to izraisītās infekcijas.....	14
2.4.2.1. <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. komplekss.....	14
2.4.2.2. <i>Borrelia recurrentis</i>	16
2.4.2.3. <i>Bartonella</i> sp.....	16
2.4.2.4. <i>Coxiella burnetii</i>	16
2.4.2.5. <i>Francisella tularensis</i>	16
2.4.2.6. <i>Rickettsia</i> sp.....	17
2.4.2.7. <i>Anaplasma</i> sp., <i>Ehrlichia</i> sp. un <i>Neorickettsia</i> sp.	17
2.4.3. Protozoa.....	21
2.4.3.1. <i>Babesia</i> sp.....	21
2.4.3.2. <i>Theileria</i> sp.	23
2.4.4. Ērcu neirotoksīns (ērcu paralīzes)	24
3. Darba novitāte	25
4. Pētījuma mērķis un uzdevumi	25
5. Materiāli un metodes	26
5.1. Ilggadīgo statistisko datu avoti un to statistiskā apstrāde.....	26
5.2. Dabas perēkļu apsekošanas vietas un metodes.....	26
5.2.1. Ērcu monitoringa vietas.....	26
5.3. <i>Ixodes</i> ērcu un to pārnesto mikroorganismu noteikšana un molekulārā genotipēšana.....	27
5.3.1. Ērcu sugu morfoloģiskā identifikācija.....	27
5.3.2. <i>Ixodes</i> morfoloģiski noteikto sugu molekulāra pārbaude.....	27
5.3.3. Ērcu pārnesto patogēnu nemolekulārās identifikācijas metodes.....	28
5.3.3.1. Mikroskopēšana.....	28
5.3.3.2. Kultivēšana.....	29
5.3.3.3. Seroloģiskās metodes.....	29
5.3.4. Patogēnu molekulārās identifikācijas metodes, genotipēšana.....	30

5.3.4.1. Genomiskās DNS izdalīšana.....	30
5.3.4.2. Genomiskās RNS izdalīšana	30
5.3.4.3. Ērču encefalīta vīrusa detektēšana ar cDNS divpakāpju amplifikācijas metodēm.....	30
5.3.4.4. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> detektēšana ar 16S rRNS gēna fragmenta divpakāpju amplifikāciju.....	31
5.3.4.5. <i>Anaplasma /Ehrlichia</i> ģinšu detektēšana ar 16S rRNS gēna fragmenta divpakāpju amplifikāciju.....	32
5.3.4.6. Patogēnu genotipēšana ar sekvencēšanas metodi.....	32
5.3.4.7. Patogēnu ganotipēšana ar hibridizācijas metodi.....	32
6. Rezultāti un diskusija.....	33
6.1. Epidemioloģiski nozīmīgās <i>Ixodidae</i> ērces Latvijā.....	33
6.1.1. Ērču sugu izplatība Latvijā.....	33
6.1.2. Morfoloģiski noteikto <i>Ixodes</i> ērču sugu molekulāra apstiprināšana.....	34
6.1.3. <i>Ixodes</i> ērču sezonālā un ikgadējā aktivitāte.....	35
6.2. Ērču pārnesto infekcijas slimību epidemioloģija Latvijā.....	39
6.2.1. Ērču encefalīta incidences tendences.....	39
6.2.2. Laima boreliozes incidences tendences.....	44
6.2.3. Ērlihioze (anaplazmoze)	46
6.3. Patogēnu prevalences <i>Ixodes</i> ērcēs.....	47
6.3.1. Ērču encefalīta vīruss.....	47
6.3.1.1. Ērču encefalīta vīrusa prevalences dabas perēkļos un no pacientiem noņemtās ērcēs (noteikta ar ELISA metodi).....	47
6.3.1.2. Ērču encefalīta vīrusa detektēšana ar divpakāpju RT-PCR.....	51
6.3.2. <i>B. burgdorferi</i> s.l. prevalences ērcēs.....	54
6.3.2.1. <i>B. burgdorferi</i> s.l. prevalences ērcēs, noteikta mikroskopiski.....	54
6.3.2.2. <i>B. burgdorferi</i> s.l. prevalences ērcēs, noteikta molekulāri.....	54
6.3.3. <i>Anaplasmataceae</i> dzimtas prokariotu prevalences ērcēs.....	56
6.3.4. <i>Babesia</i> sp. prevalences ērcēs.....	61
6.4. Ar ērču izplatību, aktivitāti un inficētību saistītie faktori.....	62
6.4.1. Izbarotāji.....	62
6.4.2. Biocenožu tips un mainība.....	66
6.4.3. Atsevišķi meteoroloģiski rādītāji.....	68
7. Secinājumi.....	68
8. Pateicības.....	70
9. Literatūra.....	70
10. Publikācijas.....	77
11. Konferenču tēzes.....	78

1. Tēmas aktualitāte

Ixodidae dzimtas ērces ir pasaulē pazīstamas kā daudzveidīgu cilvēkiem un dzīvniekiem patogēnu baktēriju, riketsiju un vīrusu pārnēsēji un šo patogēnu cirkulācijas uzturētājas dabā. Ērces pārnēsā ērcu encefalīta un citus vīrusus, borēlijas, anaplazmas, ērlīhijas, riketsijas, babēzijas, bartonellas, Q drudža, tularēmijas u.c. ierosinātājus, satur toksīnus, tomēr tikai atsevišķi plašāk izplatītie ērcu pārnēstie patogēni un ar tiem saistītās infekcijas slimības ir pazīstamas Latvijā.

Mūsu valstī novērotas vairākas *Ixodidae* dzimtas sugas, tomēr epidemioloģiskā nozīme līdz šim konstatēta tikai divām *Ixodidae* dzimtas *Ixodes* ģints ērcēm: *Ixodes ricinus* L., kas izplatīta visā valsts teritorijā, retāk tās austrumdaļā, kur dominē *Ixodes persulcatus* P. Sch. Katru gadu tiek reģistrēta iedzīvotāju saslimstība ar trīs šo ērcu pārnēsātām infekcijas slimībām - ērcu encefalītu, Laima boreliozēm un pēdējos gados arī ar ērlīhiozi (anaplazmozi).

Saslimstība ar ērcu encefalītu pēdējo 15 gadu periodā ir bijusi salīdzinoši augstāka nekā citur Eiropā. Visaugstākais ērcu encefalīta gadījumu skaits (vairāk par 1300 gadījumiem jeb 53 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem) tika reģistrēts 1994. un 1995. gadā, un kopš šī laika Latvijā tiek reģistrēts mainīgs ērcu encefalīta gadījumu skaits. 2005. gadā tika reģistrēts salīdzinoši zems saslimstības līmenis - 142 ērcu encefalīta gadījumi (6,16 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem), tomēr 2006. gadā saslimstība atkal pieauga līdz 170 gadījumiem (7,41 gadījums uz 100 000 iedzīvotājiem). Šo kraso incidences svārstību cēlonis palicis neskaidrs.

Saslimstība ar Laima boreliozēm (Laima slimību) Latvijā pieauga, sākot ar 1995. gadu, kad tika reģistrēti vidēji 200 saslimšanas gadījumi gadā. Visvairāk saslimšanas gadījumu ar Laima boreliozēm tika reģistrēti 2003. gadā (714 saslimušie jeb 30,62 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem); 2005. gadā gadījumu skaits samazinājās (493 saslimušie jeb 21,38 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem), savukārt 2006. gadā atkal pieauga (601 saslimušais jeb 26,2 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem). Statistikas dati norāda uz atšķirīgu ērcu encefalīta un Laima boreliozu incidences tendenci neskatoties uz kopīgiem abu infekcijas slimību ierosinātāju pārnēsējiem, un tas varētu norādīt uz citu faktoru ietekmi.

Pirmais ērlīhiožu (anaplazmožu) gadījums Latvijā tika seroloģiski diagnosticēts 2001. gadā, un līdz 2005. gadam tika reģistrēti kopumā tikai 6 saslimšanas gadījumi (līdz 2006. gadam - 12), kas varētu norādīt uz nediagnosticētu anaplazmožu gadījumu eksistenci. Līdz šim nav bijuši pieejami dati par šo un citu mazāk pazīstamu ērcu pārnestu infekciju ierosinātāju prevalenci ērcēs un izplatību Latvijā.

Lai gan ērcu pārnesto slimību ikgadējās incidences līmeni ietekmē diagnostisko metožu uzlabošanās, iedzīvotāju kontakts ar šo slimību dabas perēkļiem, imunizācijas līmenis un informētības pieaugums par ērcu pārnestu infekciju profilaksi, tomēr incidences tendences vairāk vai mazāk atkarīgas arī no *Ixodes* ērcu aktivitātes un inficētības izmaiņām ilgākā laika periodā, kas savukārt saistīts ar dažādu biotisko un abiotisko faktoru ietekmi.

Šajā darbā apkopotī un analizēti ilggadīgi statistikas dati un kopš 1995. gada praktiski izdarītie novērojumi ērcu pārnesto slimību dabas perēkļos, to saistība ar saslimstības tendencēm, veikta *Ixodes* ērcu aktivitātes un izplatības ilggadīgās tendences ietekmējošo faktoru izpēte, kā arī apskatīti atsevišķu *Ixodes* ērcu pārnesto

patogēno un neskaidras patogenitātes mikroorganismu sugu molekulārie pētījumi ar mērķi noskaidrot to izplatību un sastopamību Latvijā.

2. Literatūras apskats

2.1. *Ixodidae* dzimtas ērcu izplatība

Arachnida klases *Ixodida* rindas *Ixodidae* dzimtai pieder *Ixodes*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Anocentor*, *Aponomma*, *Boophilus*, *Bothriocroton*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Nosomma*, *Rhipicentor* un *Rhipicephalus* ģintis (ģinšu uzskaitījums no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) datu bāzes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)).

***Ixodes* ģints** sastopama gandrīz visos kontinentos un tajā ir vairāk nekā 200 sugu (Filipova, 1985). Literatūrā biežāk minētas *Ixodes persulcatus*, *I. ricinus*, *I. scapularis* (*I. dammini*), *I. hexagonus*, *I. holocyclus*, *I. nipponensis*, *I. cookei*, *I. ovatus*, *I. pacificus*, *I. pavlovskyi*, *I. dentatus*, *I. tanuki*, *I. turdus*, *I. trianguliceps*, *I. uriae* un citas epidemioloģiski nozīmīgas un mazāk nozīmīgas sugas (Estrada et Jongejan, 1999).

Ixodes scapularis (sinonīms *Ixodes dammini*), sastopama ASV un Kanādas Atlantijas okeāna piekrastes daļā, kā arī ASV dienvidu apgabalos, ieskaitot Teksasu un Oklahomu (Estrada et Jongejan, 1999). *I. scapularis* ir galvenais *B. burgdorferi* un citu cilvēkam patogēnu zoonožu ierosinātāju pārnēsējs ASV un Kanādā ar rezervuāru baltkāju peli *Peromyscus leucopus*. Arī *Ixodes pacificus* sastopama ASV, Kanādā, kā arī Meksikā, tās izplatības areāls ir nedaudz plašāks. *I. pacificus* pārnēsā *Babesia* ģints patogēnus, bez tam konstatēts, ka šī suga nav īpaši efektīva kā *Borrelia burgdorferi* vektors, jo to preimāģinālās stadijas galvenokārt parazitē uz ķirzakām.

Ixodes hexagonus ir izplatīta Eiropā, t.sk. arī Vācijā un Lielbritānijā (Estrada et Jongejan, 1999). Eksperimentāli pierādīts, ka tā pārnēsā *B. burgdorferi* un ērcu encefalīta vīrusu, tomēr tās epidemioloģiskā nozīme nav liela, kaut arī tā bieži piesūcas cilvēkiem. *Ixodes uriae* ir jūras putnu parazīts, kam demonstrēts enzootisks *Borrelia burgdorferi* cikls. *Ixodes ovatus* sastopama Tibetā, Birmā, Nepālā, Japānā un Ķīnā.

Ixodes holocyclus izplatīta Austrālijā, pazīstamākais ērcu paralīžu cēlonis dzīvniekiem un cilvēkiem; pārnēsā arī *Rickettsia australis* un *Borrelia burgdorferi*. Šīs ērcu sugas galvenais saimnieks ir somainā žurka.

Ixodes cookei atrodama ASV un Kanādas austrumdaļas un rietumdaļas štatos, kur ir galvenais Powassan encefalīta vīrusa vektors (Nuttall et Labuda, 1994). *I. cookei* ir suņu, cilvēku un dažādu savvaļas dzīvnieku parazīts. *Ixodes dentatus* imago (pieaugušās ērces) ir vienīgi trušu parazīti, savukārt to preimāģinālās attīstības stadijas parazitē uz putniem un retos gadījumos arī uz cilvēkiem. No to kāpuriem izolēta *Borrelia burgdorferi*. Rudeņos liels skaits šo ērcu nimfu uzbrūk putniem, tā sekmējot *Borrelia burgdorferi* izplatību (Estrada et Jongejan, 1999).

Latvijā pazīstamākās ir divas *Ixodes* ērcu sugas - *Ixodes ricinus* L. (suņu ērce) un *Ixodes persulcatus* P.Sch. (taigas ērce), kaut atbilstoši literatūras datiem, konstatētas arī *I. trianguliceps* Bir., *I. lividus* Koch., *I. crenulatus* Koch, *I. aphronophorus* P. Sch., kam nav nozīme kā cilvēku patogēnu pārnēsējiem (Grīnbergs, 1966).



1. attēls. *I. ricinus* māfīte un tēviņš. Attēli no <http://www.bada-uk.org> un <http://www.arthropods.de>

Ixodes ricinus ērcēm ir plaša ģeogrāfiska izplatība (1. att.). Šī suga uz zemeslodes sastopama no 65° un 30° Ziemeļu platuma līdz 60° garumam (Estrada-Pena, 1998). To izplatības areālā ietilpst Eiropa, daļa Mazāzijas un Ziemeļāfrika. Šī suga izplatīta Latvijas rietumu un centrālajā daļā, bet retāk sastopama valsts austrumdaļā (Bormane, 1999).

I. persulcatus izplatības areāls stiepjas no Baltijas jūras līdz Klusajam okeānam (Filipova, 1985). Latvijā šī suga dominē Latvijas ziemeļaustrumu un austrumu rajonos. J. Skadiņas novērojumi (nepublicēti dati, pēc 1980. g. SVA arhīva pierakstiem) liecina, ka 1970. un 1980. gados *I. persulcatus* areāla robeža ir stiepusies gar Limbažu rajona viduslīniju, tālāk cauri Rīgas rajonam (apliecot Rīgu no dienvidiem un izejot cauri Babītei, Baldonei un Olainei), turpinoties uz dienvidrietumiem un izejot cauri Ogres, Aizkraukles, Jēkabpils un Daugavpils rajonam, tomēr atbilstoši 1990. gadu novērojumiem *I. persulcatus* ērces Rīgas un Ogres rajonā nav konstatētas (Bormane, 1999).

Dermacentor ģintī ietilpst ap 30 sugu (2. att.). Tā plaši izplatīta Eiropā, nepublicēti novērojumi liecina par šīs ģints sugu atsevišķiem novērojumiem arī Latvijā. Vairums no *Dermacentor* sugām ir ērces, kas attīstības gaitā parazitē uz trīs saimniekiem, tomēr ir arī izņēmumi, piemēram, *D. albopictus*.



2. attēls. *Dermacentor variabilis* māfīte un tēviņš. Attēls no http://www.tickinfo.com/american_dogtick.htm

Viena no epidemioloģiski nozīmīgām sugām ir *D. reticulatus* Fabricius, kas izplatīta Eiropas lapukoku mežos un mežastepēs, t.sk. Lielbritānijā, Polijā, Ungārijā, Spānijā, Francijā, Vācijā, Beļģijā, Austrijā, Čehoslovākijā, Rumānijā, biežāk sastopamas atklātākos mežu biotopos – pļavās, upju ielejās un mežmalās, un pārnes dažādus patogēnus, ieskaitot tularēmijas, Q drudža, ērcu encefalīta u.c. ierosinātājus (Koloņins, 1984, Heile et al., 2006). *D. andersoni* Stiles arī izplatīta Amerikā, apdzīvo

prērijas, Kordiljēru mežus, un ir galvenais ērcu paralīžu izraisītājs cilvēkiem un mājlopiem, bez tam pārnēsā Q drudža, tularēmijas, drudžu ierosinātājus.

D. marginatus Sulzer izplatīta gan Eiropā, kur mitinās g.k. mežu zonā, gan Āzijā (Turcijā, Sīrijā, Irānā, Afganistānā un Ķīnā), kur apdzīvo mežastepes, stepes un pustuksnešus. Areāla dienvidu daļā suga sastopama galvenokārt kalnu apgabalos, bet ievērojami mazākā skaitā nekā ziemeļu daļā. Pārnes tularēmijas, ērcu riketsiožu, Q drudža, ērcu encefalīta u.c. cilvēku un dzīvnieku slimību ierosinātājus (Koloņins, 1984)

D. variabilis Say izplatīts Amerikā - Kanādā, ASV un Meksikā, un apdzīvo g.k. zemienes – lapukoku mežus, krūmājus un pļavas, un izcirtumus. Parazitē g.k. uz plēsējiem. Mežu izciršana sekmējusi sugas areāla izplatību un ērcu blīvuma pieaugumu. Pieder ērcu sugām, kas izraisa ērcu paralīzes, pārnēsā arī tularēmijas un drudžu ierosinātājus. *D. albipictus* Packard izplatīta Ziemeļamerikā – Kanādā, ASV, Meksikā; kontinenta dienviddaļā šīs sugas ērces sastopamas retāk nekā ziemeļu daļā. Šīs sugas ērcu attīstība ilgst gadu, un visas trīs attīstības stadijas parazitē uz lieliem pārnadžiem un nepārnadžiem – mājlopiem, vai mežu dzīvniekiem. Epidemioloģiskā nozīme šai sugai ir mazāka (Koloņins, 1984).

2.2. Ērcu bioloģija un dzīves cikls

Iksodu ērcēm raksturīgas četras morfoloģiskās attīstības fāzes: ola, divas kustīgas preimaginālās fāzes - kāpurs un nimfa, un pieaugusi ērce jeb imago. *Ixodes* mātītes (3-4 mm) spēj uzņemt lielus asins daudzumus reproduktīvās sistēmas attīstībai. Mātītēm ķermeņa masa pēc asins sūkšanas var pieaugt vairāk nekā 50-200 reizes (Mehlhorn, 2004), un tās var palikt piesūkušās saimniekdzīvniekam 5-12 dienas. Tēviņi ir mazāki (2-3 mm), asinis sūc minimāli, un drīz pēc piesūkšanās atkrīt no saimnieka.

Kāpuru vidējais garums ir 0,5 mm, bet nimfu – 1,5 mm. Imago un nimfām ir 4 pāri ekstremitāšu. Kāpuriem trūkst ceturtdā kāju pāra (Filipova, 1995).

Ērces parazitē uz siltasiņu, retāk aukstasiņu mugurkaulniekiem. *Ixodidae* dzīves cikls ietver ilgstošus badošanās periodus, pat līdz 3 gadiem. Piesūkusies imago pamet izbarotāju un pēc dažām dienām līdz mēnesim (atkarībā no gaisa temperatūras) atliek 2000-3000 olu. Olas to atlikšanas laikā tiek pārklātas ar ūdensizturīgu vaska sekrētu, lai pasargātu no nelabvēlīgiem vides apstākļiem un tās būtu piestiprinātas substrātam, kur atliktas. Pēc olu atlikšanas mātīte drīz iet bojā, gan dehidratācijas dēļ, gan arī no metabolisma produktiem, kas olu producēšanas laikā netiek izvadīti. Kā noskaidrots eksperimentos ar dzīvniekiem, *Ixodidae* olas satur toksiskas vielas (Mehlhorn, 2004; Filipova, 1985)

Informāciju par vidi ērce iegūst ar daudzveidīgu receptoru palīdzību, ko veido kutikulārie sariņi, kas izvietoti pa visu ķermeni un ekstremitātēm. Galvenais distants receptors ir t.s. Hallera orgāns, kas izvietots uz ērces priekšējām pēdām. Šis orgāns palīdz konstatēt izbarotāja parādīšanos pēc CO₂ koncentrācijas izmaiņas gaisā, kā arī pēc smakas, bez tam par izbarotāju tuvošanos signalizē arī gaisa un zemes svārstības, ko uztver dažādi receptijas orgāni - laktona receptori, metilsalicilāta, sulfīdu, benzaldehīda, alifātisko aldehīdu, amonija, pentānskābes, butānskābes receptori u.c. (Mehlhorn, 2004).

Ērču attīstību, uzvedību un dzīves ilgumu visvairāk iespaido gaisa mitrums un temperatūra. Vidēji olas attīstās 2-10 nedēļas. Atkarībā no gaisa mitruma un temperatūras kāpuru un nimfu attīstība ilgst no 1-4 nedēļām vai ilgāk. To pāreja nākamajā attīstības fāzē nav iespējama bez barošanās (Filipova, 1985). *Ixodes* ērču attīstības cikls vidēji ilgst no 2-5 gadiem.

Kad ērce pieķeras piemērotam izbarotājam, tā ar sruķa asajām daļām - helicerām pārgriež saimnieka ādu un ievada brūcē sruķīti. Ērce saimnieka audos izdala ātri sacietējošu siekalu dziedzeru sekrētu – cementa konusu. Siekalas un cements satur vairākus imunogēnos proteīnus, tomēr cementa struktūrai piemīt zema antigēnā aktivitāte, kas novērš saimnieka ķermeņa atgrūšanas reakciju pret svešķermeņi (Mehlhorn, 2004; Filipova, 1985). Lieko asinssūkšanas laikā uzņemto šķidrums daudzumu ērce ievada kopā ar siekalām atpakaļ brūcē.

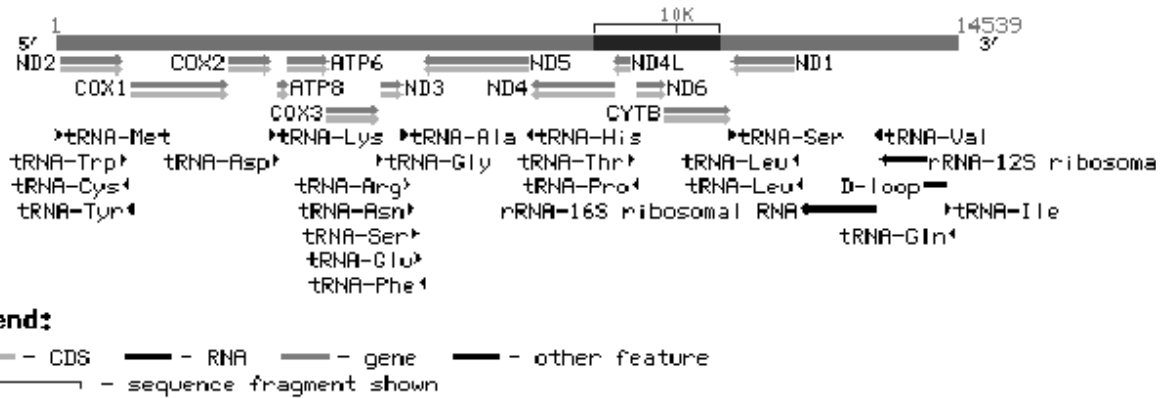
Ērcēm ir ļoti cieša saistība starp nervu un cirkulācijas sistēmām. Singanglijs jeb smadzenes, kas veidojušās saplūstot smadzeņu ganglijam un abdominālajiem nerviem, ir lokalizētas ķermeņa centrālajā daļā.

Grauzēji, galvenokārt *Apodemus flavicollis* un *Clethrionomys glareolus*, ir galvenie ērču kāpuru izbarotāji, kas tās inficē ar ērču encefalīta vīrusu un virkni citiem patogēniem (Nuttall et Labuda, 1994), savukārt nimfas izbaro un inficē vidējie zīdītāji – lapsas, zaķi u.c., un putni (Aleksejev, 1993; Okulova, 1986). Lielajiem un vidējiem zīdītājiem, kas izbaro ērču pieaugušo stadiju, ir augstāks imūno dzīvnieku īpatsvars, jo to mūža ilgums ir lielāks un paaudzes mainās daudz retāk kā sīkajiem un vidējiem zīdītājiem, tādēļ to loma ērču populācijas piesātināšanā ar patogēniem nav tik liela (Okulova, 1986).

2.3. Ērču izcelsme un ģenētiskie pētījumi

Ērču izcelsme tiek saistīta ar Paleozoja ēras Devona periodu. Barker et Murrell (2004) norāda, ka *Ixodidae* dzimta, kā arī iespējams, visas ērces, varētu būt izcēlušās senā Gondvanas kontinenta daļā, kas pēc atdalīšanās kļuva par Austrāliju, vai arī vēlāk, kad Austrālija un Antarktika jau bija pilnībā atdalījušās. Pirmie ērču saimnieki bijuši rāpuļi vai abinieki.

Ērču filoģenēzes pētījumos galvenokārt tiek izmantotas ērču mitohondriālā genoma 12S rRNS, 16S rRNS vai citohroma C oksidāzes I gēns (Barker et Murrell, 2004). Gēnu translokācijas un inversijas, gēnu duplikācijas, nukleotīdu substitūcijas tRNS motīfos, kas parasti ir ļoti konservatīvi, ir labi filoģenētiski marķieri. Ērču mitohondriālie genomi ir cirkulāri, un satur 37 gēnus – 13 proteīnu kodējošus gēnus, 2 ribosomālos RNS gēnus, 22 transfer-RNS gēnus un nekodējošo kontroles reģionu. Mitohondriālo genomu garums ir 14-16 kilobāzu garš. NCBI datu bāzes informācija liecina (3. att.), ka pilnībā sekvencēti sekojošu *Ixodidae* ērču sugu mitohondriālie genomi: *I. persulcatus* (NC 004370 – 14 539 nukleotīdi (Shao et al., 2005), *I. uriae* (15 053 nt), *I. holocyclus* (15 007 nt), *I. hexagonus* (14 539 nt), *Amblyomma triguttatum* (14 740 nt), *Haemaphysalis flava* (14 686 nt), *Rhipicephalus sanguineus* (14 710 nt).



3. attēls. *Ixodes persulcatus* NC_004370 mitohondrija pilns genoms (NCBI datu bāze <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pilns genoms sekvenčēts tikai vienai *Ixodidae* ērcu sugai – *Amblyomma americanum* (1000 mb), Oklahomas universitātes vadībā (ASV). Uzsākta *Ixodes scapularis* genoma sekvenčēšana Masačūsetas Broad institūta vadībā. Pašreiz TIGR (*The Institute for Genomic Research*; <http://www.tigr.org/>) datu bāzē jau pieejami 6 293 858 pārklājošos nukleotīdu sekvenču fragmenti.

Ixodes ērcu sugu ģenētiskai identifikācijai, mazāk filoģenēzes pētījumiem, izmanto arī trīs nekodējošos reģionus jeb speiserus. Eikariotu rRNS kodējoši gēni izvietoti kā tandēmi atkārtojumi vienā vai vairākās kodola genoma hromosomās, un katrs atkārtojums ietver 3 kodējošos reģionus (mazo subvienību - 18S, 5,8S un lielo subvienību – 28S), un 4 nekodējošos reģionus, trīs no kuriem (ITS1, ITS2 un ETS) veido 45S prekursora molekulu. ITS2 (*internal transcribed spacer*) ir nepieciešami ribosomu subvienību izveidē. ITS2 primārā sekvence ērcēm ir aptuveni 1547 bp gara, sekundārā sastāv no 5 domēniem (Hlinka et al, 2002).

Ixodidae gēnu ekspresija pētīta *Rhipicephalus microphilus* preimaginālai stadijai, kas tika pakļauta fosfororganiskā insekticīda (*coumaphos*) iedarbībai, kas iespaido ērcu acetilholīnesterāzi (Guerrero et al., 2007). Gēnu ekspresijas seriālā analīze (SAGE) tika izmantota, lai analizētu atšķirīgu gēnu ekspresiju ar fosfororganiskajiem savienojumiem apstrādātiem un neapstrādātiem uzņēmīgiem un neuzņēmīgiem ērcu kāpuriem, un noskaidrotu gēnus, kas ir iesaistīti metaboliskajā atbildē uz akaricīdu iedarbību un ērcu rezistences mehānismu, jo plaša minētā akaricīda izmantošana jau radījusi rezistentas ērcu populācijas Meksikā. SAGE marķieris, kas gēnu bankā atbilda citohromam P450 līdzīgām ekspresētām sekvencēm (EST) ievērojami vairāk tika konstatēts pret insekticīdu rezistentiem kāpuriem, salīdzinot ar uzņēmīgiem, gan pirms, gan arī pēc apstrādes ar minēto insekticīdu.

Veikti arī gēnu ekspresijas pētījumi *I. scapularis* mātītēm, kas piesūkušās saimniekam, un tēviņiem (Guilfoile et Packila, 2004). Tika konstatēta četru raksturīgu gēnu ekspresija (Is 9, Is 10, Is 11 un Is 12). Is 9 un Is 12 saistīts ar ērcu ģints siekalu cementa proteīniem, tomēr mātītēm barošanās laikā īpaši tiek ekspresēts Is 9, kas satur līdz 50% glicīna. Is 11 vienādi izteikts abiem ērcu dzimumiem, un atbilst Hsp70 (*heat shock proteins*) grupai, kas acīmredzot barošanās laikā vai kontaktējoties ar saimniekiem pie paaugstinātas temperatūras stabilizē proteīnus.

2.4. Ērču pārnesto infekciju ierosinātāji

2.4. 1. Ērču pārnesti patogēnie vīrusi un to izraisītās infekcijas

2.4.1.1. Ērču encefalīta vīrusi

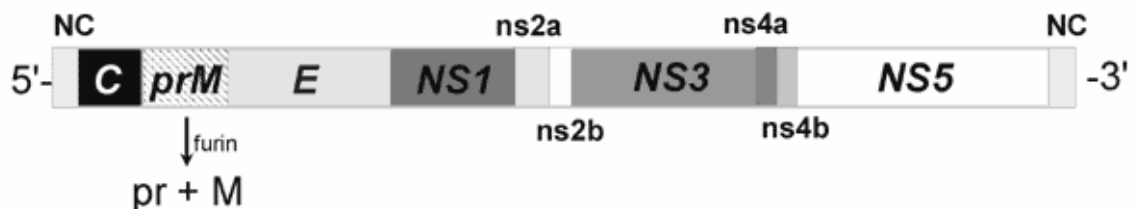
Ixodidae ērces ieņem otro vietu pasaulē pēc odu sugām kā plaša spektra cilvēku un dzīvnieku slimību ierosinātāju pārnēsēji (Parola et Raoult, 2001).

Ērču encefalīta vīruss ir *Flaviviridae* dzimtas RNS vīruss, kas izraisa smagu neiroloģisku slimību – ērču encefalītu visā Eirāzijas tritorijā (Kaiser, 2002). Epidemioloģiski nozīmīgākās ērču sugas, kas pārnēs šo vīrusu, pieder *Ixodidae* dzimtai.

Ir pazīstami trīs ērču encefalīta vīrusa apakštipes – Rietumu apakštipes (W-TBEV) ar prototipa štammu *Neudoerfl*, Tālo Austrumu apakštipes (FE-TBEV) ar prototipa štammu *Sofjin*, un Sibīrijas apakštipes ar prototipa štammu *Vasilchenko* (Ecker et al., 1999). Eiropas vīrusa izolāti pieder Rietumu apakštīpam, un tos pārnēsā galvenokārt *I. ricinus*, bet Krievijas un Āzijas valstu apakštipes – Tālo austrumu un Sibīrijas apakštīpam. Galvenais pārnēsētājs pēdējiem diviem apakštīpiem ir *Ixodes persulcatus*. Visi trīs ērču encefalīta vīrusa apakštipes ir cieši antigēniski un filogēnētiski saistīti (Lundkvist et al., 2001).

Ērču encefalīta slimības gaita ir atkarīga arī no vīrusa apakštīpa, kas to izraisījis. Uzskata, ka Tālo austrumu vīrusa apakštipes izraisa nopietnākus centrālās nervu sistēmas bojājumus un divkārt augstāku letālo slimības iznākumu gadījumu skaitu nekā Rietumu apakštipes (Oschmann et al., 1999). SVA bij. Virusoloģisko izmeklējumu laboratorijas virusologi sadarbībā ar Zviedrijas un Vācijas virusologiem Latvijā konstatējuši visiem trīs vīrusa apakštīpiem piederošus štammus. Latvia 1-96 ir tuvu radniecīgs *Vasilchenko* štamam, un RK1424 ir radniecīgs *Sofjin* štamam (Mavtchoutko et al., 2000; Süß et al., 2002; Lundquist et al., 2001).

Ērču encefalīta vīrusa izmērs ir aptuveni 50 nm diametrā, un tam ir vienpavediena RNS genoms. Genoms satur ap 11 000 nukleotīdiem (10 927 – 11 141, atkarībā no štamma). Ērču encefalīta vīrusam ir trīs galvenie strukturālie proteīni: imunogēnais apvalka glikoproteīns E, ar membrānu saistītais proteīns M un kapsīdas proteīns C. Proteīns C kopā ar RNS veido nukleokapsīdu, vīrusa proteīnu apvalks satur galvenokārt glikoproteīnu E, nobriedušās vīrusa daļiņās – arī proteīnu M, bet nenobriedušās – preM (4. att.).



4. attēls. Flavivīrusu, t.sk. ērču encefalīta, genomiskā struktūra. Genoms kodē 10 proteīnus, no tiem 3 ir strukturālie (C, M un E), un 7 nestrukturālie (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b un NS5). Proteīns prM vīrusa nobriešanas procesā tiek sašķelts, atbrīvojot M, ar enzīma furīna palīdzību (attēls no CDC: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no4/petersenG1.htm>)

Gēnu sekvences, kas kodē strukturālos proteīnus E, M un C, ir lokalizētas vīrusa genoma pirmajā ceturtdaļā, pārējo daļu aizņem nestrukturālās gēnu sekvences (NS). Savukārt nekodējošie reģioni (NCR) ierobežo genomu tā 5'- un 3'- galos (Oschmann et al., 1999). Vīrusa tipēšanai izmanto gan glikoproteīna E kodējošās sekvences, gan arī NCR un NS sekvences.

Eiropā ērcu encefalīta endēmiskajos apgabalos vidēji 0,1-4,5% ērcu ir inficētas ar ērcu encefalīta vīrusu. Aktīvos ērcu encefalīta dabas perēkļos katru gadu tiek reģistrēti vairāki ērcu encefalīta gadījumi. Tomēr šādus reģionus nav iespējams skaidri izdalīt, jo ērces kopā ar vīrusu cirkulē plašos apgabalos kopā ar putniem vai lielajiem zīdītājiem (Nutall et al., 1994). Vācijā reģistrētie epidemioloģiskie dati liecina, ka ap 90% ērcu encefalīta saslimšanas gadījumu izcelsme saistāma ar brīvā laika pavadīšanu (Oschmann et al., 1999).

Rietumu apakštipa vīrusa izraisītā mirstība ir vidēji 0,5-2%, slimības gaita ir vieglāka bērniem, salīdzinot ar pieaugušajiem. Austrumu apakštipam raksturīga divreiz augstāka mirstība.

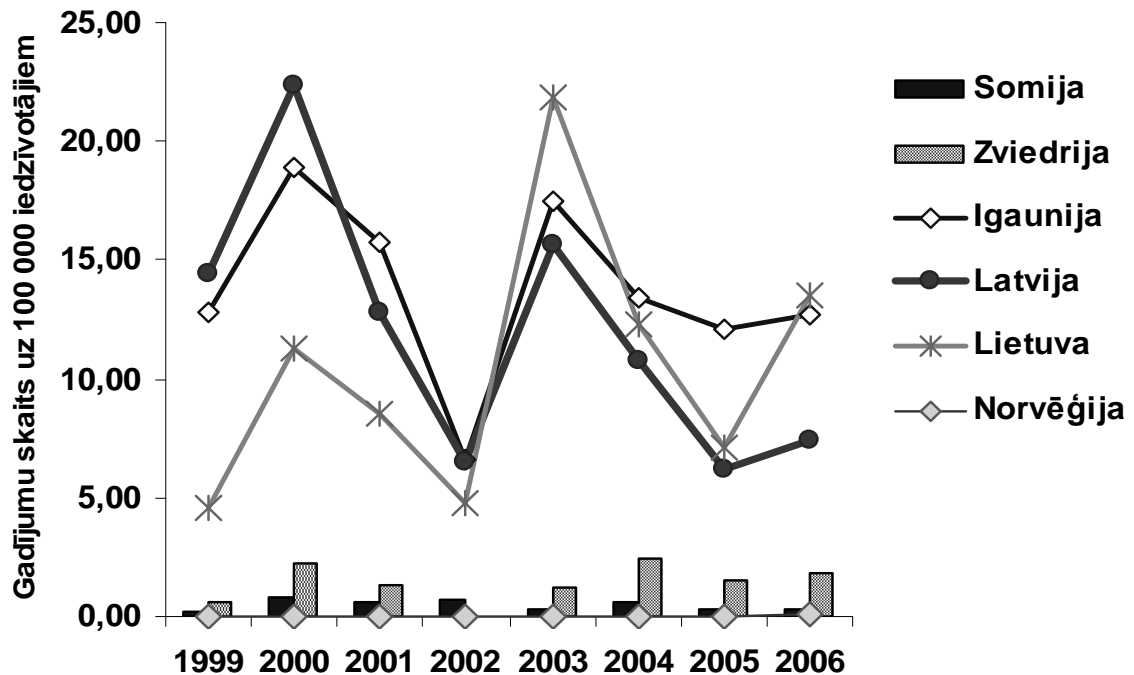
Iekļūstot cilvēka vai dzīvnieka organismā, vispirms vīrusi replicējas lokāli ādas šūnās, pēc tam savairojušies vīrusi pa limfvadiem nokļūst reģionālajos limfmezglos un tālāk asinsritē. Primārās virēmijas fāzē tiek inficētas dažādu audu un orgānu šūnas. Sekundārās virēmijas fāzē (35% pacientu) ērcu encefalīta vīruss iekļūst centrālajā nervu sistēmā (CNS). Smadzenes tiek inficētas pēc vīrusa savairošanās smadzeņu kapilāru endotēlijā šūnās. Inficētās smadzenēs vīrusi izplatās no šūnas uz šūnu, bojājot gan neirus, gan neuroglijas šūnas. CNS infekcija izraisa arī pretreakcijas visā ķermenī, kā arī meningeālo eksudāciju. Smagos gadījumos neironu bojājums ir tik izteikts, ka iespējams arī letāls iznākums (Chin, 2000).

Ērcu encefalīta inkubācijas periods ilgst vidēji no 7 - 14 dienām. Slimība sākas ar gripai līdzīgiem simptomiem - nespēks, galvassāpes, paaugstināta ķermeņa temperatūra (38⁰C), kakla, muskuļu un locītavu sāpes, reizēm arī acu sāpes (Oschmann et al., 1999).

Nākamā slimības stadija parasti sākas pēkšņi, ar spēcīgām galvassāpēm un augstu temperatūru. Iespējamās 3 veidu nervu sistēmas infekcijas manifestācijas: meningīts (raksturīgas galvassāpes, drudzis, kakla stīvums, nelabums, vemšana), encefalīts (raksturīgi apziņas traucējumi, kraniālā nerva parēzes, līdzsvara traucējumi un reiboņi, epileptiski krampji, veģetatīvās regulācijas traucējumi, centrālie elpošanas un cirkulatorās regulācijas traucējumi, koncentrēšanās spēju un atmiņas pasliktināšanās, tremors), meningomielīts vai meningoencefalomielīts (izpaužas ar proksimālām monoparēzēm un paraparēzēm, tetraparēzēm, urinācijas traucējumiem, jušanas traucējumiem u.c).

Saslimstība ar ērcu encefalītu Latvijā atbilstoši Valsts aģentūras "Sabiedrības veselības aģentūra" (SVA) statistikas datiem pēdējo 15 gadu laikā ir bijusi ievērojami augstāka nekā citur Eiropā (5. att.), 1990. gados augstāka arī kā kaimiņvalstīs Igaunijā un Lietuvā. Visaugstākā iedzīvotāju saslimstība ar ērcu encefalītu (1366 saslimušie jeb 53,2 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem) tika reģistrēta 1994. gadā, un kopš šī laika Latvijā reģistrēts ļoti mainīgs ērcu encefalīta gadījumu skaits, apmēram no 140 līdz 1000 gadījumiem gadā. 2005. gadā tika reģistrēts pēdējo 15 gadu laikā viszemākais saslimstības līmenis - 142 ērcu encefalīta gadījumi (6,16 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem), kas atkal pieauga 2006. gadā (170 saslimušie jeb 7,41 gadījumi uz 100

000 iedzīvotājiem). Krasās ērcu encefalīta saslimšanas gadījumu ikgadējās svārstības un tās ietekmējošie faktori pagaidām palikuši neskaidri.



5. attēls. Ērcu encefalīta incidence Latvijā un apkārtējās valstīs. Pēc izdevuma EpiNorth informācijas <http://www.epinorth.org/>

2.4.1.2. Citi patogēnie vīrusi un ar tiem saistītas infekcijas pasaulē

Bunyaviridae dzimtai piederošie **Nairovīrusi** izraisa **Krimas-Kongo hemorāģisko drudzi**. Vīrusu pirmoreiz izolēja 1956. gadā Zairā. Eiropā Krimas-Kongo hemorāģiskais drudzis vai tā izraisītāja klātbūtne konstatēta Albānijā, Bulgārijā, Grieķijā, Ungārijā, Kosovā, Maķedonijā, Krievijā (stepju rajonos), Ukrainā, Portugālē, Turcijā. Slimībai raksturīga augsta letalitāte – ap 30%. Vidējos austrumos un Dienvidēiropā galvenais šīs infekcijas pārnēsētājs ir *Hyalomma marginatum*. Tomēr Moldovā vīruss izolēts arī no *I. ricinus*, *Dermacentor marginatus* un *Haemaphysalis punctata*, bet Grieķijā no *Rhipicephalus bursa* (Chin, 2000; Gratz, 2004)

Bhanja vīruss arī ir *Bunyaviridae* dzimtas vīruss, kas cilvēkiem izraisa neiroloģiskus traucējumus, pazīstams g.k. veterinārijā. Tas izplatīts Dienvidēiropā, Balkānos Āfrikā un Āzijā. Čehijā izolēts no *Dermacentor marginatum* (Hubalek et al, 1988), antivielas pret šo vīrusu konstatētas arī cilvēkiem un mājlopiem, g.k. atgremotājiem. Tā pārnēsētāji ir *Ixodidae* ērces, kas pieder 6 ģintīm (*Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* and *Boophilus*).

Thogoto vīruss pieder *Orthomyxoviridae* dzimtai un plaši izplatīts Āfrikā, konstatēts arī Itālijā (izolēts no *Rhipicephalus bursa* ērces) un Portugālē. Kaut arī tā medicīniskā nozīme pagaidām neskaidra, zināms, ka tas arī izraisa neiroloģiskus traucējumus. **Dhori vīruss** arī pieder šai dzimtai, un līdzīgi kā abi iepriekšminētie vīrusi izraisa neiroloģisku simptomātiku. Dažu dienu ilgām drudža periodam var pievienoties arī encefalopoliradikuloneirīts ar parestēzijām un jutības traucējumiem. Nopietnākie infekcijas gadījumi Eiropā saistīti ar nejaušu inficēšanos laboratorijā.

Vīruss izolēts no *Hyalomma marginatum* Portugālē (Filipe et Casals, 1979), antivielas cilvēkiem konstatētas Portugālē un Krievijā.

Orbivirus dzimtai piederošais **Tribec vīruss** izolēts no *I. ricinus* Slovēnijā, un konstatēts arī Baltkrievijā, Igaunijā, Francijā, Čehijā, Ungārijā, Itālijā, Norvēģijā, Moldovā, Rumānijā, Krievijā un Ukrainā. Medicīniskā nozīme neskaidra, tomēr antivielas pret šo vīrusu konstatētas pacientiem ar CNS infekciju Čehijā (Gratz, 2004).

No *I. ricinus* ērcēm Eiropā izolēti arī **Tettnang** (*Orbivirus* dzimta) un **Eyach** (*Coltivirus* dzimta) **vīrusi**, kuru patogenitāte arī saistīta ar neiroloģiskiem traucējumiem.

Minēto vīrusu pētījumi Latvijā izplatītās ērcēs nav veikti, un ērcu varbūtējā epidemioloģiskā nozīme kā šo vīrusu pārnēsājiem nav konstatēta.

2.4.2. Ērcu pārnests patoģenās baktērijas, riketsijas un protozoa un to izraisītās infekcijas

2.4.2.1. *Borrelia burgdorferi* s.l. komplekss

Borēlijas ir *Spirochaetaceae* dzimtas gramnegatīvas spirālveida baktērijas, kas aug mikroaerofilos apstākļos. *Ixodes* ģints ērces pārnēsā *Borrelia burgdorferi sensu lato* kompleksu, kurā bez trīs cilvēkam patoģenajām sugām - *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* un *B. afzelii* ir vairākas nepatoģenas vai mazpētītas sugas: *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* u.c. (Oschmann et al., 1999). Patoģenās borēlijas savukārt ir sīkāk iedalītas vairākos OspA un OspC serotipos. Šī klasifikācijas sistēma balstās uz borēliju ārējās membrānas divu lipoproteīnu OspA un OspC antigēno heterogenitāti.

Elektronmikroskopiski borēliju šūnas ir ar regulāriem locījumiem un šo izliekumu diametrs ir ap 2,5 μm. Borēlijas garums ir 10-30 μm un platums - 0,2-0,25 μm. Borēliju klāj 2-10 nm biezs amorfs gļotu apvalks, kas tiek saukts S-slānis. Tam seko elastīga trīskārtīga membrāna, kas ieskauj periplazmatisko telpu un endoflagellas. Borēlijas centrā ir protoplazmas cilindrs. Katra endoflagella sastāv no flagellārā filamenta, flagellārā āķa un bazālā diska. Flagellu kontrakcijas rada borēlijām raksturīgās rotējošās kustības. Endoflagellu skaits (3-18) atkarīgs no izolāta ģeogrāfiskās izcelšanās, šūnas fizioloģiskā stāvokļa vai kultūras augšanas apstākļiem (barības vielu daudzuma, pH).

Protoplazmas cilindrs, ko ietver trīskārtīga membrāna, satur nukleoplazmu, ribosomas, DNS-tipa molekulas u.c. struktūras (Oschmann et al., 1999).

Borēlijām ir 1 lineāra plazmīda un līdz 20 lineārām un cirkulārām plazmīdām (minihromosomas). 1997. gadā tika noskaidrota pilnīga borēliju hromosomas gēnu sekvenca, kā arī 9 lineāro un 2 cirkulāro plazmīdu gēnu sekvenca *B. burgdorferi s.s.* un B31 genotipam. *B. burgdorferi s.s.* genomam ir 874 gēni, kas sastāv no 910 724 bp, *B. afzelii* - 894 gēni (905 394 bp), un *B. garinii* - 904 (90 4246 bp).

Infekcijai ar dažādām *B. burgdorferi* s.l. kompleksa sugām ir atšķirīgas klīniskās pazīmes. *B. burgdorferi sensu stricto* vairāk bojā locītavas, *B. garinii* - nervu sistēmu, *B. afzelii* - ādu u.c. (Kurtenbach et al., 1998; Kurtenbach et al., 2002)

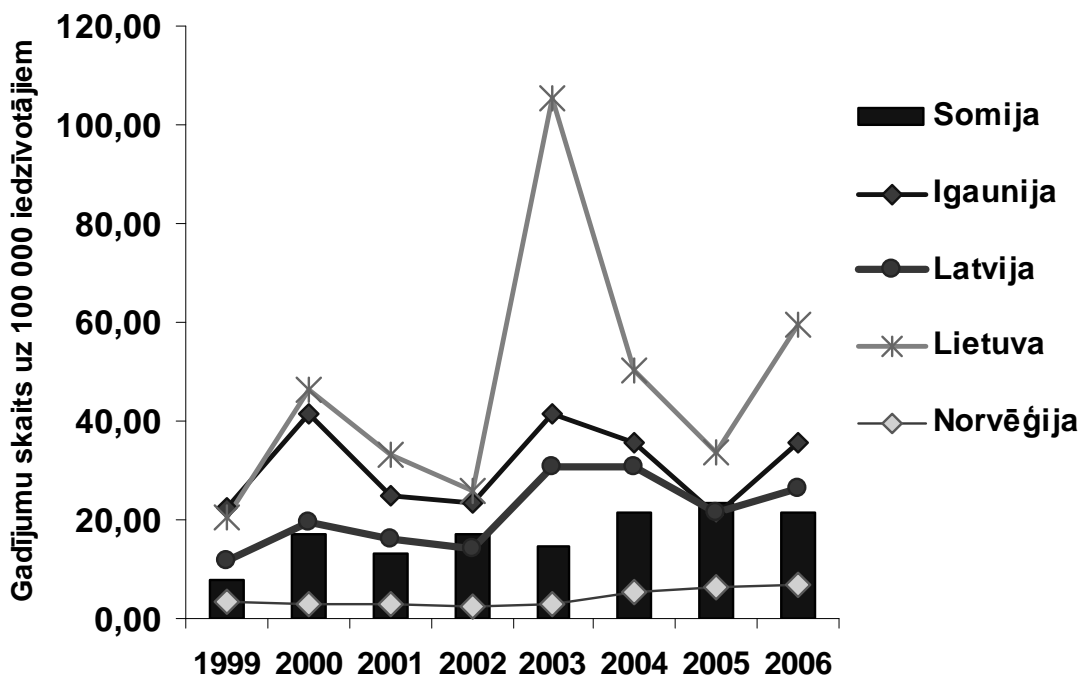
Raksturīgākais Laima boreliožu simptoms - migrējošā eritēma parādās tikai 50% gadījumos, vai retāk. Inkubācijas perioda ilgums ir no 1-40 dienām (biežāk 7-12 dienas). Slimība sākas ar galvassāpēm, nespēku, nelabumu, jutības traucējumiem ērces

koduma vietā, koduma vietā var parādīties eritēma, ķermeņa temperatūra paaugstinās līdz 37,5-38^oC. Drudža periods ilgst 2-7 dienas.

Laimas boreliozēm ir trīs stadijas: 1. stadija – agrīnā infekcijas lokalizācija (3-35 dienas); 2. stadija – agrīnā infekcijas diseminācija – (5-21 nedēļas) un 3. stadija – hroniska infekcija – 5 mēneši līdz vairāki gadi.

Atkarībā no bojātās orgānu sistēmas, boreliozes iedala dermatoboreliozēs, kuru 1. stadijai raksturīga migrējošā eritēma, bet vēlākās stadijās ādas limfocitomam un hronisks atrofisks akrodermatīts; boreliozēs ar kardioloģiskiem bojājumiem, kas pārsvarā parādās 2. stadijā un izpaužas kā sirids blokādes, ritma traucējumi, endokardīti, miokardiopātijas; reimatiskās boreliozēs, kam raksturīgi locītavu bojājumi (artrīti, artralģijas), miozīti; un neuroboreliozēs, kas 1. stadijā izpaužas kā encefalopātija (miega traucējumi, galvas reiboņi, galvassāpes, veģetatīvie traucējumi, astēnija, bailes no gaismas, trokšņa u.c.), bet 3. stadijā parādās meningoradikuloneirīts, kam var pievienoties sejas nerva bojājums, osteohondrozes simptomi u.c.

Saslimstība ar Laima boreliozēm atbilstoši SVA statistikas datiem Latvijā pieauga, sākot ar 1995. gadu, kad tika reģistrēti vidēji 200 saslimšanas gadījumi gadā. Visvairāk saslimšanas gadījumu ar Laima boreliozēm tika reģistrēti 2003. gadā (714 saslimušie jeb 30,62 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem); 2005. gadā gadījumu skaits bija zemāks (493 saslimušie jeb 21,38 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem), tomēr 2006. gadā atkal pieauga (601 saslimušie jeb 26,2 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem). Jāatzīmē, ka triju Baltijas valstu vidū Latvijā pēdējos gados boreliozu saslimstības ziņā atšķirībā no ērcu encefalīta ieņem pēdējo vietu, incidence 2003. un 2004. gadā ir tikai nedaudz augstāka nekā Somijā, tomēr salīdzinot ar Zviedriju un Norvēģiju – ievērojami augstāka (6.att.).



6. attēls. Laima boreliozu saslimšanas gadījumu skaits un incidence Latvijā un apkārtējās valstīs. Pēc izdevuma EpiNorth informācija <http://www.epinorth.org/>

Neskatoties uz kopīgiem abu infekcijas slimību ierosinātāju pārnēsējiem Laima boreliozes un ērcu encefalīta incidences tendences Latvijā atšķiras.

2.4.2.2. *Borrelia recurrentis*

Borrelia recurrentis ir ierosinātājs ērcu atguļas tīfam Eiropā (Gratz, 2004). Globāli šīs infekcijas cēlonis ir vairāk nekā 15 borēliju sugas, tomēr *B. recurrentis* ir saistīta ar augstāku letalitāti. Infekcijas raksturīgs drudzis, sāpes muskuļos, klepus, un kas mijas ar slimības remisijas periodiem. Savlaicīgi ārstējot, letalitāte tomēr diezgan augsta – ap 5%. Primāri *B. recurrentis* pārnēs *Ornithodoros* ģints ērces, Eiropā g.k. *O. hispanica* un *O. erraticus*. Infekcija ir plaši izplatīta Āfrikā, bet Eiropā kopš 1960. gadiem pārsvarā tiek reģistrēti tikai ievesti gadījumi. Pētījumi Vācijā liecina, ka *B. recurrentis* līdzīgas spirohetas konstatētas 3,5% *I. ricinus* ērcēs (Richter et al., 2003). Latvijā ērcu atguļas tīfs nav konstatēts.

2.4.2.3. *Bartonella* sp.

Bartonella sugas (*B. henselae*, *B. alsatica*, *B. vinsonii* u.c.) ir fakultatīvas intracelulāras baktērijas, kas tiek saistītas ar dažādām antropozoonozēm (Jacomino et al., 2002). *B. henselae* pazīstama kā kaķa skrāpējuma slimības, okuloglandulārā sindroma un endokardīta izraisītājs. Šī patogēna rezervuārs ir kaķi, un to galvenais pārnēsētājs ir kaķa blusa (*Ctenocephalides felis*). Tomēr *Bartonella* ģints sugas atklātas arī *Ixodidae* ērcēs gan Eiropā, gan ASV (Sanogo et al., 2003). Latvijā šādi pētījumi nav veikti.

2.4.2.4. *Coxiella burnetii*

Q drudzis ir pasaulē izplatīta zoonoze, ko izraisa *Coxiella burnetii* (*Bacteria*; *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; *Legionellales*; *Coxiellaceae*) – obligāts intracelulārs parazīts. Pirmoreiz šī patogēna izraisīta infekcija tika aprakstīta Austrālijā 1937. gadā. Q drudzim raksturīga augsta temperatūra, kas var ilgt līdz pat trīs nedēļām. Pie komplikācijām pieder hepatīts, pneimonija un endokardīts (Chin, 2000). Letalitāte var sasniegt 1-2%, ja netiek ārstēta. Lielbritānijā un Īrijā tiek reģistrēti 100-200 gadījumi ikgadus, Vācijā – 1-2 gadījumi. Biežāk šī slimība sastopama veterinārijā. Nozīmīgākais Q drudža avots ir liellopi, aitas un kazas, pārnēsētāji – ērces, bieži infekcija tiek pārnēsta arī gaisa pilienu ceļā, kontaktējoties ar slimiem lopiem, un lietojot lopkopības produktus. Slimība biežāk skar lauku iedzīvotājus un fermu strādniekus. Ērces dabā pārnēs ierosinātāju starp dzīvniekiem, t.sk arī peļveidīgajiem grauzējiem un putniem, tā uzturot dabā šīs slimības rezervuāru. Jāatzīmē, ka ierosinātājs vidē saglabājas diezgan ilgi. Eiropā ierosinātājs atklāts *I. ricinus*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* un *Hyalomma* ģints ērcēs (Gratz, 2004). Latvijā reģistrēti atsevišķi Q drudža gadījumi.

2.4.2.5. *Francisella tularensis*

Francisella tularensis izraisa zoonozi ar plašu klīnisko manifestāciju spektru (Chin, 2000). Pirmoreiz ierosinātājs tika aprakstīts 1911. gadā ASV Kalifornijas štatā Tulare grāfistes vāverēs. Ierosinātājs konstatēts dažādās zīdītāju sugām, kā arī posmkājājiem (dunduriem, odiem). Cilvēki ar tularēmiju inficējas, vai nu iekožot inficētai ērcei un citiem asinssūcējiem posmkājājiem, vai arī saskaroties ar inficētiem dzīvniekiem, to produktiem, izstrādājumiem (vilnu, ādām), vai arī ieelpojot ierosinātāju ar putekļiem no inficētas augsnes, dzerot kontaminētu ūdeni. Neārstējot,

infekcijas izraisītie nāves gadījumi var sasniegt 30%. Eiropā galvenais *F. tularensis* pārnēsētājs ir *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *H. concinna*; Krievijā – *Dermacentor nuttalli* (Kugeler et al., 2005).

Latvijā kopš 1984. gada tularēmijas gadījumi vairs netiek konstatēti.

2.4.2.6. *Rickettsia* sp.

Riketsijas (*Bacteria*; *Proteobacteria*; *Alphaproteobacteria*; *Rickettsiales*; *Rickettsiaceae*; *Rickettsieae*) ir obligāti intracelulāri parazīti, kas attīstās mugurkaulnieku šūnās. Riketsijas pārnēsātāji – ērces un blusas. Patogēnās riketsiju sugas izraisa klīnisku saslimšanu ar drudzi, mialģijām, makulopapulāriem izsitumiem un kreveli pārnēsēja koduma vietā.

Boutonneuse drudzi jeb Vidusjūras izsitumu tīfu izraisa *Rickettsia conorii*, ko pārnēs g.k. *Rhipicephalus sanguineus*. Minētā infekcija izplatīta g.k. Āfrikā un Āzijā, kā arī Eiropas Vidusjūras apgabalā. Infekcijai raksturīgs drudzis, nespēks, ģeneralizēti makulopapulozī izsitumi un krevele. Smagākām formām raksturīgs arī encefalīts. Letalitāte ap 2,5% (Giammanco et al., 2005).

R. conorii izplatīta Grieķijā, Francijā, Portugālē, Slovēnijā, Spānijā, Kiprā, Krievijā (Krimā), Turcijā, Bosnijā u.c., kā arī Alžīrijā, Marokā, Tunisijā, Ēģiptē un Izraēlā. Ierosinātājs konstatēts ne tikai *Rhipicephalus*, bet arī *Dermacentor* ģints ērcēs. Vidusjūras apgabalā vidējā *R. conorii* infekcijas incidence ir 50 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem gadā (Gratz, 2004), Viduseiropā gadījumi saistīti g.k. ar suņiem piesūkušos inficētu *Rhipicephalus sanguineus* ērcu ieviešanu no Dienvideiropas (Colomba, 2006).

Rickettsia helvetica pirmo reiz tika izolēta *I. ricinus* ērcēm Šveicē 1979. gadā, un kopš tā laikā vairākkārt konstatēta arī Francijā, Zviedrijā, Itālijā, un pēc tam arī citās Eiropas valstīs. *Rickettsia slovaca* pirmoreiz izolēta no *Dermacentor marginatus* ērcēm Slovākijā 1968. gadā, un saistīta ar febrilu saslimšanu (Gratz, 2004). Tā konstatēta ne tikai *Dermacentor* ģints ērcēs, bet arī *I. ricinus* ērcēs. Infekcijai raksturīgs drudzis, galvassāpes, reiboņi, mialģijas, palielināti limfmezgli, izsitumi, astēnija, un eritēma, kā arī lokāla matu izkrišana ērces koduma vietā galvā. *R. slovaca* ir plaši izplatīta Eiropā, un reālais riketsiožu skaits, kas saistāms ar šo infekciju, varētu būt ievērojami lielāks nekā literatūrā aprakstītie gadījumi.

Latvijā šādi pētījumi ērcēs nav veikti.

2.4.2.7. *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. un *Neorickettsia* sp.

Anaplazmozes un ērlihiozes ir zoonozes, ko izraisa *Anaplasma*, *Ehrlichia* un *Neorickettsia* ģints sugas. Atbilstoši NCBI informācijai *Anaplasma* ģintī ir sekojošas sugas - *A. bovis*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. platys* (ar vairākām pasugām), un *A. phagocytophilum* grupas sugas (ietver rindu apakšsugu: *A. phagocytophilum*, *Anaplasma* sp. “South Africa dog-1076”, *Anaplasma* sp. “South Africa dog-1108”, *Anaplasma* sp. “South Africa dog-1245”, *Ehrlichia* sp. “Baden”, *Ehrlichia* sp. “China”, *Ehrlichia* sp. “Frankonia 1”, *Ehrlichia* sp. “Frankonia 2”, *Ehrlichia* sp. “LGE agent”, *Ehrlichia* sp. Long Point, *Ehrlichia* sp. Okinawa-RS21, *Ehrlichia* sp. Okinawa-RS3).

A. phagocytophilum ir 0,2–2 mikrometri liela obligāti aeroba gramnegatīva baktērija, kas replicējas saimnieka šūnas vakuolā un veido mikrokoloniju - morulu.

Mikrokolonijas diametrs ir 2-7 mikrometri diametrā un tās var atklāt ar Romanovska krāsojumu. (Dumler et al., 2001)

E. chaffeensis ultrastrukturālie izmeklējumi liecina, ka tās šūnas iekšējie un ārējie apvalki ir vienāda biezuma, atšķirībā no riketsijām, kam šūnapvalka iekšējais slānis ir biežāks (Carlyon et Fikrig, 2003; Munderloh et al., 2003). Baktērijām raksturīgs pleomorfisms; sastopamas lielas, vieglas formas (0,8-1,5 μm) šūnas ar vienmērīgi izkliedētiem nukleoīdu filamentiem un ribosomām, un sīkas, blīvas formas (0,2-0,4 μm) ar šo organellu centrētu kondensāciju. Eksistē arī anomālas gigantiskas un multilobāras ērlihiju formas. Ērlihijas un anaplazmas ir obligāti iekššūnu parazīti, kas replicējas arī ērcu šūnās. Tās iekļūst pārnēsēja vai saimnieka šūnās fagocitozei līdzīgā ceļā.

A. phagocytophilum raksturīgs neitrofilu tropisms. Pēc piesaistīšanās cilvēka neitrofilu specifiskajiem molekulārajiem determinantiem, anaplazmas izmanto atšķirīgus mehānismus, lai padarītu saimnieka šūnas vidi piemērotu eksistencei. Tās represē NADPH oksidāzi, lai nepieļautu O₂⁻ negatīvo ietekmi, un aizkavē neitrofilu apoptozi (Carlyon et Fikrig, 2003).

Šie patogēni parazītē zīdītāju asinsrades sistēmas šūnās (leikocītos, eritrocītos un trombocītos) un endotēlija šūnās. Atkarībā no ierosinātāja mērķšūnām, ērlihiози mēdz iedalīt monocitārā vai granulocitārā ērlihiozē. Pirmie apraksti par šo infekciju parādījās pagājušā gadsimta sākumā, 1910. gadā, kad A. Teilers aprakstīja pasaulē izplatītas liellopu slimības izraisītāja *Anaplasma marginale* pētījumus Dienvidāfrikas liellopu eritrocītos (Theiler, 1910). 1933. gadā tika aprakstīta aitū drudža ierosinātājs *Ehrlichia phagocytophila* (tagad sauc *Anaplasma phagocytophilum*) (MacLeod et Gordon, 1933), bet 1935. gadā tika aprakstīta suņu monocitārās ērlihiozes izraisītājs *Ehrlichia canis* (Donatien et Lestoquard, 1935). Vēlāk aprakstīja arī citas veterinārās saslimšanas, kuru cēlonis bija ar ērcu kodumu pārnestās ērlihijas (Anziani et al., 1990; Rikihisa, 1991). 1945. gadā šīs baktērijas tika apvienotas *Ehrlichia* ģintī.

Japānā pirmoreiz aprakstīja cilvēka inficēšanos ar ērlihijām (*Ehrlichia sennetsu*) 1953. gadā (Miaso et Kobayashi, 1955). Amerikas Savienotajās Valstīs pirmo ērlihiozes gadījumu cilvēkam reģistrēja 1986. gadā (Fishbein et al., 1987). Sākotnēji pacienta asins serumā konstatēja antivielas pret *E. canis*, kura izraisa monocitāro ērlihiози suņiem (Maeda et al., 1987). Taču patieso infekcijas ierosinātāju konstatēja vēlāk, 1990. gadā (Dawson et al., 1991), un tas tika nosaukts par *Ehrlichia chaffeensis* - cilvēka monocitārās ērlihiozes (CMĒ) ierosinātāju (Anderson et al., 1991). Pirmais cilvēka granulocitārās ērlihiozes (CGĒ) gadījums tika aprakstīts ASV 1994. gadā un to izraisīja *Anaplasma phagocytophilum* (Bakken et al., 1994; Chen et al., 1994). Pirmais cilvēku saslimšanas gadījums ar ērlihiози Eiropā tika reģistrēts Portugālē 1990. gados.

2001. gadā tika ieviestas korekcijas ērlihiju un anaplazmu taksonomijā. Pēc 16S rRNS, *groESL* un citu gēnu radniecības pakāpes ērlihijas iedalīja *Anaplasma*, *Ehrlichia* un *Neorickettsia* ģintīs *Anaplasmataceae* dzimtā (Dumler et al., 2001).

Anaplasma phagocytophilum (agrāk lietotie nosaukumi un sinonīmi pēc NCBI datu bāzes: *Cytoecetes bovis*, *Cytoecetes phagocytophila*, *Rickettsia phagocytophila*, *Rickettsia phagocytophila ovis*, *Ehrlichia phagocytophila*, *HGE agent*, *Ehrlichia* sp. 'HGE agent', *Ehrlichia equi*, "Cytoecetes bovis", "Cytoecetes phagocytophila", "Rickettsia phagocytophila" "Rickettsia phagocytophila ovis", *Ehrlichia phagocytophila*, *Anaplasma phagocytophila*, *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler et al. 2001), *Ehrlichia* sp. BDS, *Ehrlichia* sp. NCH-1) vairojas granulocitāros

leikocītos, izraisot granulocitāro ērlihiozi, un ir izplatīta gan Eiropā, gan Amerikā. Patogēns vai antivielas pret to konstatētas daudzu sugu zīdītājos un putnos (Parola et al., 2005). Tās pārnēsēji Eiropā galvenokārt ir *I. ricinus*, Krievijā un Ķīnā - *I. persulcatus*, ASV – *I. scapularis* un *I. pacificus*, Japānā – *I. persulcatus*, *I. ovatus*. ***Anaplasma marginale*** izraisa liellopu anaplazmozi un rada lielus zaudējumus lopkopībai tropu un subtropu zonas valstīs. *A. marginale* izraisītie simptomi liellopiem ir drudzis, anēmija, svāra zudums, ikteruss, bieži ir nāves vai ilgstošas persistējošas infekcijas cēlonis. Persistējoša infekcija var ilgt aptuveni septiņus gadus vai pat visu lopa dzīvi ar atkārtotiem riketsiēmijas cikliem. Persistenti inficētie liellopi kalpo par šī ierosinātāja rezervuāru dabā (Theiler, 1910; Fuente et al., 2002). ***Anaplasma platys*** (agrākā *Ehrlichia platys*) ir pasaulē izplatīts suņu cikliskās trombocitopēnijas ierosinātājs, un to pārnēs g.k. *Rhipicephalus sanguineus* (Dumler et al., 2001). ***Ehrlichia ruminantium*** (agrākā *Cowdria ruminantium*) izraisa kardioloģisku infekciju (heartwater) liellopiem un sīklopiem. *E. ruminantium* izplatīta Āfrikā, un pārnēsējs ir g.k. *Amblyomma* ģints ērces (Dumler et al., 2001). ***Ehrlichia canis*** izraisa monocitāro ērlihiozi suņiem un pirmoreiz tika aprakstīta 1935. gadā Alžīrijā saistībā ar masveidīgu infekciju dienesta suņiem. ***Ehrlichia chaffeensis*** ir Amerikā un Āfrikā izplatīts monocitārās ērlihiozes ierosinātājs cilvēkiem, suņiem un briežiem. Par šī ierosinātāja sastopamību Eiropā nav informācijas (Anderson et al., 1991; Dumler et al., 2001).

Ehrlichia muris pirmoreiz atklāts 1995. gadā Japānā grauzējos, pēc tam arī briežos, mežacūkās un suņos. *E. muris* pelēm izraisa splenomegāliju, limfadenopātiju, anoreksiju un mazkustīgumu, tās patogenitāte uz pārējām zīdītāju sugām pagaidām nav noskaidrota. Japānā veiktie pētījumi liecina, ka antivielas pret šo ērlihiju atklātas arī cilvēkam, tomēr tā epidemioloģiskā nozīme pagaidām neskaidra. *E. muris* izplatīts galvenokārt Japānā un Krievijā. *E. muris* pārnēsējs ir *Haemaphysalis* un *Ixodes* ģints ērcu sugas (Kawahara et al., 1999; Shpynov et al., 2004).

1997. gadā Zviedrijas pētnieki pirmie Eiropā konstatēja ērcu inficētību ar *A. phagocytophilum* grupu, aptuveni 6% ērcu konstatējot anaplazmu DNS (Liz et al., 2000). Skotijā ērcu inficētība ar anaplazmām bija 0,25-2%, Anglijā nimfām konstatēta 1,4% inficētība, bet pieaugušām ērcēm, kas vāktas mežos, 6%, savukārt ērcēm, kas vāktas augstienēs - 9% (Jorge et al., 2000). Francijā anaplazmu DNS konstatēta 1,3% ērcēm, bet Slovēnijā, kur tika aprakstīts pirmais cilvēku granulocitārās ērlihiozes gadījums Eiropā, - 3,2% (Petovec et al., 1999). Šveices zinātnieku atklātā *Ixodes ricinus* ērcu inficētība ar anaplazmām liecina, ka šai valstī 1,2% ērcu inficētas ar *Anaplasma phagocytophilum*. Vienlaicīga inficētība ar ērlihijām un *Borrelia afzelii* Šveicē konstatēta 8,1% pieaugušām *Ixodes ricinus* ērcēm (Pusterla et al., 1998).

Augsts ērcu inficētības līmenis ar anaplazmām atklāts Itālijas centrālajā daļā, kur nimfām konstatēta 24,4% inficētība (Cinko et al., 1997). Imago inficētība ar ērlihijām bija tikai 4,2% (Jorge et al., 2000). Polijā *A. phagocytophilum* DNS klātbūtni noteica ērcēs un seroprevalenci mežstrādniekos (Tomasiewicz et al., 2004). Vidēji 20,6% no pārbaudītajiem mežstrādniekiem bija seropozitīvi. 13% ērcu bija inficētas ar *A. phagocytophilum*. Ērcu mātīšu inficētība bija – 45,7%, tēviņu – 4,5%, un nimfu – 0,9%. Nīderlandē 46% no briežiem noņemtām ērcēm saturēja *Anaplasma phagocytophilum* un citus ērlihijām līdzīgus organismus (Schouls et al., 1999).

Austrijā 2004. gadā, pārbaudot 880 savvaļā savāktu *Ixodes* ērcu inficētību, 8,7% pieaugušo ērcu un 5,8% nimfu tika konstatēta *Anaplasma phagocytophilum* klātbūtne (Polin et al., 2004). Konstatētā ērcu mātīšu inficētība bija nedaudz augstāka (10,9%)

nekā tēviņu inficētība (6,7%). Līdzīgi kā citu ērcu pārnesto patogēnu konstatācijas gadījumos, augstāka ērcu inficētība tika reģistrēta pavasarī un rudenī (ap 6%), ērcu paaugstinātas aktivitātes periodā, nevis vasarā (3,6%). Savukārt Austrijas stirnās (to audos) konstatētā *A. phagocytophilum* klātbūtne procentuāli bija nesalīdzināmi augstāka – 43%. Austrijā agrāk veiktie pētījumi liecina, ka briežu inficētība ar anaplazmām ir pat vēl augstāka – 74%. Tomēr jāatzīmē, ka citos meža dzīvniekos - zaķos, mežacūkās - anaplazmas netika konstatētas vispār (Jorge et al, 2000).

Z-Āfrikā, Marokā un Tunisijā, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus* un *Hyalomma* ērcēs noteica inficētību ar *Anaplasmataceae*. *I. ricinus* – 16,3% pozitīvas ar *Ehrlichia* spp, kamēr to nimfas –3,4%, un kāpuri – 2,8% (Sarih et al., 2005).

Portugālē 4% nimfu inficētas ar *A. phagocytophilum* (Santos et al., 2004) ASV konstatētā inficētība tur sastopamajām sugām *I. scapularis* un *I. pacificus* parasti ir augstāka. ASV austrumdaļā *I. scapularis* ērcu inficētība atsevišķās vietās variē no 7,6-53% pieaugušām ērcēm un 1,5-20,6% nimfām. ASV vienlaicīga ērcu inficētība ar abiem ierosinātajiem konstatēta pieaugušām ērcēm 4-28% gadījumu, bet nimfām -1,6-4,8% gadījumos (Jorge et al., 2000).

Ģenētiskās īpatnības. *Anaplasma phagocytophilum* dažādajiem variantiem, kas izplatīti pasaulē, novērota ievērojama seroloģiska krosreaktivitāte, kā arī salīdzinoši zemākā variācijas pakāpe 16S rRNS, *groESL*, *gltA*, *ank* un *msp2* gēnos. 99,5% identitāte jeb atšķirība līdz 5 nukleotīdiem konstatēta 16S rRNS gēnā un 99% - *groESL* gēnā. G+C saturs sekvenētajos gēnos ir 41mol%. *A. phagocytophilum* ārējais galvenais antigēniskais virsmas proteīns P44 jeb MSP4 tiek kodēts no multigēnu dzimtas, ir ekspresēts *A. phagocytophilum* virsmas membrānā, un tas līdzīgs citu anaplazmu un ērlihiju sugu galvenajiem imunodominantajiem virsmas proteīniem, kā *Anaplasma marginale* MSP2 un MSP4, un *Ehrlichia ruminantium* MAP1 (Brayton et al., 2005; Bekker et al., 2005). Iespējams, ka šie MSP ir iesaistīti saikmnieka-patogēna mijiedarbības procesos un var iesaistīties ātrāk nekā citi nukleārā gēna proteīni. Ir zināma atšķirība starp dažādu ģeogrāfisko vietu *A. phagocytophilum* genosugām. ASV veiktie *ank* gēna (kodē strukturālo proteīnu) pētījumi liecina, ka Ziemeļamerikas genosugas var iedalīt 2 lielās grupās - vidusrietumu un ziemeļaustrumu, un tās atšķiras no Eiropas genosugām.

Ērcu stadiju maiņā anaplazmas netiek nodotas, tādēļ, lai patogēns saglabātos, ir nepieciešama ilgstoša tā persistence saimniekā. Infekcijas laikā vienlaicīgi parādās *msp2* un *msp3* varianti, kas palielina virsmas apvalka antigēno variabilitāti (Barbet et al., 2003)

Klīniskās pazīmes un saslimstība

Cilvēkiem anaplazmas un ērlihijas izraisa atšķirīga smaguma klīnisko slimības gaitu - no vieglas asimptomātiskas infekcijas līdz smagai letālai infekcijai. Cilvēku granulocitārā un monocitārā ērlihioze klīniski ir samērā līdzīga, īpaši agrīnās stadijās. Inkubācijas periods abām formām vidēji ilgst 7-10 dienas, bet iespējams arī no 1 līdz 21 dienai.

Cilvēku *granulocitārā ērlihioze* (anaplazmoze) parasti sākas kā jebkura infekcija - ar drudzi, drebuļiem, galvassāpēm un sāpēm muskuļos pēc ērces koduma ar inkubācijas periodu vidēji 8 dienas (Dumler et Bakken, 1998). Iespējami arī gastrointestināli traucējumi, respiratori simptomi un centrālās nervu sistēmas iesaiste. Izsitumi mēdz būt reti. Laboratoriskos izmeklējumos pirmās slimības nedēļas laikā atrod leukopēniju, trombocitopēniju un paaugstinātu C-reaktīvā proteīna un

transamināžu līmeni, kas liecina par vieglu aknu bojājumu. Normālais leukocītu skaits atjaunojas slimības otrās nedēļas laikā, pat ja netiek veikta terapija. Tomēr galvenā klīniskā pazīme ir neitrofilu un kaulu smadzeņu cilmes šūnu infekcija. Monocītu infekciju HGE pacientiem atklāj reti, vienreiz atklāta baktērijas klātbūtne makrofāgā. Parasti infekcija beidzas bez speciālas ārstēšanas, tomēr smagas komplikācijas iespējamās pat līdz 16% gadījumu un tām raksturīgs ilgstošs drudzis, šoks, pneimonīts, akūta nieru mazspēja, hemorāģijas un nāve (aptuveni 5% gadījumos). Meningīts un meningoencefalīts HGE gadījumā novērots reti (Carlyon et Fikrig, 2003). Uzskata, ka vairumā gadījumu infekcija norit vieglā formā un paliek nediagnosticēta (Dumler et Walker, 2001).

Liellopiem un sīklopiem *A. phagocytophilum* infekcija izraisa tādus simptomus, kā stiprs drudzis, samazināts izslaukums, anoreksija, depresija, klepus, iesnas, diareja, aborts un mastīts (Bown et al., 2003). Zirgiem raksturīgs drudzis, depresija, anoreksija, kāju lejasdaļu tūska, petehijas, dzelte, mazkustīgums, bet suņiem un kaķiem - drudzis, letarģija, anoreksija, trombocitopēnija, neitrofilija un limfopēnija.

Cilvēku *monocitārās ērlihiozes* gadījumā inkubācijas periods ir 7-14 dienas, un slimība sākas līdzīgi kā granulocitārās ērlihiozes gadījumā. Infekcijai raksturīgs drudzis, galvassāpes, mialģija, anoreksija, nelabums, vemšana, klepus, faringīts, limfadenopātija, iespējamās sāpes vēderā un apjukuma stāvoklis. Slimības gaita salīdzinoši ir smagāka, un 40-69% slimniekiem nepieciešama hospitalizācija, jo biežākā klīniskā pazīme ir nervu sistēmas infekcija (meningoencefalīts) (Bown et al., 2003; Dumler et Walker, 2001). Aptuveni 36% gadījumu novērojami makulopapulāri, petehiāli vai eritematozi izsitumi, īpaši bērniem (Dumler et Walker, 2001, Dumler et Bakken, 1998), kas lokalizēti uz rumpja, kājām, rokām. Laboratoriskos izmeklējumos parādās leukopēnija, trombocitopēnija un paaugstinātas aknu transamināzes. Reizēm novērojama hepatomegālija. Smagos gadījumos iestājas respiratorā un nieru nepietiekamība, toksiskā šoka sindroms un nāve, neskatoties uz antibiotiku terapiju (2-7% gadījumos).

Suņu monocitārai ērlihiozei, ko suņiem izraisa *Ehrlichia canis*, raksturīgs drudzis, depresija, anoreksija, svara zudums, hemorāģijas, gastrointestinālas pazīmes (vemšana un diareja), respiratori traucējumi un okulāras pazīmes. Laboratoriski atrod trombocitopēniju, leukopēniju, anēmiju un hipergammaglobulinēmiju (Aguirre et al., 2004). *A. marginale* izraisītie simptomi liellopiem ir drudzis, anēmija, svara zudums, ikteruss, bieži nāve, vai arī – ilgstoša persistējoša infekcija (~7g, vai visu dzīvi) ar riketsiēmijas cikliem. Infekcija var būt persistējoša visu lopa mūžu, kas kļūst ierosinātāja rezervuāru (Kocan et al., 2003).

Arī Latvijā kopš 2001. gada tiek reģistrēti atsevišķi ērlihiožu (anaplazmožu) gadījumi. Sakarā ar *Anaplasmataceae* dzimtas patogēnu pieaugošo nozīmi Eiropā un citviet pasaulē arī mūsu valstī Biomedicīnas studiju un pētījumu centrā tika uzsākti šīs dzimtas patogēnu pētījumi ar mērķi noskaidrot to sastopamību un ģeogrāfisko izplatību.

2.4.3. Protozoa

2.4.3.1. *Babesia* sp.

Babezioze ir cilvēkiem salīdzinoši nesen atklāta ērcu pārnesta zoonoze, ko izraisa *Babesia* ģints eritrocītu protozoa parazīti - piroplazmas. Tās ir *Apicomplexa*

klases eikarioti, kas pieder *Piroplasmida* rindai, *Babesiidae* dzimtai, *Babesia* ģintij. Pazīstamākās šīs ģints sugas ir *Babesia divergens*, *B. microti*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. felis*, *B. rossi*, *B. canis*, *B. major*, *B. bicornis*, *B. caballi* u.c. (atbilstoši NCBI informācijai). Pirmais dokumentētais babeziozes cilvēku saslimšanas gadījums reģistrēts 1956. gadā bijušajā Dienvidslāvijā kādam aspleniskam fermerim. Kopš šī laika simti cilvēku saslimšanas gadījumi reģistrēti ASV, un vairāki desmiti – Eiropā (Herwaldt et al., 2003).

Kā cilvēku patogēni visbiežāk konstatētas trīs sugas: *Babesia divergens*, *Babesia microti* un *Babesia bovis* (Homer et al., 2000), tomēr pasaulē atklātas vairāk nekā 100 *Babesia* sugas. Atklātas arī citas cilvēkiem patogēnas *Babesia* ģints piroplazmas - WA1, MO1 un CA1. Slimība īpaši smagi skar vecāka gadagājuma un imunokompromisētus pacientus, kā arī splenektomizētus pacientus. Veseliem cilvēkiem babezioze parasti norit vieglā vai pat asimptomātiskā formā. Eiropā babezioze nav bieži sastopama, tomēr gadījumi reģistrēti daudzās valstīs – bij. Dienvidslāvijā, Īrijā, Francijā, Portugālē, Krievijā, Šveicē, un Lielbritānijā. Splenektomiskie pacienti sastāda 86% no kopējā gadījumu skaita. Klīniski slimība izpaužas ar pēkšņu sākumu ar augstu drudzi, drebuļiem, galvassāpēm, miaļģijām, un dzelti, ko izraisa intravaskulāra hemolīze. Letalitāte ir ļoti augsta – līdz 50%, un ārstēšana maz palīdz splenektomizētiem pacientiem. Babezioze ir veterinārijā labi pazīstama infekcija – suņu banbeziozi izraisa *B. canis*, un *B. gibsoni*, aitu – *B. motasi*, un liellopu slimības izraisa g.k. *B. bigemina*, *B. bovis* un *B. divergens* (Patarapadungkit et al., 2004). *Babesia bovis* ir izplatīts patogēns veterinārijā. Babēziju sporozoīti ērces piesūkšanās laikā tiek inokulēti saimniekdzīvniekā (govī), kur attīstas par merezoītiem. Eritrocītiem sabrūkot, merezoīti atbrīvojas un invadē nākamos eritrocītus. Atkārtoti parazitēšanas cikls izraisa ievērojamu eritrocītu zudumu, tādēļ slimībai raksturīga anēmija, stress un vājums, kas lopiem bieži beidzas letāli. Bieži dzīvnieki inficējas persistenti un kļūst par parazitā nēsātājiem.

Babēzijas biežāk konstatētas *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. trianguliceps*, *I. hehagonus*) un *Dermacentor* (*D. reticulatus*, *D. marginatus*) ģints ērcēs. Eiropā visbiežāk reģistrēti smagākie liellopos parazitējošās *B. divergens* izraisīti saslimšanas gadījumi, īpaši splenektomizētiem pacientiem, un šo sugu pārnēs *I. ricinus*. Arī Lielbritānijā galvenais *B. microti* pārnēsētājs ir *I. ricinus*.

Ixodes scapularis pārnēsā ar grauzējiem saistītā patogēna *Babesia microti* izraisīti saslimšanas gadījumi dominē Ziemeļamerikā. Konstatēta zināma saistība (Spielman, 1994) starp babeziozes gadījumu parādīšanos ASV un Eiropā, un briežu populācijas atjaunošanu mērenajā zonā. Jāatzīmē, ka *B. microti* gan Amerikā, gan Eiropā ir konstatēta daudzām peļveidīgo grauzēju sugām (Homer et al, 2000).

Pētījumi, kas veikti ASV liecina, ka 3-8% asinsdonoriem konstatēta seroprevalence pret *B. microti*. ASV reģistrētā mirstība ar *B. microti* reģistrēta aptuveni 5% gadījumos, bet Eiropā (g.k. Francijā un Lielbritānijā), saistībā ar *B. divergens* infekciju, pat 42%. Atsevišķi babeziožu gadījumi reģistrēti arī Āzijā un Āfrikā. Pasaulē reģistrēti arī atsevišķi ar asinspārliešanu saistīti babeziožu gadījumi, asinsdonoriem esot asimptomātiskiem nēsātājiem.

Babēzijas un tām radniecīgajām teļerijām ir trīs reproduktīvas attīstības stadijas – gametogonija, kas norit iksodu ērcu viduszarnā, un pārējās bezdzimumvairošanās stadijas: sporogonija – sporozoītu veidošanās ērcu siekalu dziedzeros, un merogonija – merezoītu veidošanās saimniekdzīvniekā (Homer et al, 2000). Noteikts, ka ērces

siekalu dziedzeros var atrasties vairāki tūkstoši sporozoītu, kas tiek ievadīti saimniekdzīvniekā. *B. divergens* var tikt pārnesta arī transovariāli.

Babeziozes inkubācijas periods cilvēkiem variē no 1-6 nedēļām, bet var ilgt pat trīs mēnešus. Galvenie slimības simptomi ietver drudzi ar augstu temperatūru, mialģijas, nespēku, svara zudumu, anēmiju, nelabumu, novēro arī hepatomegāliju un splenomegāliju. Slimība biežāk raksturīga asplēniskiem, novājinātiem vai gados veciem pacientiem. Pie laboratoriskām atradēm pieder paaugstināts transamināžu un bāzisko fosfatāžu līmenis, nekonjugēts bilirubīns un pienskābes dehidrogenāze serumā, normocitiskā anēmija, trombocitopēnija, un nereti leukopēnija.

Gan cilvēki, gan dzīvnieki var būt babeziožu hroniski asimptomātiski nēsātāji (Conrad et al., 1991) Hroniski inficētiem mājdzīvniekiem suņiem novēroti paaugstināti antivielu titri, kā arī citas pazīmes – aknu un nieru traucējumi. Asimptomātiska nēsāšana var ilgt dažus gadus, bet var turpināties arī visu dzīves laiku, periodiski atkārtojoties parazitērijas recidīviem. Arī grauzējiem raksturīga hroniska *B. microti* nēsāšana, kas uztur šī parazīta transmisijas ciklu dabā.

Pilnībā sekvencēts *Babesia bovis* 9 Mb lielais genoms Sangera institūta vadībā (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bovis/).

Statistikas dati neliecina, ka Latvijā šī slimība jebkad būtu bijusi reģistrēta. Lai noskaidrotu saslimšanas risku, tika uzsākti babēziju molekulārie pētījumi ērcēs.

2.4.3.2. *Theileria* sp.

Šai pašai *Apicomplexa* klasei un *Piroplasmida* rindai pieder arī pagaidām veterinārijā vairāk pazīstamie *Theileriidae* dzimtas piroplazmas: *Theileria* sp. Kudu, *Theileria* sp. Sable, *Theileria bicornis*, *T. annulata*, *T. buffeli*, *Theileria* sp Buffalo, *T. mutans*, *T. parva*, *T. taurotragi*, *T. velifera*, *T. equi*, *T. lestoquard* u.c.

Teilērijas ir ērcu pārnesti protozoa parazīti, kas, attīstoties leukocītos un eritrocītos, atgremotājiem izraisa smagas infekcijas (Nijhof et al., 2005). Atšķirībā no babēzijām, kas izraisa saslimšanu eritrocītu sabrukšanas dēļ, ar teilērijām saistītās infekcijas pazīmes izraisa parazītu attīstība leukocītos (Homer et al, 2000). *Theileria* ir līdzīgs attīstības cikls: ērces sūcot asinis, uzņem piroplazmas, kas pēc dzimumvairošanās cikla ērcu zarnu traktā migrē uz siekalu dziedzeriem (Parola et Raoult, 2001). Ērci piesūcoties, tiek iniciēta sporogonija, sporozoīti nokļūst siekalu dziedzeros un tiek ievadīti saimniekdzīvniekā. Atšķirībā no babēzijām teilēriju galvenās mērķšūnas ir saimnieku limfocīti. Veterinārijā pazīstamā *T. parva*, kas liellopiem izraisa Rietumkrasta drudzi, izraisa T-šūnu proliferāciju, savukārt *T. annulata* (tropiskās teileriozes izraisītājs) primāri inficē B-šūnas un makrofāģus (Homer et al., 2000; Nijhof et al., 2005) Limfocītos tiek novēroti atkārtoti šizogonijas cikli. Attīstas arī mazāks skaits merezoītu, kas savukārt tālāk inficē eritrocītus un kļūst par piroplazmām, kas tālāk nonāk ērcēs, lai turpinātu ciklu. Inficētiem dzīvniekiem attīstās limfomai līdzīga slimība un vairums lopu nobeidzas dažu nedēļu laikā. *T. parva* Āfrikas kontinentā pārnēsā ērce *Rhipicephalus appendiculatus* *T. parva* izraisītā infekcija rada lielus zaudējumus mājlopu vidū, g.k. Āfrikas austrumu un dienvidu daļā. *T. parva parva* izraisa Austrumu Krasta drudzi (*East Coast Fever*), bet *T. parva lawrencei*, tā saukto koridora slimību (*Corridor disease*) mājlopiem atgremotājiem. Austrumu krasta drudzis parasti izraisa 90% nāves gadījumu uzņēmīgu lopu vidū. Endēmiskos rajonos slimības gaita ir vieglāka, un lopi bieži to pārslimo subklīniskā formā. Slimībai raksturīgs stiprs drudzis, limfadenopātija, plaušu edēma un

novārgums, attīstas smaga panleikopēnija. Terminālās slimības stadijas laikā novērojama dispneja un klepus. Mājlopi izveseļojas vai nobeidzas 5-25 dienu laikā. Tropiskai teileriozei simptomi līdzīgi, bez tam raksturīga arī anēmija un dzelte. Smagām formām, piemēram, zirgu infekcijai, ko izraisa *T. equi*, raksturīga arī hepato- un splenomegālija, kā arī limfadenopātija.

T. annulata lopiem izraisa t.s. Vidusjūras krasta drudzi Ziemeļāfrikā, Tuvajos Austrumos, Dienvidēiropā un Centrālāzijā. *T. mutans* ir ļoti plaši izplatīta, un pārsvarā izraisa salīdzinoši vieglas formas slimību. *T. lestoquardi* un *T. ovis* ir pazīstams kā aitu parazīts, un izplatīts Ziemeļāfrikā, Dienvidēiropā un Āzijā (Nijhof et al., 2005).

Minētā patogēna pētījumi Latvijā tika uzsākti līdz ar babēziju izpēti ērcēs.

2.4.4. Ērcu neirotoksīns (ērcu paralīzes)

Iksodīdu ērcu pārnestā paralīze jeb toksikoze pirmoreiz tika novērota 1824. gadā, kad pētnieks Hovels devās uz Melburnu Austrālijā un pieminēja to savās ceļojuma piezīmēs (Grattan-Smith et al., 1997). Ērces izraisīta cilvēku ģeneralizētā paralīze sākotnēji tika reģistrēta Kanādā un Austrālijā 1912. gadā. Ērcu paralīze ir akūta ascendējoša flacidālā motorā paralīze, visbiežāk novērota jaunām meitenēm (Vedanarayanan et al., 2004) un var būt arī letāla, ja ērce laicīgi netiek noņemta. Novērots, ka paralīze sākas ne uzreiz pēc ērces piesūkšanās, bet sūkšanas beigu periodā. To izraisa ērcu siekalu dziedzera toksīns (*holocyclotoxin*), ko ērces producē asinssūkšanas laikā. Paralīzes skar kā cilvēkus, tā arī mājdzīvniekus, un toksīnu izstrādā gan aptuveni 43 ērcu sugas, t.sk. arī *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma* u.c. ģinšu ērces. Galvenās ērcu sugas – *D. andersoni*, *D. variabilis*, *Amblyomma americanum*, *A. maculatus* un *Ixodes scapularis*. Austrālijā dominē *I. holocyclus* un *I. cornulatus*. Slimība izplatīta g.k. ASV, kur reģistrēti vairāki simti gadījumi, un Austrālijā. Sporādiski gadījumi sastopami arī Eiropā, Āfrikā un Dienvidamerikā (Vedanarayanan et al., 2004). Tomēr arī Austālijā šī nav ļoti izplatīta slimība cilvēkiem (no 1983. līdz 1995. gadam šeit reģistrēti tikai 2 bērnu saslimšanas gadījumi), savukārt skarto mājlopu skaits katru gadu sasniedz pat 20 000, izraisot paralīzes liellopiem, suņiem, kaķiem, aitām, cūkām un vistām.

Paralīze parasti sākas ar progresējošu apakšējo ekstremitāšu vājumu, kam seko koordinācijas traucējumi, vai pat pilnīga ataksija. Smagos gadījumos kraniālā nerva vājums ar sisartriju un disfāģiju noved pie bulbārās paralīzes, elpošanas vājuma un nāves. Bērniem novērojams arī nemierīgums, reizēm anoreksija un vemšana. Iespējams, ka paralīze norit smagākā formā, ja ērce piesūkusies galvas vai kakla rajonā, nevis citur uz ķermeņa (Burke et al., 2004). Lai novērstu paralīzi, nepieciešams pēc iespējas ātrāk noņemt ērci. Uzlabošanās vairumā gadījumu ir ļoti strauja, tomēr piesūkšanās gadījumos simptomi var progresēt arī 2 dienas pēc ērces noņemšanas. Specifiska ārstēšana nav pazīstama, Austrālijā tik izmantots suņu pretparalīzes serums.

ASV paralīzes visbiežāk izraisa ērces *Dermacentor variabilis* piesūksšanās, savukārt Austrālijā – *Ixodes holocyclus*. Tomēr ne visu ērcu piesūksšanās izraisa paralīzi. Noskaidrots, ka holocilotoksīns ir proteīns ar molekulsvaru 40 000-80 000. Tā ķīmiskā struktūra nav pilnīgi noskaidrota. Eksperimentējot ar dzīvniekiem konstatēts, ka paralīzes simptomi nekad neparādās līdz piektajai ērces *I. holocyclus* piesūksšanās dienai. Ir zināma līdzība starp botulīna toksīnu un ērcu siekalu toksīnu. Abi galvenokārt ietekmē neiromuskulāro savienojumu un autonomos ganglijus, atklātas arī

citas līdzīgas neirofizioloģiskās ietekmes. Abi toksīni uz neiromuskulāro savienojumu iedarbojas presinaptiski. Uzskata, ka līdzīgi kā botulīna toksīns, arī ērcu siekalu dziedzeru toksīns varētu darboties kā Zn-atkarīgā endoproteāze, kas sašķeļ eksocitozē nepieciešamus polipeptīdus. Tomēr pagaidām toksīna izcelsme ir neskaidra. (Vedanarayanan et al., 2004).

Pastāv arī hipotēze, ka paralīzes var izraisīt arī simbiotiska riketsija vai kāds cits ērcu siekalu komponents (Grattan-Smith et al., 1997).

3. Darba novitāte

Saistībā ar ērcu encefalīta un Laima boreliozes incidences tendencēm analizēti monitoringā iegūtie *Ixodes* ērcu izplatības un aktivitātes dati; noskaidrotas šo infekcijas slimību incidences atšķirības *I. ricinus* un *I. persulcatus* atsevišķas un kopīgas izplatības reģionos.

Iegūta informācija par *Ixodes* sugu ērcu attīstības stadiju aktivitātes īpatnībām un to saistību ar saslimstību.

Analizētas ērcu encefalīta vīrusa prevalences īpatnības dabā savāktās un cilvēkiem piesūkušās ērcēs.

Apskatīta atsevišķu biotisko un abiotisko faktoru saistība ar ērcu ikgadējām aktivitātes tendencēm.

Veikta *Ixodes* ērcu morfoloģiski noteikto sugu molekulāra pārbaude.

Attīstītas molekulārās metodes *Anaplasmataceae* dzimtas prokariotu prevalences noteikšanai ērcēs (divpakāpju PCR, hibridizācijas un sekvencēšanas), un noteikta to prevalence abu dzimumu ērcēs un ģeogrāfiskā izplatība Latvijā.

Ar hibridizācijas metodi noskaidrota *Babesia* ģints sugu prevalence abu dzimumu ērcēs un ģeogrāfiskā izplatība Latvijā.

4. Pētījuma mērķis un uzdevumi

Šī pētījuma galvenais mērķis bija noskaidrot *Ixodidae* epidemioloģiski nozīmīgo ērcu sugu izplatību, to pārnēsāto infekcijas slimību nozīmi un molekulāro epidemioloģiju Latvijā. Saistībā ar to tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

1. Noskaidrot epidemioloģiski nozīmīgo *Ixodidae* ērcu sugu izplatību Latvijā, to attīstības stadiju sezonālās un ikgadējās aktivitātes tendences;
2. Noskaidrot Latvijā reģistrēto ērcu pārnesto slimību saistību ar *Ixodes* ērcu izplatības un aktivitātes īpatnībām;
3. Apskatīt galvenos faktorus, kas ilgstošā novērošanas periodā varētu būt ietekmējuši saslimstības un ērcu aktivitātes tendences;
4. Noskaidrot ērcu inficētību ar Latvijā izplatīto ērcu pārnesto infekciju ierosinātājiem;
5. Veikt reti sastopamo ērcu pārnesto slimību ierosinātāju (anaplazmu, ērlihiju un babēziju) pētījumus, attīstot molekulārās metodes šo patogēnu noteikšanai ērcēs; t.sk. molekulāro tipēšanu;
6. Noskaidrot anaplazmu, ērlihiju un babēziju sugu izplatību Latvijā.

5. Materiāli un metodes

5.1. Ilggadīgo statistisko datu avoti un to statistiskā apstrāde

Ilggadīgie *Ixodes* dabas perēkļu novērojumu rezultāti (1973.g. – 1994.g.) iegūti no arhivētiem v/a “Sabiedrības veselības aģentūra” (SVA) datu avotiem (J.Skadiņas novērojumi). Citi statistikas dati iegūti no SVA datu bāzēm, SIA “Vakcinācijas serviss”, LR Centrālās statistikas pārvaldes mājas lapā (<http://www.csb.gov.lv/>), Valsts Mežu dienestā, un v/a „Latvijas Vides, ģeoloģijas un meteoroloģijas aģentūra”.

Rezultātu ticamība tika aprēķināta, izmantojot Stjudenta pāra testa metodi (Beaglehole et al., 1993), datu korelācijas un faktoru būtiskuma noteikšanai salīdzināšanai tika izmantots Pīrsona korelācijas tests, multivariablās faktoru analīzes korelācijas un faktoru matricas tabulas, izmantojot programmas KyPlot 2. versiju Beta15 (Yoshioka, 2001).

5.2. Dabas perēkļu apsekošanas metodes un vietas

I. ricinus aktivitāte (visu ērcu attīstības stadiju skaits uz 1 km) ikgadus noteikta to aktivitātes sezonas laikā (aprīlis-oktobris) 2-3 reizes mēnesī (2006. gadā - reizi mēnesī) ar flaneļa karogu (100 × 90 cm (Filipova, 1995)) divās konstantās monitoringa vietās - Rīgas rajonā (Tīreļu mežniecībā) un Rīgā (Mežaparkā), darbu veicot SVA epidemioloģiskās uzraudzības pasākumu ietvaros. *I. persulcatus* aktivitāte noteikta Madonas rajona Saikavas mežniecībā no 1973. - 1999. gadam 3 reizes mēnesī, bet kopš 2000. gada –1-2 reizes mēnesī (ar vietējo speciālistu palīdzību). Savāktās ērces ievietotas mēģenēs ar zāli un uzglabātas +4 °C temperatūrā līdz sugas noteikšanai.

Sugu identifikācijai un to izplatības noteikšanai, kā arī molekulāriem pētījumiem izmantotās (atlikuma) ērces ikgadus saņemtas no 15-27 Latvijas ģeogrāfiskiem rajoniem (vākuši vietējie speciālisti ērcu encefalīta un Laima boreliozu epidemioloģiskās uzraudzības ietvaros).

5.2.1. Ērcu monitoringa vietas

Ilglaicīgākā un galvenā *I. ricinus* ērcu monitoringa vieta atrodas Rīgas rajona **Tīreļu** mežniecībā, tālu no apdzīvotām vietām. Monitoringa vietu veido 2 nogabali, kas atrodas apmēram 1 km attālumā un katrā no tiem izvietotas 0,5 km garas ērcu uzskaites maršruta līnijas.

Dominējošā koku suga ir egļu *Picea abies* un melnalksnis *Alnus glutinosa*, kas sastopams gan 1. stāvā, gan arī zemākos. Retāk sastopama priede *Pinus sylvestris*. Katrā ērcu uzskaites nogabalā ir platības ar biežām jaunu egļu *Picea abies* audzēm, tomēr šajās platībās ērcu skaits parasti ir ļoti zems nabadzīgās zemsedzes veģetācijas dēļ. Pamežu veido g.k. apses *Populus tremula*, alkšņi *Alnus* sp., krūklī *Frangula alnus*, ievas *Padus avium*, bērzi *Betula* sp., vītoli *Salix* sp., bieži - avenāji *Rubus idaeus*. Zemsedzē visbiežāk sastopamā lakstaugu suga ir meža zaķskābene *Oxalis acetosella*, bieži - graudzāļu sugas, izplatīta suga ir meža meldri *Scirpus sylvaticus*. Parastākās lakstaugu sugas ir nārbuli *Melampyrum* sp., divlapu žagatiņa *Maianthemum bifolium*,

maiļpuķītes *Convallaria majalis*, nātres *Urtica dioica*, gundegas *Ranunculus* sp., lauku āboliņš *Trifolium arvense*, vārnkājas *Comarum palustre*, kumelpēdas *Asarum europaeum*, čūskogas *Paris quadriflora*, vietām papardes *Athyrium filix-femina*, *Dryopteris* sp. Lielākais ērcu blīvums parasti reģistrēts jauktu koku audzēs, kur zemsedzi veido zaķskābenes *Oxalis acetosella*, kā arī savvaļas graudzāles, bet zemākais - blīvā egļu audzē bez citu koku piejaukuma ar sūnu un skraju savvaļas graudzāļu veidotu zemsedzi.

Otrā ērcu aktivitātes monitoringa vieta atrodas Rīgas centrā, **Mežaparkā**, meža masīvā ap Mežaparka Lielo estrādi. Nogabali, kuros atrodas ērcu uzskaites maršruti (kopējais garums 1,3 km), ir atdalīti ar asfaltētiem ceļiem.

Dominējošā koku suga šeit ir priede *Pinus sylvestris*. Pamežu veido pīlādži *Sorbus aucuparia*, kļavas *Acer plantanoides*, vilkābeles *Crataegus* sp., bērzi *Betula pendula*, atsevišķas liepu *Tilia cordata*, krūklī *Frangula alnus*, ievas *Padus racemosa*, daudz sīku apšu *Populus tremula* atsevišķās vietās (īpaši biezi apsīšu saaugumi atrodas vietā, kur 1998. gadā izcirta pamežu), ozoliņi *Quercus robur* (nīkulīgi), krūmājus veido avenāji *Rubus idaeus*, savvaļas upenes *Ribes rubrum*, krokainās rozes *Rosa rugosa*. Galvenās lakstaugu sugas ir gārsas *Aegopodium podagraria*, zemenes *Fragaria vesca*, bieži sunīši *Bidens tripartita*, maiļpuķītes *Convallaria majalis*, mellenes *Vaccinium myrtillus*, vietām papardes *Athyrium filix-femina*, *Pteridium aquilinum*, kosas *Equisetum* sp., gundegas *Ranunculus repens*, madaras *Galium verum*, pienenes *Taraxacum officinale*, atsevišķās vietās mugurenes *Polygonatum officinale*, arī savvaļas graudzāļu sugas un sūnas.

I. persulcatus ilggadīgā monitoringa vieta izveidota Madonas rajona **Saikavas** apkārtnē, un to veido divi 0,5 km gari mežu nogabali šosejas tuvumā. Mežu veido jaukta egļu/ošu/bērzu (*Picea abies*/*Fraxinus excelsior*/*Betula* sp.) audze. Pamežs sastāv no ievām (*Padus avium*), nelieliem ošiem (*Fraxinus excelsior*), pīlādžiem (*Sorbus aucuparia*), nelieliem ozoliņiem (*Quercus robur*). Zemsedzi un krūmāju audzi veido avenāji (*Rubus idaeus*), gārsas (*Aegopodium podagraria*), parastās pļavu graudzāļu sugas, zaķskābenes (*Oxalis acetosella*), reti mellenāji (*Vaccinium myrtillus*), vietām papardes *Athyrium filix-femina*, *Dryopteris* sp., *Pteridium aquilinum* un nātres (*Urtica* sp.).

5.3. *Ixodes* ērcu un to pārnesto mikroorganismu noteikšana un molekulārā genotipēšana

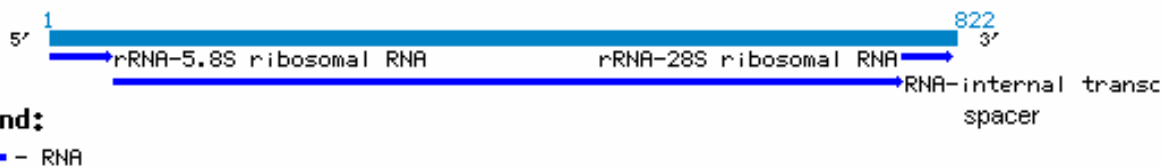
5.3.1. Ērcu sugu morfoloģiskā identifikācija

Katras ērces morfoloģiskās pazīmes tika mikroskopiski novērtētas pie kopējā palielinājuma x25. Viena no galvenajām *I. ricinus* un *I. persulcatus* mātīšu atšķirībām bija dorsālā vēderiņa rievā, kas *I. ricinus* ir pārtraukta, pārējo abu sugu ērcu izšķiršanas pazīmju vidū ir koksālo dziedzeru izvirzījuma izmēri, rievu un sariņu izskats, daudzums, izvietojums, krāsas nianses u.c.

5.3.2. *Ixodes* morfoloģiski noteikto sugu molekulārā pārbaude

Lai noteiktu, vai savāktu ērcu morfoloģiski noteiktā piederība *Ixodes ricinus* un *Ixodes persulcatus* sugām atbilst arī ģenētiski, izlases veidā Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (BMC) tika veikta atsevišķu Latvijas administratīvajos rajonos 2002. līdz 2005. gadā savāktu ērcu ITS2 gēna (7.att.) amplifikācija, un tai sekojoša iegūto gēnu fragmentu sekvencēšana.

Kopumā tika pārbaudītas 20 ērces g.k. no *I. persulcatus* un abu ērcu sugu izplatības rajoniem: Rīgas rajona (Tīreļu mežniecības, 5 *I. ricinus*), Krāslavas rajona Kaplavas (3 *I. ricinus*), Ludzas rajona Cirmas (3 *I. persulcatus*), Madonas rajona Saikavas (5 *I. persulcatus*), un Valmieras rajona Mazsalacas (3 *I. persulcatus*).



7. attēls. NCBI gēnu bankā (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) ievietotais *Ixodes persulcatus* (D88877) 5.8SrRNA, ITS2, 28S rRNA (isolate:ipn8) gēnu grafiskā attēla fragments (Fukunaga et al., 2000)

Lai ar PCR metodes palīdzību amplificētu *Ixodes* ērcu ITS2 gēna fragmentu, praimeris tika izvēlēti to ietverošās esošās 5,8S un 28S rRNS gēnu sekvencēs (Fukunaga et al., 2000): tiešais praimeris 58SRSF3 (5'-CTCTTTGAACGCACATTGCGGCCT) un reversais praimeris 28SR1/1 (5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGGGTTGTC). Šie praimeris amplificē *I. ricinus* 769 bp gēna fragmentu, bet *I. persulcatus* – 774 bp gēna fragmentu (8. att.).

Ixodes ricinus 5.8SrRNA, ITS2 (769 bp), 28S rRNA gēni (GeneBank)

CTCTTTGAACGCACATTGCGGCCTCGGGCCTTCCCGTGGCTTCGTC TGTGTGAGGGTTCGGATCATA TATCAAGAGAGGAGAA1
 TTGTTTCTACCTCGTTTTGACTGTGTCGGATCGTGGGCAGCACGCATGTTATGCTTCTTGGCTTGGCTTTTCACGTTCTCG
 GAGCGATTGAAGAGATGGAGCAGATGCACGAGTTTGGTGCAGCGATGCCACGCGTGCAGTCCCTCCTAGGTCCGGTTT
 TAATCGAACACTGCATAGAAAAACGAAACTCGATGGAGACCTGTTGTGGAAATCCCGTCGCACGTTGAACGGCGCTTTTGA
 CGTCGGTGGCTGGAGATGTGAAACGGTTTCTTTTCGATCGATTCTGTTTCTTTCTTTTGGCGTGGATGTGTTTCGAAAAACCT
 TCTCTTTGGATGGACGAAGTTCGTTGGCGCGTTTGAACGCGCGTCCGCCATTAATAATCTCGTGGCGTTGATTGACACAA
 GACTTCTTGCTCGAAGGAGAGAACGAAAAACGTTTCTGGGAGGAAAGTTTCTGTGCGTCGTAGCCTCCGTCAGTCTAAGA
 CCTTCGCGCTTTGATGAATACTGGAGCCATCCAGTAGGGGAATGCCGTTGGATTGCGCGCTTCTTTTTTGTGCAATCGAAA
 GCGATGCAAAAGCGTGTGTACAACAACATTTTCGATGCCATCTTTTTTACAGGGTAAGGAGGCTCAAAGTTTTGTTTGA
 AAGCGCAAAATCAAAAAAGATTGTC GACCTCACATCAGGCGA GACAACCCCTGAATTTAAGCATAGAA

..... Tiešais praimeris 58SRSF3(Fukunaga et al., 2000)
 Reversais praimeris 28SR1/1 ("-" "
 Tiešais praimeris IxN1
 Reversais praimeris IxN2
 Kopējs fragments 2 praimeriem

8. attēls. *Ixodes* ITS2 gēna amplificēšanai un sekvencēšanai izmantotie praimeris

Sekvencēšanai tika izmantoti ar *Witehead Institute for Biomedical Research* (Kembridža, Lielbritānija) *Internet* programmu *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) iegūtie iekšējie praimeris: tiešais IxN1 (5'-TGTGTGAGGGTTCGGATCATA) un reversais IxN2 (5'-GTCTCGCCTGATGTGAGGTC).

5.3.3. Patogēnu nemolekulārās identifikācijas metodes

5.3.3.1. Mikroskopēšana

Borēliju izpēte ērcēs sākotnēji tika veikta, izskatot ērcu krāsotās fiksētās uztriepes eļļas imersijas sistēmā SVA. Pēc ērces dzimuma, attīstības stadijas un sugas noteikšanas uz priekšmetstikliņa tika novilkas 2 uztriepes līnijas. Fiksētās ērcu uztriepes tika krāsotas Gimzas-Romanovska šķīdumā, kristālvioleta šķīdumā un pēc

tam caurskatītas ar mikroskopu eļļas imersijas sistēmā pie kopējā palielinājuma x750. Metode neprecīza, jo pilnībā paraugu nav iespējams caurskatīt.

Mikroskopēšanas metodi pasaulē tomēr bieži izmanto patogēnu ģints identifikācijai klīniskajā praksē, piemēram, nosakot ērlihiju vai babēziju klātbūtni pacientu asins uztriepēs, attiecīgi leukocītos vai eritrocītos. Gimzas-Romanovska šķīdumā krāsotu paraugu apskata gaismas mikroskopā pie 50x vai 100x liela palielinājuma (Bakken et al., 1996; Schuster, 2002).

5.3.3.2. Kultivēšana

Anaplasma sp. noteikšanai klīniskos paraugos no pacientu asinīm pasaulē izmanto šī patogēna kultivēšanu HL-60 šūnās (promielocitārās leukēmijas šūnu līnija), apstrādājot asinis ar EDTA (antikoagulantu), un uzsējot vidē, kas satur RPMI (bikarbonātu bufersistēma), L-glutamīnu un 10 % embrionālā teļa serumu, un aptuveni 2×10^5 HL-60 šūnas (Goodman et al., 1996). Barotni inkubē 14 dienas pie + 37 °C temperatūrā līdz 5 % CO₂ atmosfērā.

Babēziju kultivēšanai (Schuster, 2002) pasaulē izmanto HEPES (N-2-hidroxiētilpiperazīna-N'-2-etānsulfonskābe) buferētu audu kultūras vidi 199 (50%), kas papildināta ar vēršu serumu (pH 7). Videi pievieno eritrocītus, un inkubē 38°C temperatūrā līdz 5% CO₂ atmosfērā.

5.3.3.3. Seroloģiskās metodes

Ērču encefalīta vīrusa noteikšana dabā savāktās un pacientiem noņemtās ērcēs ar ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) metodi tika veikta Virusoloģisko izmeklējumu laboratorijā (bij. SVA, tagad Latvijas Infektoloģijas centra laboratorija, A.Duks, V.Mavčutko). Izmeklējumu plates A, C, E un G līniju ligzdas tika pārklātas ar IgG pret ērču encefalīta vīrusu. B, D, F un H līniju ligzdas tika pārklātas ar normālo IgG. Katra ērce tika homogenizēta 0.2 ml fosfātu bufera šķīdumā, un 0,05 ml tika disperģēti uz abām plates ligzdām (ar IgG pret ērču encefalīta vīrusu, un normālo IgG). Pēc paraugu inkubācijas ar pirmo IgG slāni, tika pievienots mārrotku peroksīdāzes iezīmētais IgG konjugāts. Pēc OPD (*Orthophenylene diamine*) pievienošanas tika mērīta enzīma aktivitāte. Absorbciija tika noteikta ar fotometru (Multiscan Multisoft) pie 492/620 nm. Paraugi ar divkārt lielāku optisko blīvumu nekā negatīvajai antigēna kontrolei, tika uzskatīti par pozitīviem.

Līdzīga ir netiešā imūnfluorescento antivielu analīze (IFA), ko izmanto, lai asins serumā notiektu patogēnu antivielas. Nicholson et al. (1997) aprakstījis izstrādāto IFA metodi *A. phagocytophilum* antivielu noteikšanai cilvēka asins serumā. IFA reakcijā izmantoti mikroskopa slaidi, kuru 18 vai 24 ligzdās piesaistīts antigēns. Lai pārbaudītu paraugus, izgatavoja divkārtīgus testējamā seruma sērijveida antigēna atšķaidījumus, pievienojot govju seruma albumīnu, kazu serumu u.c. reaģentus, lai samazinātu nespecifisko piesaisti. Atšķaidījumus ievietoja ligzdās, inkubēja un 3 reizes mazgāja. Ligzdu sienas pārklāja ar fluoresceīna izotiocianāta iezīmēto kazu G-specifisku pret-cilvēka imunoglobulīna konjugātu (IgG), slaidus atkārtoti inkubēja un mazgāja, kontrasta palielināšanai un autofluorescences nomācšanai pievienojot eriohroma krāsvielu (T) un fiksāžas reaģentus. Slaidus pārbaudīja epifluorescences mikroskopā 3200 un 3400 palielinājumā specifiskās ērlihiju fluorescences noteikšanai. Galīgie titri tika nolasīti atšķaidījumam, pie kura fluorescence vēl bija izšķirama.

5.3.4. Patogēnu molekulārās identifikācijas metodes

5.3.4.1. Genomiskās DNS izdalīšana

Ērču un to patogēnu molekulārie pētījumi tika veikti Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (BMC). Genomiskā DNS tika izdalīta no 70° etanola šķīdumā uzglabātām *Ixodes* ērču pieaugušām attīstības stadijām un nimfām (*Ixodes* sugu molekulārajai pārbaudei) un ērču puliem (katrā pulā 5 pieaugušās ērces - atsevišķi mātītes un tēviņi; vai 10 nimfas).

Individuālās ērces un to puli tika homogenizēti 1x TE buferī (0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA (SIGMA, USA)), homogenātiem pievienots līdzīgs tilpums fenola/hloroforma/izoamilspirta maisījuma (25:24:1), un paraugi vorteksēti un centrifugēti. Centrifugāta ūdens fāzei tika pievienoti 100 µl hloroforma, un maisījums atkārtoti vorteksēts un centrifugēts. Maisījuma augšējais slānis tika atvērtā veidā inkubēts ūdens vannā 15 min pie +90°C, un uzglabāts sasaldētā veidā pie -20°C tālākai ērču un to patogēnu DNS izmantošanai PCR reakcijām.

5.3.4.2. Genomiskās RNS izdalīšana

Ērču encefalīta vīrusa RNS noteikšanai paredzētās *Ixodes* ērces un cilvēku asins serums tika uzglabāts pie -70°C. Ērču encefalīta vīrusa RNS ekstrakcija tika veikta, izmantojot no ribonukleāzēm brīvo komerciālo komplektu QIAamp Viral Mini Kit (QIAGEN GmbH). cDNS sintēzei tika izmantots komerciālais komplekts - RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania).

5.3.4.3. Ērču encefalīta vīrusa detektēšana ar cDNS divpakāpju amplifikācijas metodēm

Ērču encefalīta vīruss tika analizēts ar divām divpakāpju RT-PCR metodēm: 5'NCR-RT-PCR un NS5-RT-PCR.

5'NCR-RT-PCR metode tika pielāgota no literatūrā aprakstītās (Schrader et Süs, 1999). Divpakāpju RT-PCR reakcija tika veikta 50 µl reakcijas tilpumā (reāģenti no Fermentas, Lietuva) izmantojot cDNA 10µl un pirmajam amplifikācijas ciklam izmantojot praimerus Ppl (5'-GCGTTTGCTTCGGACAGCATTAGC) un Pml (5'-GCGTCTTCGTTGCGGTCTCTTTCG). CDNS amplifikācija tika veikta sekojošos apstākļos: 2 min pie 94 °C (sākotnējā denaturācija), 40 PCR cikli ar 30 sek. pie 94 °C un 30 sec pie 66 °C. Gala elongācija ilga 5 min pie 66 °C. Otrajam PCR ciklam tika izmantots pirmā cikla amplifikācijas products 2 µl, un praimeru Pp2 (5'-TCGGACAGCATTAGCAGCGGTTGG) un Pm2 (5'-TGCGGTCTCTTCGACTCGTCG). Reakcija notika sekojošos apstākļos: 9 min pie 95 °C (sākotnējā denaturācija), 30 PCR cikli ar 15 sek pie 94 °C un 30 sek pie 65 °C. Gala elongācija ilga 10 min pie 72 °C.

NS5-RT-PCR metode arī tika pielāgota, par pamatu ņemot literatūrā aprakstīto (Han et al., 2001). Metode bija līdzīga pirmajai, izņemot citas praimeru sekvenču: pirmajam ciklam tika izmantoti praimeru PI (5'-GAGGCTGAACAACACTGCACG) un PII (5'-GAACACGTCCATTCCTGATCT), bet otrajam ciklam – praimeru PIII (5'-ACGGAACGTGACAAGGCTAG) un PIV (5'-GCTTGTTACCATCTTTGGAG). PCR reakcijas apstākļi bija sekojoši: 2 min pie 96 °C sākotnējai denaturācijai, 35 PCR cikli (pirmajai PCR pakāpei) un 30 PCR cikli (otrajai reakcijai) ar 30 sek pie 96 °C, 30 sek pie 40 °C un 30 sek pie 68 °C. Gala elongācija bija 5 min pie 68 °C.

Katrai PCR reakcijai tika iekļauti pozitīvie un negatīvie kontroles paraugi. Tika izmantoti divu veidu pozitīvās kontroles paraugi – vakcīna *Encepur Chiron Behring* (Vācija), kas saturēja inaktivētu ērcu encefalīta K23 štammu and Krievijas ērcu encefalīta *Sofjyn* štammu saturoša vakcīna. Amplikoni tika vizualizēti 2.5% agarozes gelā, kas krāsots ar etīdija bromīdu un fiksēti ar Kodak sistēmu (minētā vizualizācija tika izmantota arī citu ērcu pārnesto patogēnu pētījumiem). Kā garuma marķieri izmantoja 5 µl “Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus” (*NBI Fermentas*, Lietuva); elektroforēzes apstākļi - 90 V / ~60mA.

5.3.4.4. *Anaplasma phagocytophilum* detektēšana ar 16S rRNS gēna fragmenta divpakāpju amplifikāciju

Lai amplificētu *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNS gēna (1490 bp) fragmentus ar divpakāpju-PCR metodes palīdzību, sākotnēji tika izmantota metode, līdzīga tai, ko aprakstījis Liz et al. (2000).

5 µl (0,25-5 ng) attīrītās DNS tika izmantota kā šablons primārajai PCR reakcijai kopējā tilpumā 50 µl. Reakcijas maisījums sastāvēja no 1x PCR bufera ar (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dezoksinukleozīda trifosfāta dNTP maisījuma (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 U Taq polimerāzes (*NBI Fermentas*, Lietuva) un 0,5 µM katra praimera ge3a (tiešais) (5'-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC) un ge10r (reversais) (5'-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC), kas deva 932 bp produktu. Reakcijas apstākļi bija sekojoši: sākuma denaturācija - 2 min pie + 95°C, kam sekoja 40 cikli ar denaturāciju - 30 sek pie + 94°C, hibridizāciju - 30 sek pie + 55°C, elongāciju - 1 min pie + 72°C; gala elongācija ilga 5 min pie +72 °C.

Reakcijas produkts (1 µl) tika izmantots divpakāpju- PCR reakcijai, kuras apstākļi bija līdzīgi, izņemot tika izmantoti 0.2 µM praimeri, kas deva 546 bp produktu: ge9f (tiešais) (5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT) un ge2 (reversais) (5'-GGCAGTATTAA AAGCAGCTCCAGG).

Optimizējot reakcijas apstākļus, vēlāk tika izmantoti BMC sintezētie ārējie praimeri 475 bp fragmenta amplifikācijai (Little et al., 1998; Munderloh et al., 2003): ECC (tiešais) praimeris (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC) un ECB (reversais) praimeris (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA), un iekšējie praimeri 412 bp fragmenta amplifikācijai (Little et al., 1997; Massung et al., 1998): ge9f (tiešais) praimeris (5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT) un GA1UR (reversais) praimeris (5'-GAGTTTGCCGGGACTTCTTCT).

10 µl (0,5-10 ng) attīrītās DNS tika izmantota pirmajai PCR reakcijai kopējā tilpumā 50 µl. Reakcijas maisījums sastāvēja no 1x PCR bufera ar (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dezoksinukleozīda trifosfāta dNTP maisījuma (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 U Taq polimerāzes (*NBI Fermentas*, Lietuva) un 0,5 µM katra praimera ECC/ECB.

Reakcijas apstākļi 40 cikliem bija sekojoši: sākuma denaturācija - 2 min pie + 94°C, denaturācija - 30 sek pie + 94°C, hibridizācija - 15 sek pie + 55°C, elongācija - 4 min pie + 72°C, gala elongācija 5 min pie +72 °C.

5 µl reakcijas produkta tika izmantoti divpakāpju PCR reakcijai, kurai bija līdzīgs reakcijas maisījums, izņemot 0.5 µM praimerus ge9f un GA1UR.

Reakcijas apstākļi divpakāpju reakcijai (40 cikliem) bija sekojoši: sākuma denaturācija - 2 min pie + 94°C, denaturācija - 30 sek pie + 94°C, hibridizācija - 15 sek pie + 60°C, elongācija - 4 min pie + 72°C, gala elongācija 5 min +72 °C.

PCR gala produkti tika uzglabāti pie -20 °C līdz vizualizācijai 2% agarozes gela elektroforēzē. Kā garuma marķieri izmantoja 5 µl “Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus” (NBI Fermentas, Lietuva); elektroforēzes apstākļi - 90 V / ~60mA.

5.3.4.5. *Anaplasma* /*Ehrlichia* ģinšu detektēšana ar 16S rRNS gēna fragmenta divpakāpju amplifikāciju

Lai amplificētu plaša *Anaplasma* un *Ehrlichia* ģinšu sugu spektra 16S rRNS gēna fragmentus tika izmantota līdzīga divpakāpju- PCR amplifikācijas reakcija, kā *Anaplasma phagocytophilum* gēna fragmentu amplifikācijai, izņemot divpakāpju reakcijas tiešā praimera ge9f vietā ar *Primer-3* programmu tika izveidots un BMC sintezēts jauns tiešais praimers ESP (5'-TAACACATGCAAGTCGAACGGA) 428 bp fragmenta amplifikācijai. Reakcijas parametri bija identiski.

5.3.4.6. Patogēnu genotipēšana ar sekvencēšanas metodi

PCR reakcijā iegūtie 16S rRNS gēna fragmentu amplikoni tika apstrādāti ar SAP un eksonukleāzes I fermentu maisījumu (9:1), pievienojot 25 µl PCR produkta 1 µl SAP un eksonukleāzes I fermentu maisījuma, vorteksējot, un aktivējot fermentus PCR aparātā pie sekojoša režīma: 20 min pie + 37 °C, 15 min pie + 80 °C (inaktivācija) un 5 min pie + 4 °C.

Sekvencēšanas reakcijai izmantoja (uzreiz vai uzglabātu pie – 20 °C) 5 µl apstrādātā produkta, kam pievienoja „*Big Dye Terminator mix*”- 2 µl, 5x sekvencēšanas buferi - 2 µl, 10 µM attiecīgo praimeri - 1 µl un destilētu ūdeni līdz 10 µl.

Sekvencēšanas reakcija (25 cikli) tika veikta pie sekojoša PCR režīma: sākuma denaturācija - 2 min pie + 95°C, denaturācija - 30 sek pie + 96°C, hibridizācija - 15 sek pie + 50°C, elongācija - 4 min pie + 60°C, atdzesēšana + 4°C.

Sekvencēšanas produktu (10 µl) sākotnēji precipitēja ar 35 µl 96° etilspirta un 1 µl 7,5 M amonija acetāta, saldēja 20 min pie –20 °C , centrifugēja (15 min pie 13000 apgr/min), un noņēma supernatantu. Nogulsnes skaloja, pievienojot 200 µl auksta 70 % etilspirta, centrifugēja, noņēma supernatantu, žāvēja un uzglabāja pie –20 °C.

Sekvencēšanas rezultātus nolasīja ar 16-kapilāru “ ABI Prism 3100” ģenētisko analizātoru (*Applied Biosystems*, ASV) un datorprogrammu “*Contig Express*”. Iegūtās sekvenses salīdzināja ar BLAST datu bāzē publicētām sekvensēm.

5.3.4.7. Patogēnu genotipēšana ar hibridizācijas metodi

a) *Anaplasma/Ehrlichia* sugu detektēšanai tika izmantota hibridizācija ar nedaudz modificētu RLB-TBD (*Reverse Line Blot – Tick-borne diseases*) metodi, izmantojot *Isogen* (Nīderlande) komerciālo komplektu.

Išsumā, *Anaplasma/Ehrlichia* un *Babesia/Theileria* sugu klātbūtnes konstatēšana *Ixodes* ērcu DNS izolātu paraugos tika veikta ar miniblottera aparātu („MN-45”, *Isogen Bioscience B. V.*, Nīderlande), uz kura membrānas ar 5'terminālo aminosaiti kovalenti piesaistītas *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia* un *Theileria* ģints sugu

specifiskās oligonukleotīdu zondes. Šo sugu gēnu (*Anaplasma/Ehrlichia* sugām - 16S rRNS un *Babesia/Theileria* sugām - 18S rRNS) specifisko fragmentu amplikoni tika iegūti divpakāpju PCR reakcijās.

Pirmajā divpakāpju PCR kārtā jau minētie *Anaplasma/Ehrlichia* praimeris ECC un ECB (Little et al., 1998.; Munderloh et al., 2003) deva 475 bp fragmentu. Divpakāpju-PCR otrās pakāpes reakcijai *Anaplasma/Ehrlichia* gēnu amplikonu iegūšanai atkal kā tiešais praimeris tika izmantots ECC un kā reversais – TBD-RLB komplekta biotinilētais praimeris Ehr-R (5'-Biotin – CGGGATCCCGAGTTTGCCGGGACTTYTTCT, (Y = A/G)).

b) *Babesia/Theileria* gēnu amplikonu iegūšanai divpakāpju-PCR reakcijas 1. kārtā tika izmantoti ar *Witshed Institute for Biomedical Research* (Kembridža, Lielbritānija) *Internet* programmu *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) izstrādātie ārējie praimeris tiešais BT-F1 (5'-CGCAAATTACCCAATCCT un reversais BT-R1 (5'-GATCCCCTAACTTTCGTTCT). Reakcijas 2. kārtā tika izmantoti TBD-RLB komplekta praimeris – tiešais RLB-F2 5'- GACACAGGGAGGTAGTGACAAG, un kā reversais RLB-R2 5'- CTAAGAATTTACCTCTGACAGT. Divpakāpju – PCR reakcija tika veikta 2 kārtās, katrā no tām bija 40 cikli.

Reakcijas apstākļi 1. ciklam bija sekojoši: sākuma denaturācija +94°C - 2 min, un 40 cikli ar denaturāciju pie +94°C - 30 sek, hibridizāciju pie +55°C -30 sek, elongāciju pie +72°C - 30 sek. Gala elongācija ilga 5 min pie +72°C. 2. cikla reakcijas apstākļi bija līdzīgi, izņemot hibridizācijas temperatūra bija zemāka - 55°C.

Iegūtie amplikoni līniju veidā tika uznesti uz membrānas (penperdikulāri attiecībā pret sugu specifisko oligonukleotīdu līnijām). Hibridizācijai tika izmantota hibridizācijas krāsns (*Amersham Pharmacia Biotech*, Anglija),

Pēc hibridizācijas procesa (Bekker et al., 2002), t.sk. membrānas apstrādes ar 2,5 U streptovidīna peroksīdāzes iezīmēto konjugātu (*Roche*, Vācija) un ECL (*Enhanced chemiluminescent liquid* - ierosinātās hemiluminescences šķīdumu (*Amersham Biosciences*, Anglija), un atbrīvošanās no nepiesaistītiem PCR produktiem, hibridizētais PCR produkts tiek vizualizēts ar hemiluminescenci.

6. Rezultāti un diskusija

6.1. Epidemioloģiski nozīmīgās *Ixodidae* ērces Latvijā

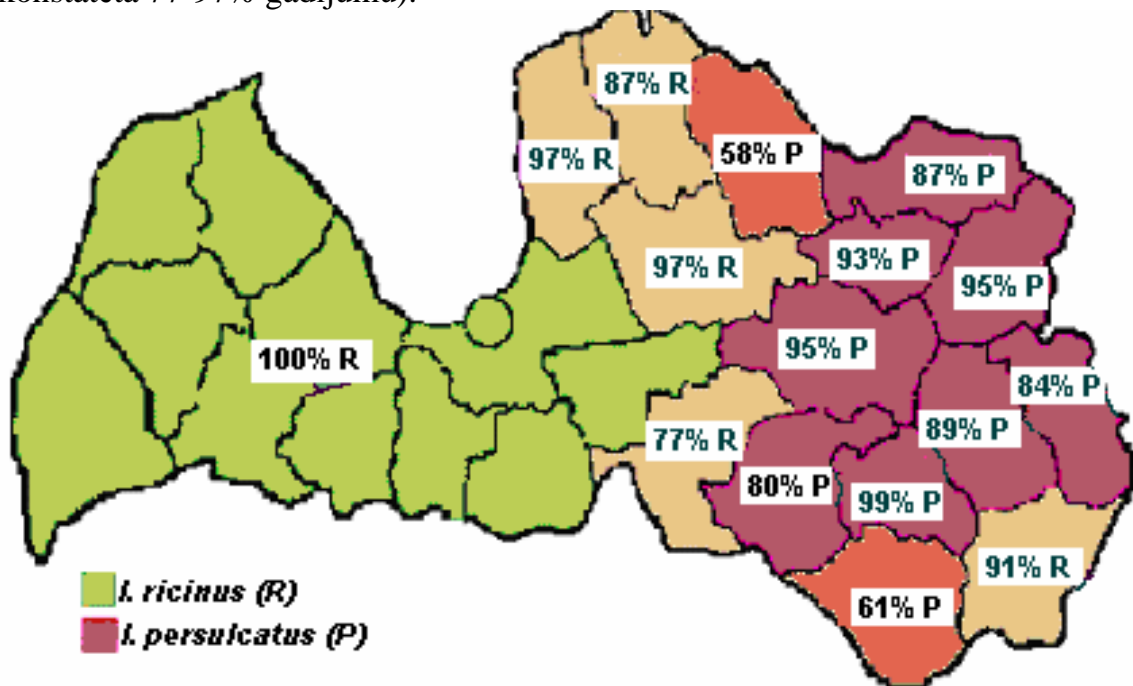
6.1.1. Ērcu sugu izplatība Latvijā

Ilggadīgi novērojumi liecina (Skadiņa, npublicēti novērojumi; Grīnbergs, 1986), ka ar ērcu pārnestām infekcijām Latvijā ir saistītas divas *Ixodidae* ērcu sugas – *Ixodes ricinus* L. un *Ixodes persulcatus* P.Sch. Arhīva ieraksti un novērojumi liecina, ka Latvijā konstatēta arī *Dermacentor reticulatus*, tomēr šī ērcu suga mūsu valstī ir bijusi pārāk reti sastopama, lai būtu epidemioloģiski nozīmīga.

Kopš 1995. gada veiktās no dažādiem Latvijas rajoniem piegādāto *Ixodes* ērcu sugu identifikācijas rezultāti atklāj abu sugu aptuvenu sadalījumu Latvijas teritorijā (9. att.). Latvijas rietumu un centrālās daļas rajonos konstatētas tikai *I. ricinus* sugas ērces

(Bormane et al., 2004). Latvijas austrumu rajonos (Alūksnes, Balvu, Gulbenes, Jēkabpils, Ludzas, Madonas, Preiļu un Rēzeknes rajonos) kā dominējošā suga konstatēta *I. persulcatus* (58-99% gadījumos no kopējā savāktā ērcu skaita 1995. – 2006. gadā).

Savukārt atsevišķos Latvijas ziemeļu un dienvidaustrumu rajonos (Valkas, Valmieras, Limbažu, Aizkraukles, Cēsu, Daugavpils un Krāslavas rajonos) vairākumā atrastas *I. ricinus*, vai arī abas sugas dažādās, katru gadu mainīgās attiecībās (*I. ricinus* konstatēta 77-97% gadījumu).



9. attēls. *Ixodes* ērcu sugu izplatība Latvijā un to procentuālais sadalījums no 1995. līdz 2006. gadam Latvijas rajonos savāktajās morfoloģiski identificētajās 21140 ērcēs (dati iegūti pētījuma ietvaros)

6.1.2. Morfoloģiski noteikto *Ixodes* ērcu sugu molekulāra apstiprināšana

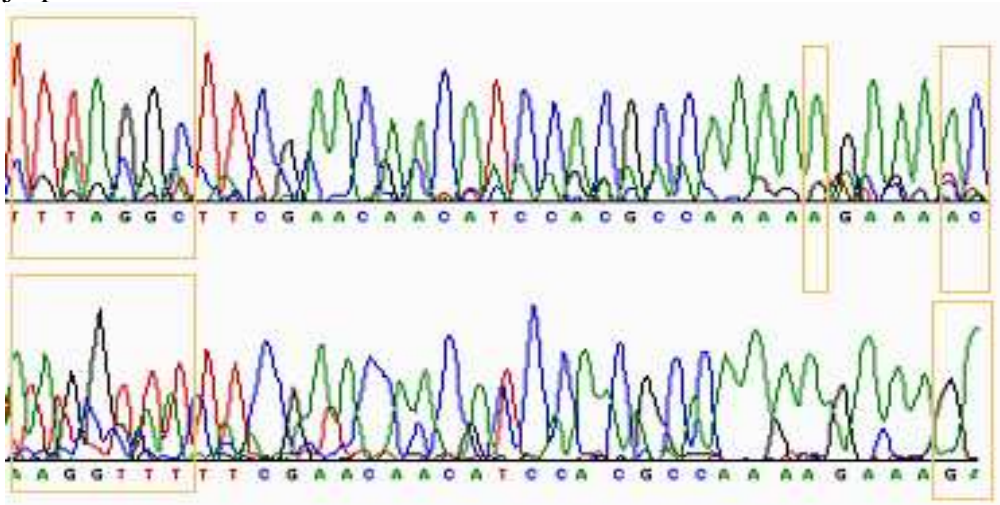
Lai pārbaudītu pēc morfoloģiskām pazīmēm noteikto ērcu sugas piederību, izlases veidā tika amplificēti un sekvencēti *Ixodes* ērcu ITS2 gēna fragmenti. Kopumā pārbaudītas 20 ērces (12 *I. persulcatus* un 8 *I. ricinus*) no Rīgas, Krāslavas, Ludzas, Madonas un Valmieras rajona).

Morfoloģiski noteiktā sugu piederība noteikta pareizi 17 paraugiem, sekvences nebija lasāmas 3 gadījumos. Līdzība ar NCBI datu bāzes attiecīgo sugu sekvencēm bija 85-96%. Metode optimizējama sekvenču tīrības un homogenitātes palielināšanai.

Neskatoties uz pētījumos atklāto 5.8S rRNA - ITS2 - 28S rRNA gēnu rajona nelielo heterogenitāti vienas sugas ietvaros (Rich et al., 1997), minētais gēnu fragments abām sugām tomēr atšķiras pietiekami, lai varētu izmantot *I. ricinus* un *I. persulcatus* diferencēšanai. Atšķirību skaits 789 bāzu garā gēnu fragmentā, kas noteikts ar MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* programma, versija 3,1) pāru distanču aprēķina palīdzību ir 86 (p distance 0,11).

Nukleotīdu atšķirības ITS2 gēna fragmentā (10. att.) atrodamas vidēji ik pēc 10-20 nukleotīdiem diezgan vienmērīgi visa fragmenta garumā, un abas ērcu sugas

iespējams diferencēt vienlīdz labi, sekvenčušanai izmantojot gan tiešo, gan reverso iekšējo praimeru.

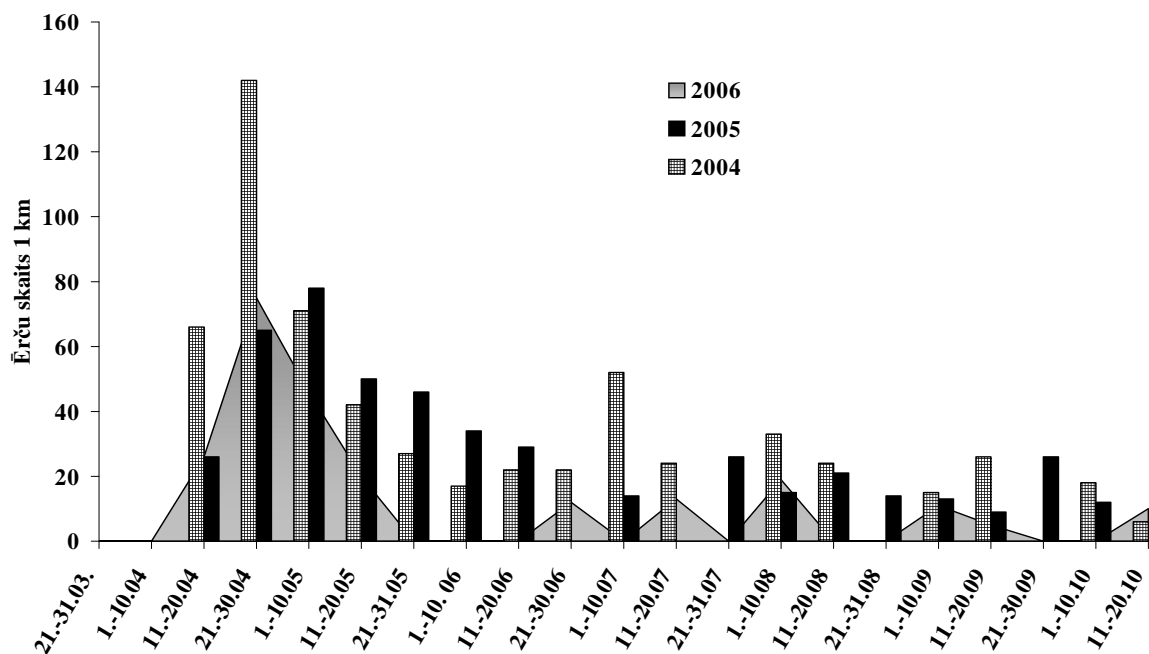


10. attēls. *I. ricinus* (augšējais attēls) un *I. persulcatus* (apakšējais attēls) sekvenētā ITS2 gēna fragmenta nukleotīdu secības atšķirības (iezīmētas ar oranžu) attēlotas, izmantojot *ContigExpress* un *Paint* datorprogrammas

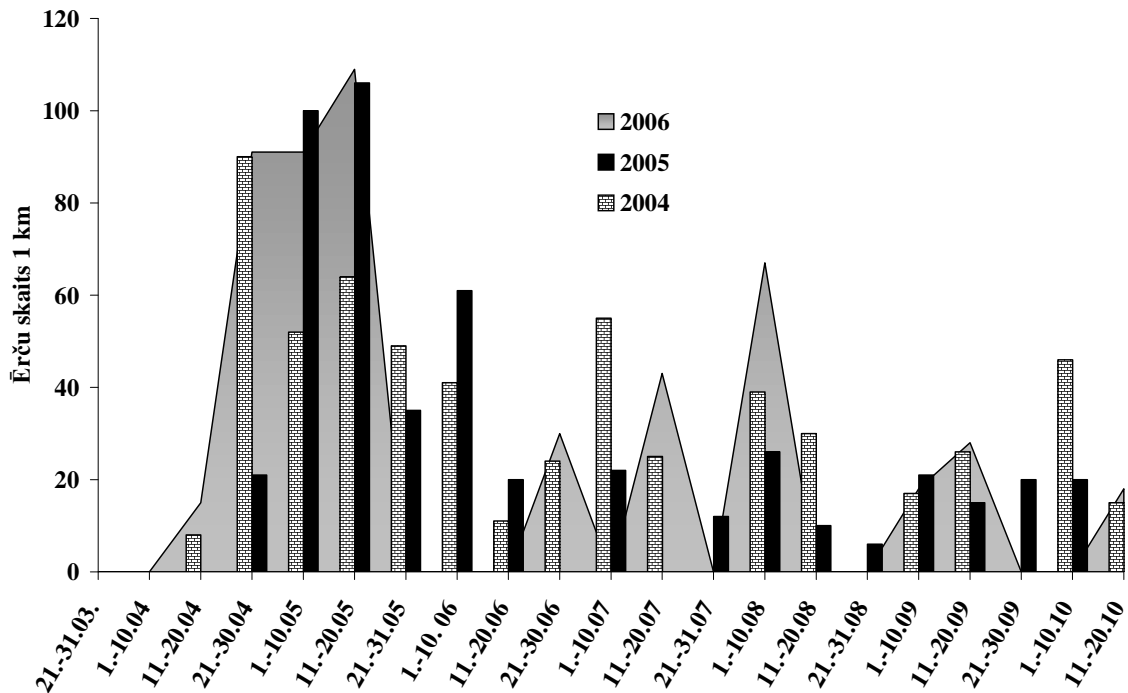
6.1.3. *Ixodes* ērcu sezonālā un ikgadējā aktivitāte

Ixodes ricinus un *Ixodes persulcatus* masveida aktivitāte Latvijā iesākās, kad nokūst sniegs. Pavasarī saulainā laikā ērcu tika aktivitāte reģistrēta arī, ja augsnes virskārtā bija salnas (-1 vai -2°C).

I. ricinus pieaugušām ērcēm un nimfām Latvijā raksturīgs garš sezonālās aktivitātes periods: no marta beigām līdz novembra vidum ar diviem vai visbiežāk 3-4 aktivitātes pacēlumiem sezonas laikā: pavasarī, vasaras vidū, un mazāk izteiktu (īpaši pēdējos gados) arī rudenī (11. un 12.att).



11. attēls. *I. ricinus* pieaugušo ērcu aktivitāte Tīreļu mežniecībā 2004. –2006. gadā (dati iegūti pētījuma ietvaros)



12. attēls. *I. ricinus* nimfu aktivitāte Tīreļu mežniecībā 2004. –2006. gadā (dati iegūti pētījuma ietvaros)

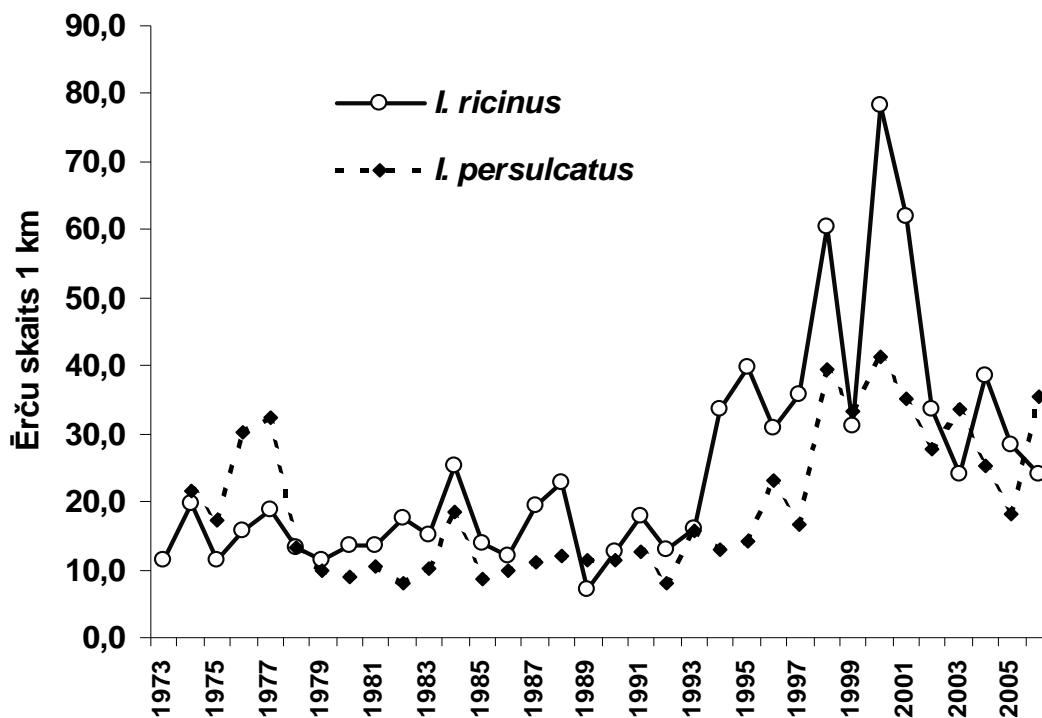
Pieaugušo *I. persulcatus* ērču aktivitāte parasti ilgusi līdz jūlijam ar vienu aktivitātes pacēlumu (vai diviem), parasti maijā (jūnijā). *I. persulcatus* nimfas konstatētas arī rudenī. Kopš 2000. gada tehnisku problēmu dēļ šīs sugas ērču sezonālo aktivitāti gan nav bijis iespējams noteikt ar monitoringam pietiekošu regularitāti, tādēļ iegūto vidējo sezonālo datu ticamība varētu būt apšaubāma.

I. persulcatus ērču pieaugušai attīstības stadijai sezonālā aktivitāte ilgusi līdz jūlijam, bet nimfas ir aktīvas visu sezonu, bet to daudzums *I. persulcatus* monitoringa vietā (un arī pārējā šīs sugas areālā) parasti ir bijis tikai dažī īpatņi uz karoga (1 km maršrutā). Līdz 1995. gadam nav datu, kas liecinātu, ka *I. persulcatus* monitoringa vietās būtu atrastas arī *I. ricinus* sugas ērces. 1996. gadā šajā monitoringa vietā tika atrastas 3% *I. ricinus*, 1997. gadā – 11%, 1998. gadā – 2%, 1999. gadā – 2,4%, 2001. gadā – 20,4%, 2002. gadā – 3,5%, 2003. gadā – 4,3%, 2004. gadā – 12,8%, 2005. gadā – 8,8%, bet 2006. gadā – tikai 2% *I. ricinus* pieaugušās ērces, turklāt tika reģistrēts salīdzinoši ievērojams *I. persulcatus* nimfu pacēlums.

Novērojumu periodā kopš 1973. gada (13. att.) abu sugu ērču ikgadējais aktivitātes līmenis bijis mainīgs – kopš 1990. gadu sākuma *I. ricinus* imago vidējais skaits izmainījies seškārtīgi (no 12,6 ērcēm uz 1 km sezonā līdz 78,3 ērcēm), bet *I. persulcatus* imago – tikai 3,6 reizes (no 11,5 līdz 41,3 ērcēm uz 1 km). Tomēr abu sugu pieaugušo ērču aktivitātes tendences korelācija no 1973. līdz 2005. gadam (2006. gadā arī *I. ricinus* aktivitāte abās monitoringa vietās tika reģistrēta nepietiekoši bieži) ir diezgan augsta 0,72 ($p > 0,05$).

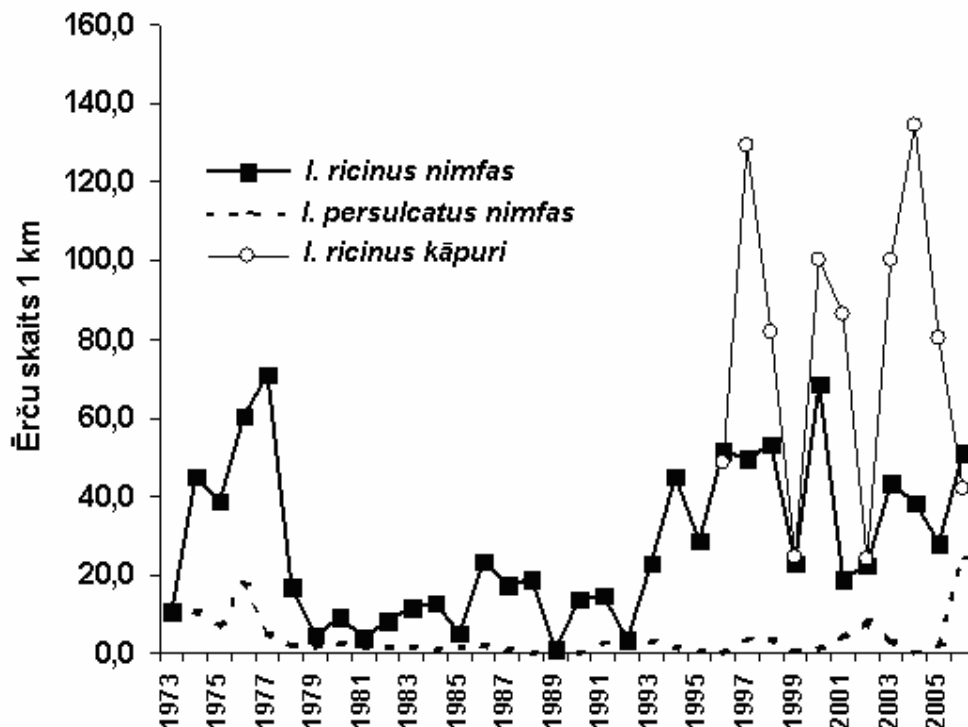
I. ricinus pieaugušo ērču aktivitāte palielinājās 1994. gadā, kam sekoja vēl ievērojamāks kāpums 1998. gadā, bet visaugstākā aktivitāte – 78,3 ērces uz 1 km

sezonā – tā sasniedza 2000. gadā, kam atkal sekoja aktivitātes kritums. *I. persulcatus* imago aktivitātei šajā laika periodā reģistrētas mazāk izteiktas svārstības, kaut arī to tendence līdzīga; 1998. gadā vidējais *I. persulcatus* imago skaits uz 1 km bija 39,4, 2000. gadā – 41,3, kam sekoja ērcu aktivitātes pazemināšanās.



13. attēls. *I. ricinus* un *I. persulcatus* pieaugušo ērcu ikgadējā vidējā aktivitāte Tīreļu un Saikavas monitoringa vietās (no 1973.-1994. gadam izmantoti SVA arhivētie dati (J.Skadiņa); no 1995. gada dati iegūti pētījuma ietvaros)

Ixodes ērcu preimarginālo attīstības stadiju ikgadējās izmaiņas abām sugām ir atšķirīgas: *I. ricinus* un *I. persulcatus* nimfu izmaiņu tendencei pa gadiem līdzība nav statistiski nozīmīga (korelācijas koeficients – 0,42; $p < 0,05$), bez tam uzskaitīto *I. persulcatus* nimfu daudzums vidēji ikgadus ir gandrīz 10 reizes zemāks nekā *I. ricinus* nimfu daudzums. *I. ricinus* nimfu skaita izmaiņu līknei ir korelācija ar *I. ricinus* imago skaita izmaiņu līkni ($r = 0,52$; $p > 0,05$), kas liecina, ka abu šīs sugas ērcu attīstību stadiju aktivitātes vidējā ikgadējā tendence ir līdzīga, tomēr līdzība nav ļoti izteikta. Kāpuru uzskate uz karoga sāka 1986. gadā, un novēroto ikgadējo skaita svārstību frekvence un amplitūda ir ievērojama – no 24,2 līdz 134,4 (14. att.).

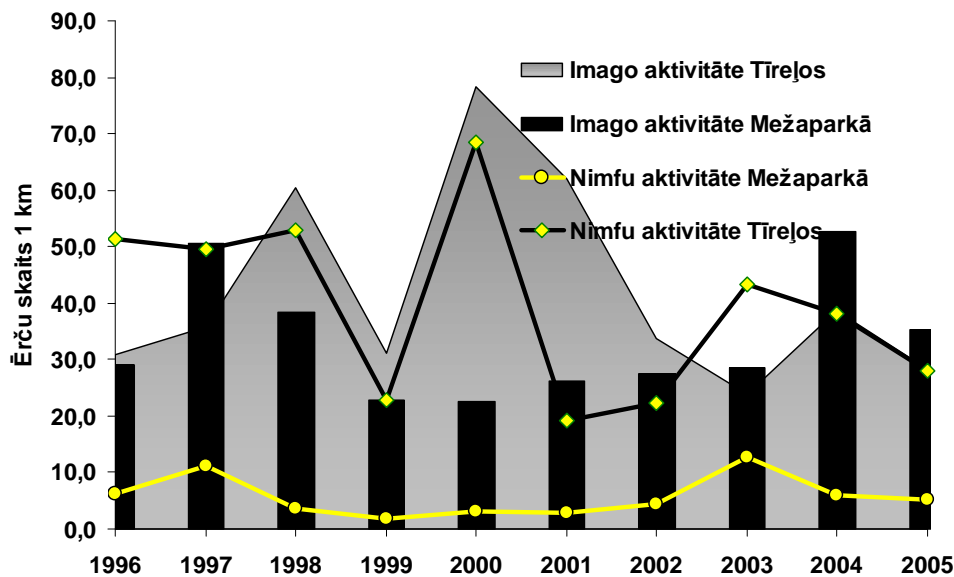


14. attēls. *I. ricinus* un *I. persulcatus* preimarginālo attīstības stadiju ikgadējā vidējā aktivitāte Tīreļu un Saikavas mežniecības monitoringa vietās (no 1973.-1994. gadam izmantoti SVA arhivētie dati (J.Skadiņa); no 1995. gada dati iegūti pētījuma ietvaros)

Nimfu aktivitāte Tīreļu mežniecības pastāvīgajā monitoringa novērošanas vietā vienmēr bijusi augstāka vai līdzīga pieaugušo ērcu aktivitātei, katru gadu uz karoga tiek konstatēti arī simti kāpuru, savukārt monitoringa vietā Mežaparkā, Rīgā, nimfu skaits vienmēr bijis salīdzinoši ļoti zems, un kāpuri uz karoga novēroti reti un minimālā daudzumā (15. att.). Šāda īpatnība novērota arī citās ērcu uzskaites vietās, un jāatzīmē, ka arī vietās, kur ar karoga metodi uzskaitīto nimfu un kāpuru daudzums gadu no gada bijis minimāls, pieaugušo ērcu blīvums saglabājies augsts gadu no gada (vidēji 100 ērcu uz karoga/ 1 km).

Atsevišķās vietās to varētu izskaidrot ar veģetācijas blīvumu – blīvi un augsti saauguši krūmāji un lakstaugi mehāniski aizkavē ērcu preimarginālo stadiju pieķeršanos karogam, jo tās parasti uzturas zemāk nekā pieaugušās attīstības stadijas. Tomēr tas nevar būt vienīgais izskaidrojums, jo ilggadīgi novērojumi liecina, ka Mežaparkā atsevišķos uzskaites nogabalos zemsedzes veģetācija vietās ar pietiekoši augstu ikgadēju pieaugušo ērcu blīvumu, bet zemu nimfu blīvumu, ir salīdzinoši mazattīstīta.

Ērcu nerandomizēto izplatības paraugu pat salīdzinoši vienmērīgā biotopā (Estrada-Pena, 1999), iespējams, nosaka ne tik daudz veģetācijas īpatnības, bet to attīstības stadiju izbarotāju sugu pārvietošanās trajektorijas un blīvums. Bez tam ērcu aktivitāte ir atšķirīga arī diennakts laikā.



15. attēls. *Ixodes ricinus* imago un nimfu aktivitāte Tīreļu un Mežaparka monitoringa vietās (dati iegūti pētījuma ietvaros)

Ērču uzskaitē Latvijā tika veikta g.k. no rīta (10.00-12.00), bet pētījumi Skotijā (Frank et al., 1998) liecina, ka atklātās teritorijās (pļavās) *I. ricinus* visu stadiju ērču aktivitātes diennakts ritmam raksturīgs augstākais aktivitātes pacēlums nakts laikā (no 23.00 - 3.00), nevis no rīta, kad veikta ērču uzskaitē. Atbilstoši Krievijas zinātnieku pētījumiem mežu biotopos (Filipova, 1985) tieši nimfu, nevis imago, diennakts aktivitātes ritms ir izteiktāks krēslas stundās un naktī, kad aktīvāki ir peļveidīgie grauzēji un sīkie zīdītāji.

Tas varētu norādīt uz iespēju, ka atšķirīgos biotopos ērču attīstības stadiju diennakts ritms varētu būt atšķirīgs un pielāgots tur dominējošo attiecīgās stadijas izbarotāju, t.sk. arī attiecīgo putnu sugu, aktivitātei.

Salīdzinot *I. ricinus* ērču aktivitāti Tīreļu un Mežaparka monitoringa vietās, jāsecina, ka atšķirīgas bijušas arī to aktivitātes ikgadējās tendences ($r=-0,19$ imago, un $r=0,25$ nimfām; $p<0,05$). 2000. gadā, kad tika reģistrēts augstākais ērču pacēlums Tīreļu monitoringa vietā, Mežaparkā bija salīdzinoši zems ērču aktivitātes līmenis.

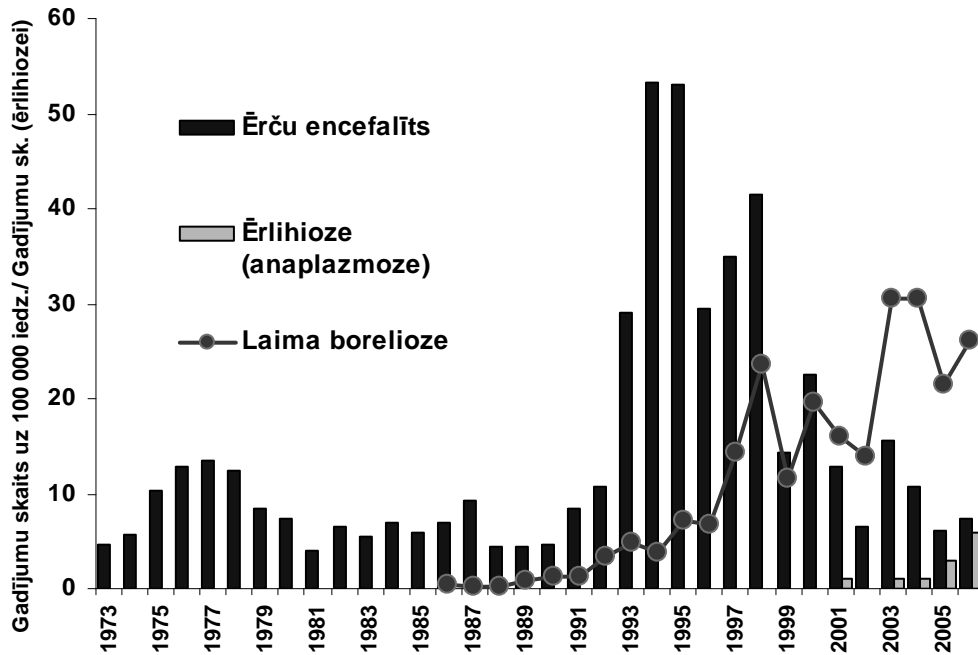
Tomēr tas varētu būt izskaidrojams ar meža tīrīšanas un izciršanas darbiem 1999. gada rudenī, kas skāra visus ērču uzskaites maršrutus. Jāatzīmē, ka ērču nimfu aktivitātes pacēlums Mežaparkā 2003. gadā, un tam sekojošais imago skaita pieaugums 2004. gadā liecina par ērču vietējās populācijas atjaunošanos saistībā ar ievērojami sakuplojušo pamežu 3-4 gadus pēc meža tīrīšanas.

6.2. Ērču pārnesto infekcijas slimību epidemioloģija Latvijā

6.2.1. Ērču encefalīta incidences tendences

Ērču encefalīts Latvijā tiek reģistrēts no 1955. gada, un kopš šī laika saslimšanas gadījumi ir reģistrēti visos Latvijas rajonos, tomēr incidence bijusi

atšķirīga ģeogrāfiski un laikā (16. att.). Augstākie saslimstības pacēlumi Latvijā bija novēroti 1994. un 1995. gadā (1366 gadījumi, incidences rādītājs 53 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem).



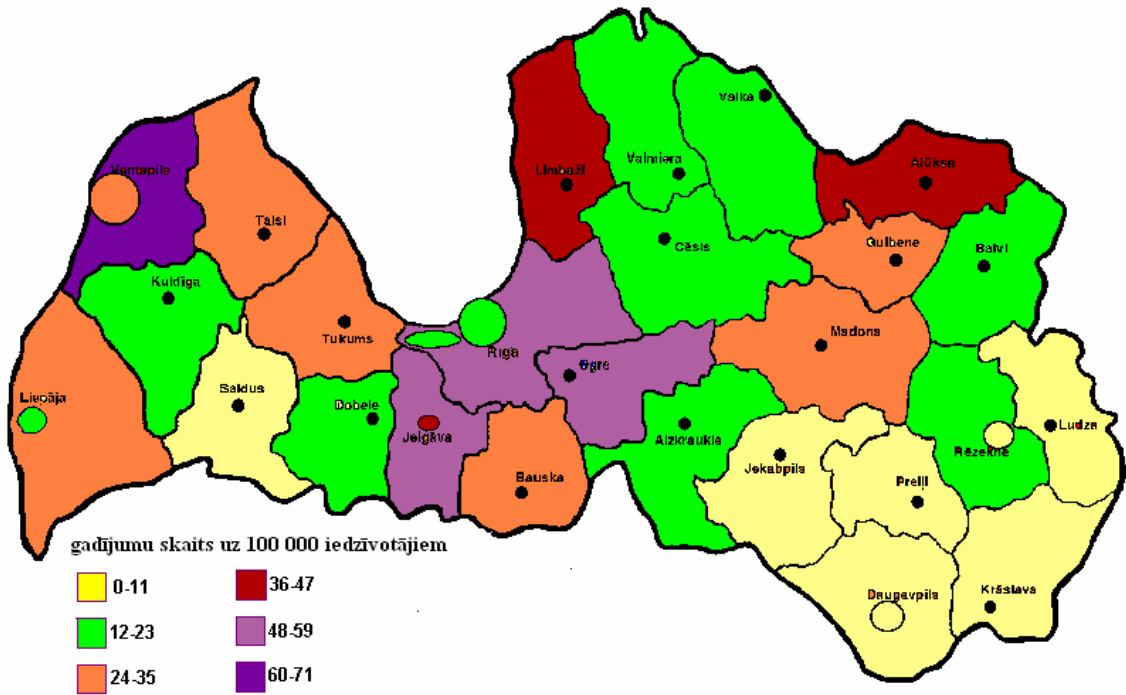
16. attēls. Ērču pārnesto infekciju (ērču encefalīta, Laima boreliozē un ērlihiožu (anaplazmožu) incidence (ērču encefalītam un Laima boreliozēm) un saslimstība jeb absolūtais gadījumu skaits (ērlihiozei) Latvijā

Lai gan kopš 1998. gada saslimšanas gadījumu skaitam ir tendence kristies, tomēr tā nav vienmērīga, jo 2000., 2003. un 2006. gadā novēroti nelieli gadījumu skaita pacēlumi.

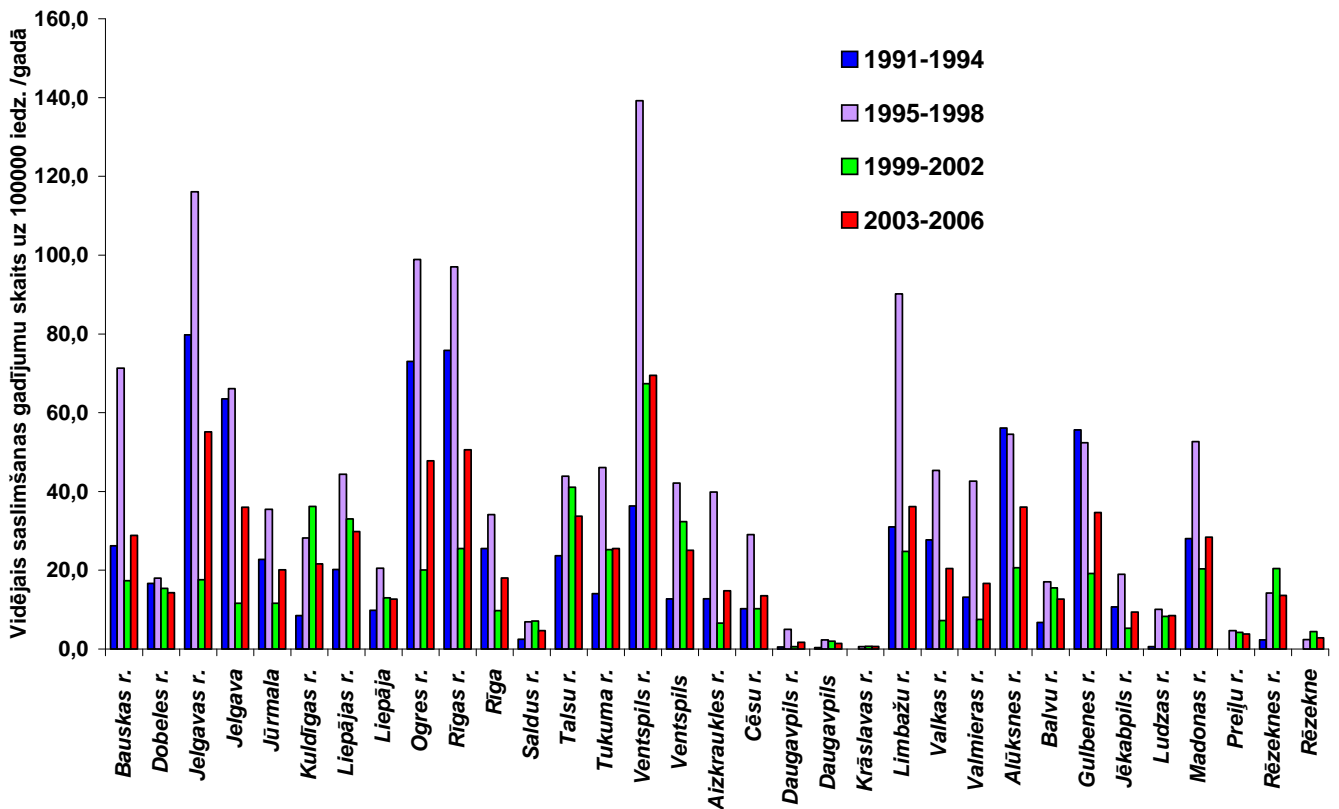
Klīniskie dati novērošanas periodā liecina, ka aptuveni 60% no visām ērču encefalīta klīniskām formām bijušas meningeālas, 30% drudža, un 10% vissmagākā – meningeālā. Vairāk nekā 70% no visiem ērču encefalīta gadījumiem pēdējo gadu laikā bijuši vidēji smagi, 17-18% smagi, bet 7-10% viegli (Bormane, 2004; SVA statistiskie dati (I.Lucenko)).

Ērču encefalīta incidence Latvijas bijusi atšķirīga (17. att.): laika periodā no 1991. līdz 2006. gadam, kad saslimstībai bija raksturīgas izteiktākās gadījumu skaita svārstības pa gadiem, zemākā vidējā incidence gadā (0-12 saslimšanas gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem) reģistrēta Latgalē un Saldus rajonā, augsta incidence – 47-55 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem) Latvijas centrālajā daļā (Rīgas, Jelgavas un Ogres rajonā), bet visaugstākā (69,5) Ventspils rajonā.

Daļā rajonu (18. att.) incidences līmenis (augstāks vai zemāks) bijis salīdzinoši nedaudz mainīgs minētā perioda laikā (Jūrmalā, Dobeles, Kuldīgas, Liepājas, Saldus, Talsu, Tukuma, Cēsu, Ludzas, Balvu, Preiļu, Jēkabpils u.c. rajonos), kamēr Jelgavas, Bauskas, Ogres, Rīgas, Limbažu, Valkas, Valmieras un Ventspils rajonos izteikts incidences pieaugums reģistrēts no 1995.-1998. gadam.



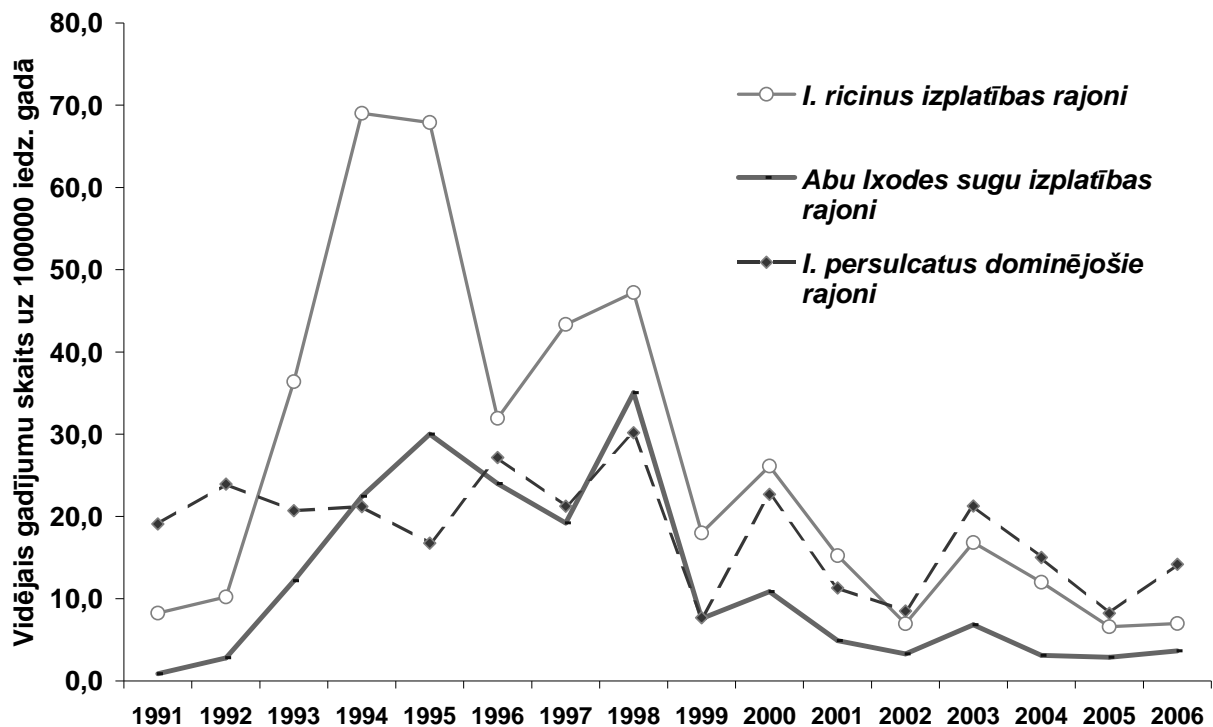
17. attēls. Ērču encefalīta vidējā incidence laika periodā no 1990. līdz 2006. gadam Latvijas administratīvi teritoriālajos rajonos (aprēķināts pēc SVA statistikas datiem)



18. attēls. Ērču encefalīta vidējie intensīvie rādītāji Latvijas rajonos dažādos laika periodos no 1991. – 2006. gadam (aprēķināts pēc SVA statistikas datiem)

Jelgavas, Rīgas un Ventspils rajonā šajā laikā īpaši izteikti pārsniedza pārējos rajonos reģistrēto. Ventspils rajonā, kur reģistrēta salīdzinoši ļoti augsta incidence, tā saglabājusies paaugstināta arī pēdējos gados. Augstākais incidences līmenis tika reģistrēts *I. ricinus* izplatības rajonos, kas ietver Latvijas centrālo daļu, mazāk izteikts *I. persulcatus* dominances rajonos, un zemākais – abu sugu kopējas izplatības rajonos, īpaši Krāslavas un Daugavpils rajonā, kur incidence visa perioda laikā bija ļoti zema.

Ērču encefalīta ikgadējai incidencī *Ixodes ricinus* izplatības rajonos salīdzinot ar abu sugu kopējas izplatības rajoniem un *Ixodes persulcatus* dominances rajoniem, bijusi atšķirīga tendence tieši 1994. un 1995. gadā, kaut arī kopējais korelācijas līmenis kopš 1990. gada bijis visai augsts ($r=0,74$ (ar *I. persulcatus* rajoniem) un $0,89$ (ar mix rajoniem); $p<0,05$). Ievērojams incidences pacēlums 1994. un 1995. gadā vērojams tikai *I. ricinus* izplatības rajonos (19. att), kuros kopš 1990. gada tika reģistrēti 80% no visu ērču encefalīta gadījumu skaita. Augstākais incidences maksimums *I. persulcatus* un abu sugu kopējas izplatības rajonos tika novērots 4 gadus vēlāk - 1998. gadā.

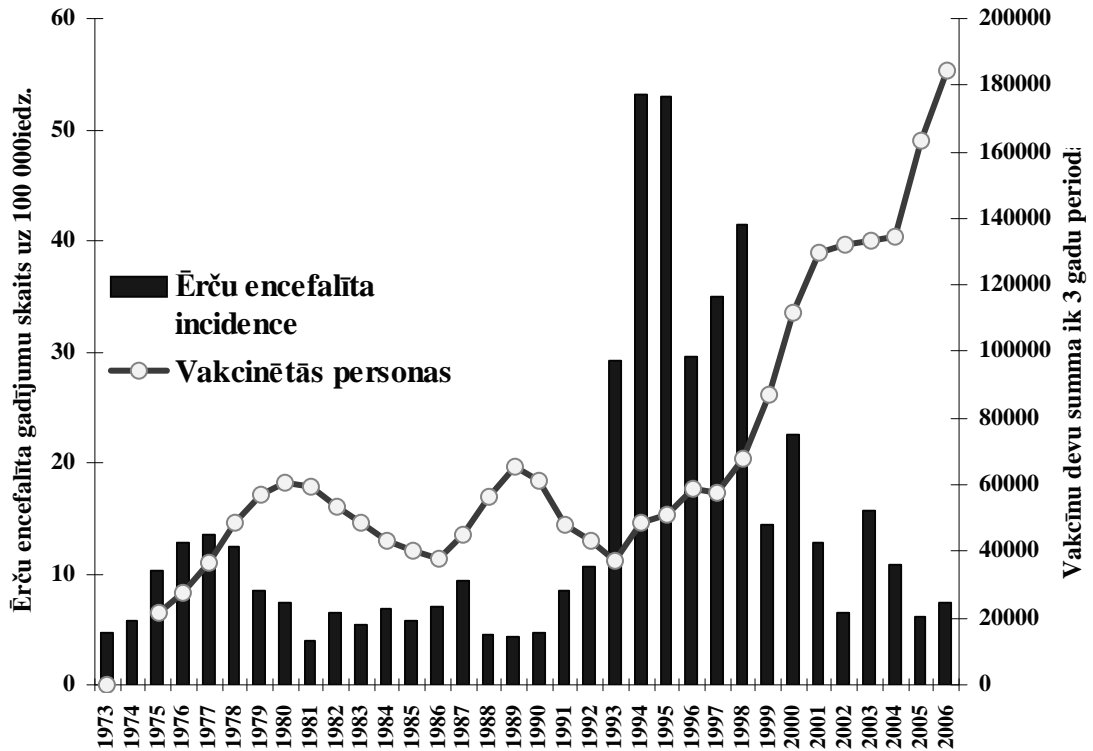


19. attēls. Vidējā ērču encefalīta incidence *Ixodes* sugu izplatības areālos Latvijā no 1991. līdz 2006. gadam (aprēķināts pēc SVA statistikas datiem)

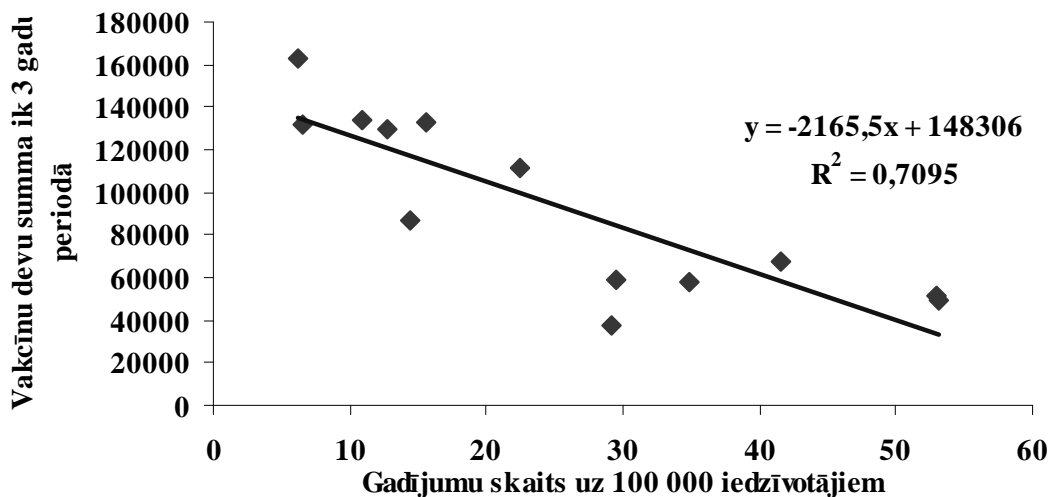
Lai gan pret ērču encefalītu imunizēto cilvēku skaits kopš 1990. gadu vidus ir pieaudzis, nepilnīgie vakcīnu uzskaites statistikas norāda, ka tikai aptuveni $8,0\pm 0,02\%$ ($p<0,05$) Latvijas iedzīvotāju varētu būt imunizēti pret ērču encefalītu. Npublicēti SKDS dati par iedzīvotāju attieksmi pret vakcināciju gan uzrāda ievērojami augstāku rādītāju - 26%. Jāatzīmē, ka ikgadējais imunizēto iedzīvotāju skaits pēdējās desmitgades laikā atbilstoši statistikas datiem par vakcīnu izlietojumu norāda, ka vidēji $0,3-2,0\%$ iedzīvotāju ikgadus saņēmuši pilnu vakcinācijas kursu.

Ikgadus izlietoto vakcīnu devu skaits pieaug, savukārt saslimstība ar ērču encefalītu samazinās (20. att.), uz to norāda arī ikgadējo ērču encefalīta incidences un

pabeigtas imunizācijas (ikgadējo izlieto to vakcīnu skaita) izmaiņu negatīvā korelācija kopš 1993. gada ($r = -0,59$; $p < 0,05$).



20. attēls. Ērču encefalīta incidences un iedzīvotāju imunizācijas (pabeigtas vakcinācijas devu skaita) saistība no 1973. līdz 2006. gadam (aprēķināts pēc SVA statistikas datiem)



21. attēls. Ērču encefalīta incidences un imunizācijas korelācija no 1993. līdz 2006. gadam (aprēķināts pēc SVA statistikas datiem)

Salīdzinot šajā periodā, kad bija novērotas vislielākās ērču encefalīta incidences ikgadējās svārstības, teorētiski imūno personu skaitu, t.i. pabeigtas vakcinācijas un

revakcinācijas devu summu katru 3 gadu periodā (21. att.), negatīvā korelācija ir vēl izteiktāka ($r = -0,84$; $p < 0,05$).

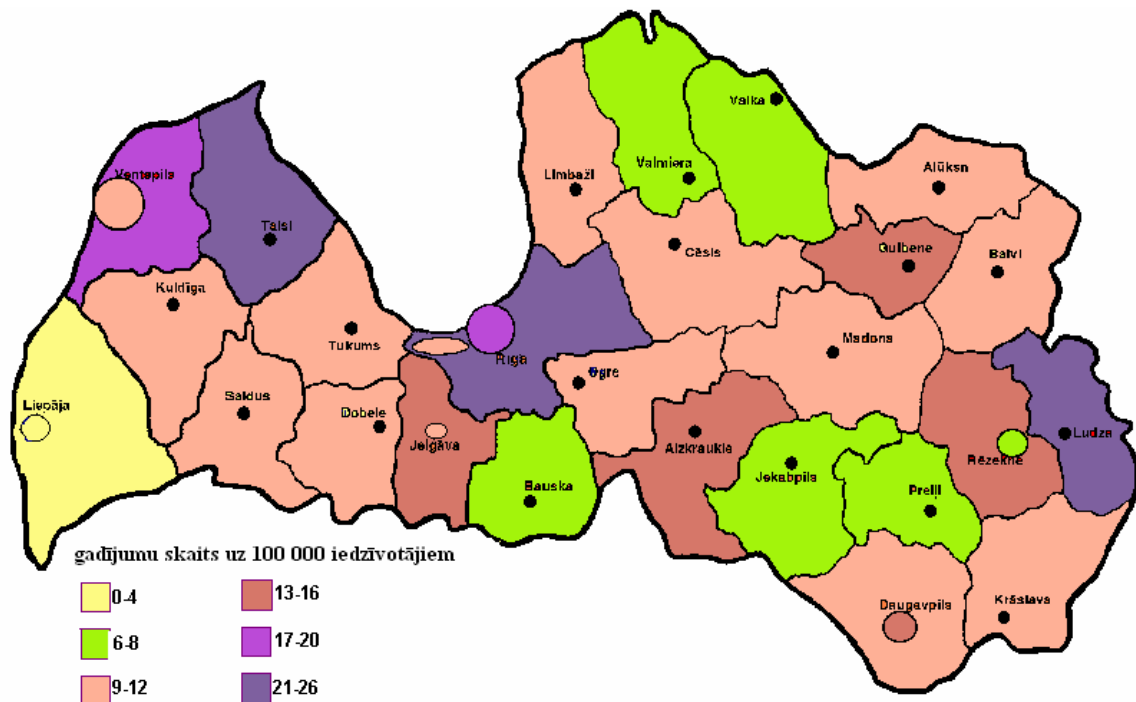
Tomēr, neskatoties uz matemātiski ticamo tendenci, vakcinācija varētu būt tikai viens no faktoriem, kas ietekmējuši ērcu encefalīta incidences tendenci ilgākā laika periodā, jo imunizētās populācijas daļa tomēr ir neliela.

6.2.2. Laima boreliozes incidences tendences

Laima boreliozes tiek reģistrēta kopš 1996. gada, un tai ir atšķirīga ikgadējā incidences tendence nekā ērcu encefalīta incidences tendencei (korelācijas koeficients abu minēto infekciju incidences datiem no 1986. – 2006. gadam neuzrāda korelāciju ($r = 0,03$; $p > 0,05$).

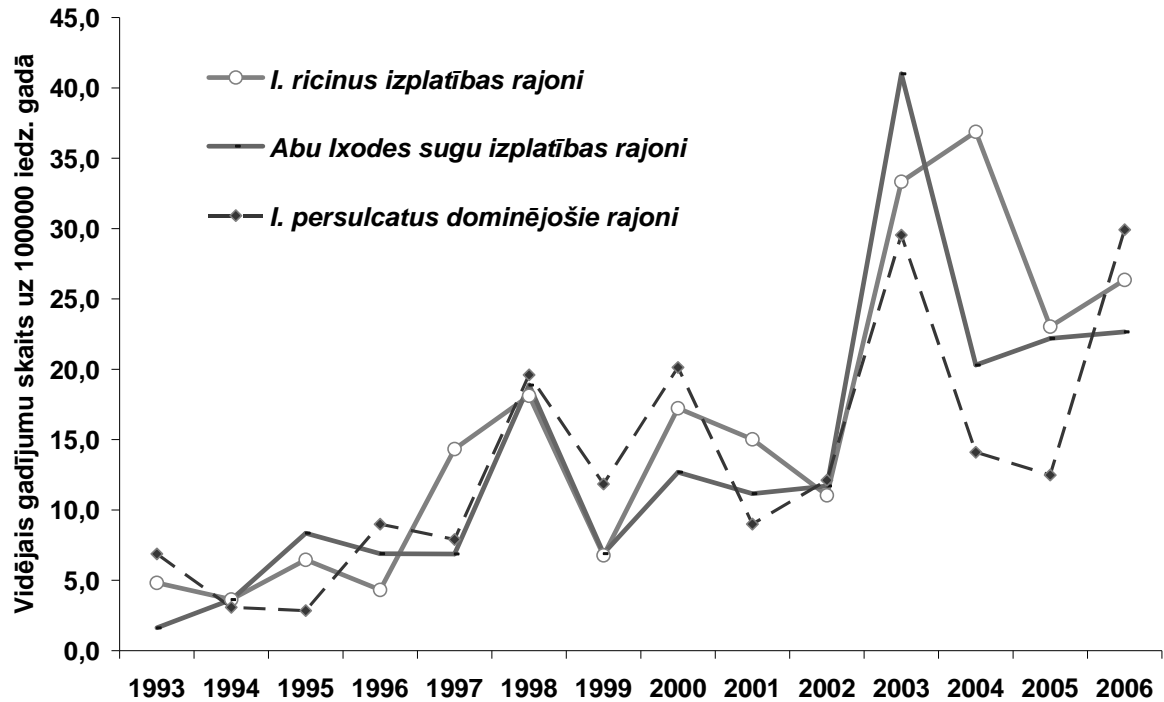
Augstākā šīs slimības incidence tika reģistrēta 2003. un 2004. gadā (30,6 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem jeb attiecīgi 714 un 710 saslimšanas gadījumi). Laika periodā no 1991. līdz 2006. gadam zemākā vidējā incidence gadā (0-4 saslimšanas gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem) reģistrēta Liepājas rajonā, augstāka incidence – 13-20 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem – Rīgā, Daugavpilī, Jelgavas, Ventspils, Rēzeknes, Aizkraukles un Gulbenes rajonos, bet visaugstākā (21-26) Ludzas, Talsu un Rīgas rajonā (22. att.).

Lielākajā daļā rajonu Laima boreliozes augstākais incidences līmenis reģistrēts laika periodā no 2003. – 2006. gadam.



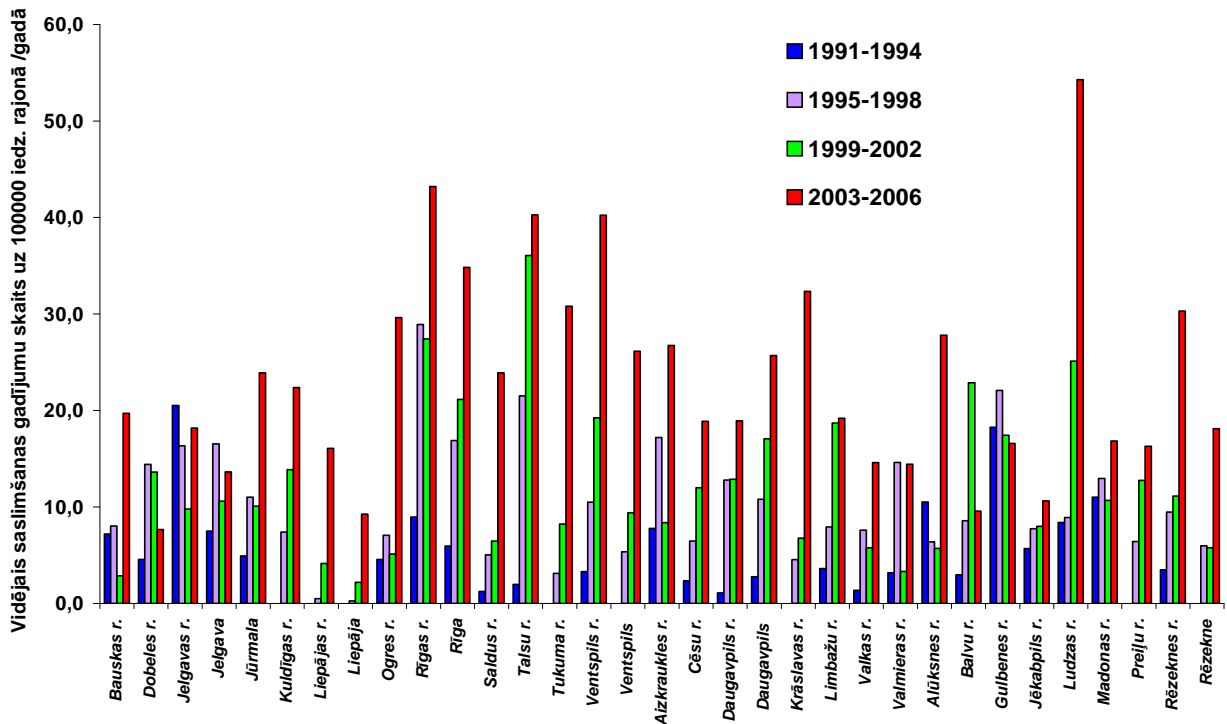
22. attēls. Laima boreliozes vidējā incidence laika periodā no 1990. līdz 2006. gadam Latvijas administratīvi teritoriālajos rajonos (aprēķināts pēc SVA statistikas datiem)

Abu *Ixodes* ērcu sugu izplatības rajonos Laima boreliozes incidences tendence ir ļoti līdzīga (23. att), galvenās atšķirības vērojamas 2003. un 2004. gadā. 2003. gadā novērota maksimālā vidējā incidence *I. persulcatus* izplatības rajonos, bet 2004. gadā – *I. ricinus* izplatības rajonos.



23. attēls. Vidējā Laima boreliožu incidence *Ixodes* sugu izplatības areālos Latvijā no 1993. līdz 2006. gadam (aprēķināts pēc SVA statistikas datiem)

Salīdzinot incidences rādītājus Latvijas rajonos un lielākajās pilsētās (24. att.) dažādos laika periodos kopš 1991. gada, jāsecina, ka augstākais incidences līmenis lielākajā daļā rajonu un pilsētu bijis no 2003. līdz 2006. gadam, izņemot Dobeles, Jelgavas, Balvu un Gulbenes rajonus, kur incidences līmenis dažādos periodos bijis samērā līdzīgs.



24. attēls. Laima boreliožu vidējie intensīvie rādītāji Latvijas rajonos dažādos laika periodos no 1991. – 2006. gadam (aprēķināts pēc SVA statistikas datiem)

Jāatzīmē, ka līdzīgi kā ērcu encefalīta incidencei laika periodā no 1991. – 2006. gadam augsti vidējie rādītāji novēroti Rīgā un Rīgas rajonā un Ventspilī. Tomēr, atšķirībā no ērcu encefalīta izteikti paaugstināta Laima boreliozu incidence bija novērota Ludzas, Talsu un Rēzeknes, kā arī Daugavpils un Krāslavas rajonos. Savukārt Jelgavas rajonā un Jelgavā, un Ogres rajonā nebija reģistrēts augsts incidences līmenis. Jāņem vērā, ka Laima boreliozu gadījumā, īpaši tās reģistrācijas sākuma periodā, ikgadus varētu būt bijis iespējams ievērojams skaits nediagnosticēto saslimšanas gadījumu.

Abu ērcu sugu ikgadējās aktivitātes maksimumi nesakrīt ne ar ērcu encefalīta, ne arī Laima boreliozes incidences augstākajiem pacēlumiem. Tomēr kopējā tendence abu ērcu sugu imago un nimfu ikgadējai aktivitātei un minēto infekciju incidencei ir vairāk vai mazāk līdzīga. *I. ricinus* imago un nimfu kopējai aktivitātei ir korelācija gan ar ērcu encefalīta incidenci ($r=0,56$; $p<0,05$), gan arī, augstāka, ar Laima boreliozes incidenci ($r=0,63$; $p<0,05$); savukārt *I. persulcatus* abu stadiju ērcu aktivitātei ir diezgan cieša korelācija ar Laima boreliozes incidenci (0,76), bet ne ar ērcu encefalīta incidenci.

6.2.3. Ērlihioze (anaplazmoze)

Ērlihiozes (vai anaplazmozes) gadījumi Latvijā tiek reģistrēti tikai kopš 2001. gada. Kopumā laika periodā no 2001. gada līdz 2006. gadam reģistrēti 12 seroloģiski apstiprināti saslimšanas gadījumi (1. tabula); vienā gadījumā slimības gaita bijusi smaga.

Jāatzīmē, ka šī infekcija Latvijā vēl ir maz pazīstama, ko liecina arī gandrīz visos reģistrētajos ērlihiozes gadījumos noteiktā atšķirīgā primārā diagnoze.

1. tabula. Anaplazmozes (ērlihiozes) Latvijā 2001. – 2006. gadā (dati no SVA saslimšanas gadījumu epidemioloģiskās aptaujas kartēm)

Gads	Saslimšanas mēnesis	Latvijas rajons	Primārā diagnoze	Slimības gaita	Laboratoriskās atrades	Piezīmes
2001.	Septembris	Rīga	Masaliņas		IgM +	Ērce nav pamanīta
2003.	Decembris	Rīga	Neskaidras etioloģijas drudzis	Smaga	IgM+	Galīgā diagnoze – ērcu encefalīts klīniski + ērlihioze
2004.	Jūlijs	Rīga	Ērcu encefalīts		IgM +	Inficējās Engurē
2005.	Oktobris	Rīga	Sepse, Ērcu encefalīts, piodermija		IgM +	Ērce nav pamanīta
2005.	Oktobris	Rīgas raj.	Akūts enterīts, Ērcu encefalīts		IgM +	Inficējās Babītes pagastā
2005.	Oktobris	Alūksne	Spondiloze, Laima borelioze, ērlihioze		IgM +	Ērces kodusas 5 reizes
2006.	Maijs	Daugavpils	Laima borelioze		IgM +	Inficējās Nīcgales pagastā, ērci noņēma 1. dienā

2006.	Maijs	Daugavpils	Laima borelioze		IgM +	Inficējās Daugavpilī
2006.	Jūnijs	Rīga	Ērču encefalīts	Vidēji smaga gaita	IgM +	Kodums nav fiksēts, bija dabā
2006.	Jūnijs	Rīga	Ērču encefalīts, Laima borelioze	Vidēji smaga gaita	IgM +	Inficējies Ādažu vai Sužu mežā
2006.	Jūnijs	Daugavpils	Ērču encefalīts, Laima borelioze		IgM +	Inficējies Dubnas pagastā, ērci noņēma 2. dienā
2006.	Augusts	Daugavpils	Ērču encefalīts		IgM +	Inficējies Naujienas pagastā, ērci noņēma 3. dienā

6.3. Patogēnu prevalence *Ixodes* ērcēs

6.3.1. Ērču encefalīta vīruss

6.3.1.1. Ērču encefalīta vīrusa prevalence dabas perēkļos un no pacientiem noņemtās ērcēs (noteikta ar ELISA metodi)

Ērču encefalīta vīrusa ikgadējai vidējai prevalencei, noteiktai ar ELISA metodi SVA Virusoloģijas izmeklējumu laboratorijā, dabas perēkļos savāktām *Ixodes* ērcēm kopš 1995. gada raksturīgas ievērojamas svārstības (2. tabula). Līdz 1994. gadam vidējā ērču inficētība bija 2% (variācijas koeficients 0,73), bet periodā no 1995. līdz 2005. gadam – 6,8 (variācijas koeficients 1,13) un augstākie ikgadējās abu sugu ērču inficētības līmeņi tika reģistrēti 2005. un 2006. gadā (attiecīgi 28,4% un 10,8%).

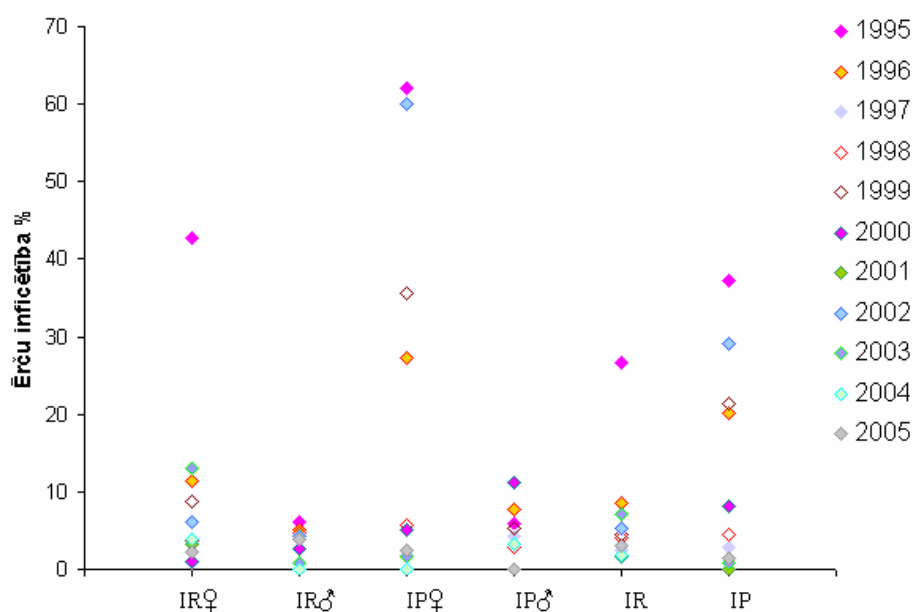
Augsta ērču encefalīta vīrusa prevalence dabā savāktajās *I. ricinus* pieaugušajās ērcēs tika novērota 1995. gadā (26.6%), 1996. gadā (8.5%) un 2002. gadā (5.2%), un *I. persulcatus* ērcēs – 1995. gadā (37.3%), 1996. gadā (20.4%), 1999. gadā (21.3%) un 2002. gadā (29%).

Jāatzīmē, ka paaugstināta ērču encefalīta vīrusa kopējā ikgadējā prevalence dabā savāktās nepiesūkušās ērcēs vairumā gadījumu ir atkarīga no abu sugu mātītēm (25. att.), īpaši *I. persulcatus*. Abu sugu tēviņu ikgadējais inficētības līmenis pēdējo 11 gadu laikā nav pārsniedzis 11,1%.

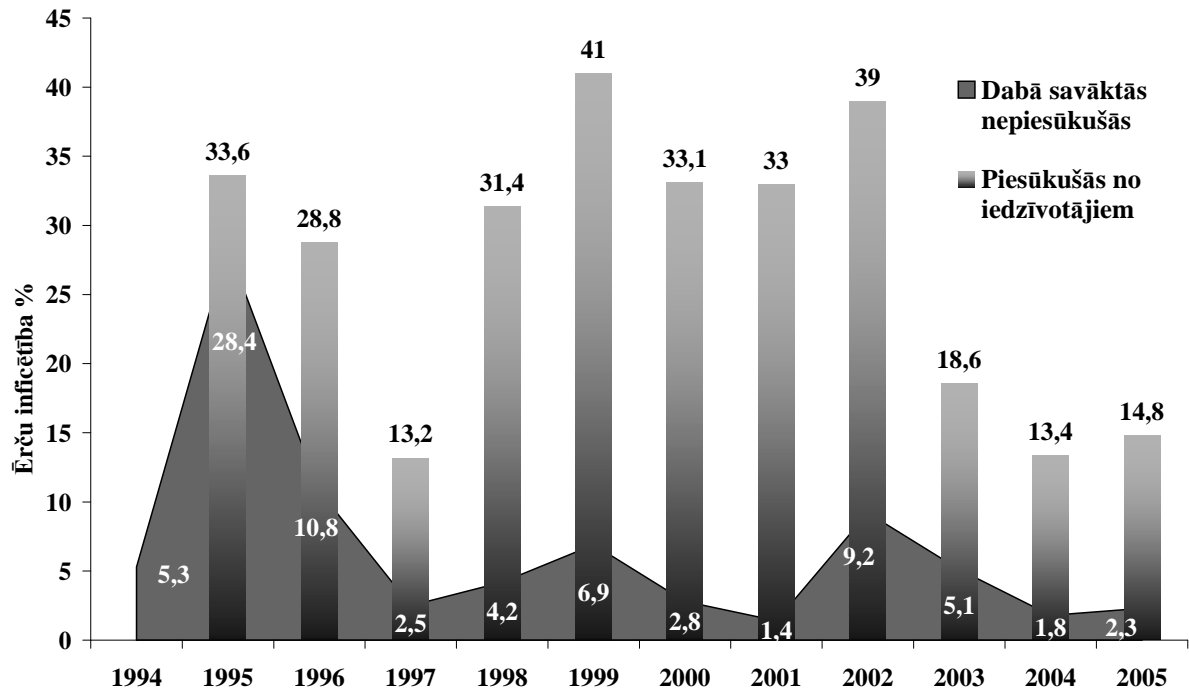
Savukārt novērotā ērču encefalīta vīrusa prevalence ērcēs, kas bija piesūkušās pacientiem (galvenokārt mātītes un nimfas), bijusi aptuveni 10 reizes augstāka. No 1999. gada līdz 2005. gadam ērču encefalīta vīrusa prevalence piesūkušās ērcēs variēja no 13-41% (26. att.). Jāatzīmē, ka, lai gan ikgadējo svārstību tendence vizuāli ir līdzīga – zemākai dabas perēkļos savāktos nepiesūkušos ērču inficētībai attiecīgajā gadā atbilst salīdzinoši zemāka piesūkušos ērču inficētība, un otrādi, tomēr šī tendence nav statistiski nozīmīga ($r = 0,34$; $p > 0,05$). Detalizēts cilvēkiem piesūkušos ērču inficētības pētījums tika veikts 2002. un 2003. gadā (3. un 4. tabula).

2. tabula: Ērcu encefalīta vīrusa prevalences dabas perēkļos savāktām ērcēm 1995. – 2005. gadā (aprēķināts pēc SVA Virusoloģijas izmeklējumu laboratorijas testēšanas rezultātiem (A.Duks, V.Mavčutko))

		1995.g.	1996.g.	1997.g.	1998.g.	1999.g.	2000.g.	2001.g.	2002.g.	2003.g.	2004.g.	2005.g.
		% ± SD	% ± SD	% ± SD	% ± SD	% ± SD	% ± SD	% ± SD	% ± SD	% ± SD	% ± SD	% ± SD
		Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas	Inficētas/ testētas
Vīrusa prevalence <i>I. ricinus</i>	Kopā	26,6% ± 1,30 308/1158	8,5% ± 0,95 73/858	2,4% ± 0,60 15/634	4,4% ± 0,82 28/635	4,5% ± 0,94 22/488	1,8% ± 0,60 9/493	1,7% ± 0,82 4/241	5,2% ± 1,27 16/307	7,2% ± 1,25 16/221	1,9% ± 1,37 2/103	3,0% ± 1,3 5/169
	♀	42,8% ± 1,97 269/629	11,4% ± 1,48 53/465	0,9% ± 0,53 3/327	3,6% ± 1,03 12/331	8,8% ± 1,88 20/228	1,1% ± 0,66 3/263	3,2% ± 1,58 4/125	6,1% ± 1,87 10/164	13,0% ± 3,15 15/115	3,8% ± 2,64 2/53	2,2% ± 1,53 2/92
	♂	6,2% ± 1,05 33/529	5,1% ± 1,11 20/393	3,9% ± 1,11 12/307	4,7% ± 1,22 14/301	0,8% ± 0,54 2/260	2,6% ± 1,05 6/230	0,0% ± 0,84 0/116	4,2% ± 1,68 6/143	0,9% ± 0,94 1/106	0,0% ± 1,89 0/50	3,9% ± 2,22 3/77
Vīrusa prevalence <i>I. persulcatus</i>	Kopā	37,3% ± 3,15 88/236	20,4% ± 2,71 45/221	2,9% ± 0,99 8/281	4,5% ± 1,17 14/314	21,3% ± 4,60 17/80	8,2% ± 3,00 7/85	0,0% ± 2,27 0/41	29,0% ± 5,81 18/62	0,87% ± 0,87 1/115	1,5% ± 1,52 1/66	1,4% ± 1,14 1/88
	♀	61,7% ± 4,23 82/133	27,3% ± 3,74 39/143	1,8% ± 1,05 3/164	5,8% ± 1,77 10/174	35,7% ± 7,48 15/42	5,0% ± 3,49 2/40	0,0% ± 4,00 0/22	60,0% ± 9,10 18/30	1,6% ± 1,64 1/61	0,0% ± 0,56 0/36	2,5% ± 2,50 1/40
	♂	5,8% ± 2,32 6/103	7,7% ± 3,04 6/78	4,3% ± 1,88 5/117	2,9% ± 1,41 4/140	5,3% ± 3,67 2/38	11,1% ± 4,74 5/45	0,0% ± 4,54 0/19	0,0% ± 2,86 0/32	0,0% ± 1,75 0/54	3,3% ± 3,33 1/30	0,0% ± 1,96 0/48



25. attēls. *I. ricinus* (IR) un *I. persulcatus* (IP) mātišu un tēviņu inficētība ar ērcu encefalīta vīrusu (pēc SVA Virusoloģijas izmeklējumu laboratorijas testēšanas rezultātiem (A.Duks, V.Mavčutko))



26. attēls. Piesūkušos un nepiesūkušos *Ixodes* ērcu inficētība ar ērcu encefalītu (aprēķināts pēc SVA Virusoloģijas izmeklējumu laboratorijas testēšanas rezultātiem (A.Duks, V.Mavčutko)

3. tabula. Virusoloģiskai izmeklēšanai atnesto iedzīvotājiem piesūkušos ērcu skaits un inficētība 2002. gada sezonā (aprēķināts pēc SVA Virusoloģijas izmeklējumu laboratorijas testēšanas rezultātiem (A.Duks, V.Mavčutko) un SIA "Vakcinācijas serviss" reģistrācijas datiem)

	<i>Imago</i>	<i>EEV*</i> <i>pozitīvie</i> <i>imago</i>	<i>EEV*</i> <i>prevalence</i> <i>imago %</i> ± SD	<i>Nimfas</i>	<i>EEV*</i> <i>pozitīvās</i> <i>nimfas</i>	<i>EEV*</i> <i>prevalence</i> <i>nimfās %</i> ± SD	<i>Kāpuri</i>	<i>EEV*</i> <i>pozitīvie</i> <i>kāpuri</i>
Aprīlis	10	2	20.0 ± 13.3	7	1	14.3 ± 14.3		
Maijs	72	37	51.4 ± 5.9	39	21	53.9 ± 8.1		
Jūnijs	101	41	40.6 ± 4.9	88	49	55.7 ± 5.3	6	4
Jūlijs	125	31	24.8 ± 3.9	96	28	29.2 ± 4.7	3	2
Augusts	47	16	34.0 ± 7.0	38	17	44.7 ± 8.2	3	0
Septembris	35	10	28.6 ± 7.8	21	11	52.4 ± 11.2		
Oktobris	5	2	40.0 ± 24.5	4	1	25.0 ± 25.0		
Kopā	395	139	35.2 ± 2.4	293	128	43.7 ± 2.9	12	6

*EEV – ērcu encefalīta vīruss

Tika konstatēts, ka 2002. gadā aptuveni puse (395 jeb $56,4 \pm 1,8\%$; $p < 0,05$) no visām iedzīvotāju atnestajām un virusoloģiski pārbaudītajām ērcēm bija imago (g.k. *Ixodes* mātītes), nedaudz mazāk – 293 ($41,9 \pm 1,8\%$; $p < 0,05$) bija nimfas, un 12 ($1,7 \pm 0,5\%$; $p < 0,05$) bija kāpuri.

4. tabula. Virusoloģiskai izmeklēšanai atnesto iedzīvotājiem piesūkušos ērcu skaits un inficētība 2003. gada sezonā (aprēķināts pēc SVA Virusoloģijas izmeklējumu laboratorijas testēšanas rezultātiem (A.Duks, V.Mavčutko) un SIA "Vakcinācijas serviss" reģistrācijas datiem)

	<i>Imago</i>	<i>EEV*</i> <i>pozitīvie</i> <i>imago</i>	<i>EEV*</i> <i>prevalence</i> <i>imago %</i> \pm SD	<i>Nimfas</i>	<i>EEV*</i> <i>pozitīvās</i> <i>nimfas</i>	<i>EEV*</i> <i>prevalence</i> <i>nimfās %</i> \pm SD	<i>Kāpuri</i>	<i>EEV*</i> <i>pozitīvie</i> <i>kāpuri</i>
Aprīlis	6	2	33.3 \pm 21.8	3	0	0.0		
Maijs	92	36	39.1 \pm 5.1	63	5	7.9 \pm 3.6	1	0
Jūnijs	132	61	46.2 \pm 4.4	173	46	26.6 \pm 3.4	0	0
Jūlijs	153	90	58.8 \pm 4.0	295	83	28.1 \pm 2.6	2	0
Augusts	200	35	17.5 \pm 2.7	213	25	11.7 \pm 2.2	12	1
Septembris	394	13	3.3 \pm 0.9	595	38	6.4 \pm 1.0	9	2
Oktobris	27	3	11.1 \pm 6.2	32	6	18.8 \pm 7.0	1	0
Decembris	1	0	0.0	0	0	0.0	0	0
Kopā	1005	240	23.9 \pm 1.4	1374	203	14.8 \pm 1.0	25	3

*EEV – ērcu encefalīta vīruss

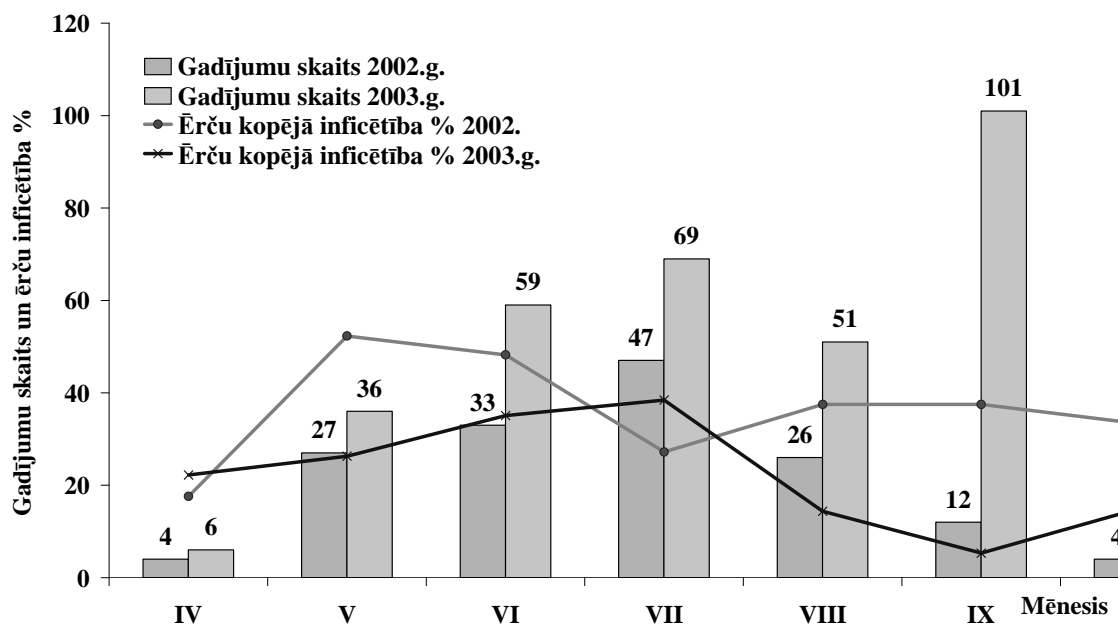
2003. gadā lielākā daļa no ērcēm bija nimfas (1374 jeb $57,2 \pm 1,0\%$; $p < 0,05$). 2002. gadā nimfu inficētība ($43,7 \pm 2,9\%$; $p < 0,05$) ievērojami pārsniedza imago inficētību ($35,2 \pm 2,4\%$; $p < 0,05$), savukārt 2003. gadā bija pretēja tendence – augstāka ērcu encefalīta prevalences bija imago ($23,9 \pm 1,4\%$; $p < 0,05$) nevis nimfām ($14,8 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$).

Ērcu encefalīta vīrusa prevalences pārbaudītajās ērcēs sezonas gaitā bija mainīga: augstākie inficēto imago un nimfu skaiti tika reģistrēti pirmajā sezonas daļā, un prevalences maksimuma līmenis tika novērots jūnijā un jūlijā.

2002. gadā vidējā ērcu encefalīta vīrusa prevalences pieaugušās ērcēs bija 4,2 reizes zemāka nekā cilvēkiem piesūkušās; 2003. gadā atšķirība bija mazāka – 3,7 reizes, bet inficētības līmenis šajā gadā bija zemāks arī dabas perēkļos savāktajās ērcēs. Ērcu encefalīta vīrusa prevalences sezonālā dinamika no pacientiem noņemtās ērcēs 2002. un 2003. gadā neuzrāda statistiski nozīmīgu korelāciju ar ērcu encefalīta gadījumu sezonālo sadalījumu (2002.g. $r=0,32$ un 2003.g. $r=-0,20$; $p < 0,05$), kas

norāda, ka ērcu inficētības līmeņa sezonālās izmaiņas tomēr nav nozīmīgs saslimstību ietekmējošs faktors (27. att.).

Savukārt ikgadējiem (kopš 1973. gada) vīrusa prevalences rādītājiem dabas perēkļos savāktās abu sugu ērcēs un ērcu encefalīta incidencei novērota kopīga tendence ($r=0,63$; $p<0.05$), un tas varētu norādīt, ka ikgadējo ērcu encefalīta incidences līmeni ietekmē ne tikai ērcu aktivitāte, bet arī inficētība.



27. attēls. Ērcu encefalīta saslimšanas gadījumu skaita sezonālais sadalījums 2002. un 2003. gadā un piesūkušos ērcu inficētība (pēc SVA Virusoloģijas izmeklējumu laboratorijas testēšanas rezultātiem (A.Duks, V.Mavčutko) un SVA statistikas datiem)

Atšķirības dabā savāktu un piesūkušos ērcu (g.k. mātīšu un nimfu) inficētība varētu būt izskaidrojama, pirmkārt, jau ar atnesto pieaugušo ērcu dzimumu: arī dabas perēkļos savāktās mātītēs parasti vīrusa prevalence bija augstāka. Iespējams, minimālu vīrusa daudzumu ērcē nav iespējams noteikt, bet ērci uzņemot asinis, tas ātri savairojas. Pastāv arī Krievijas zinātnieku (Alekseev, 1993) hipotēze par to, ka vīrusa penetrācija ērcu nervu sistēmā izraisa ērces uzvedības izmaiņas, ērcēm kļūstot izturīgākām pret nelabvēlīgiem vides apstākļiem (izžūšanu u.c.) un tās ir aktīvākas, uzmeklējot izbarotāju.

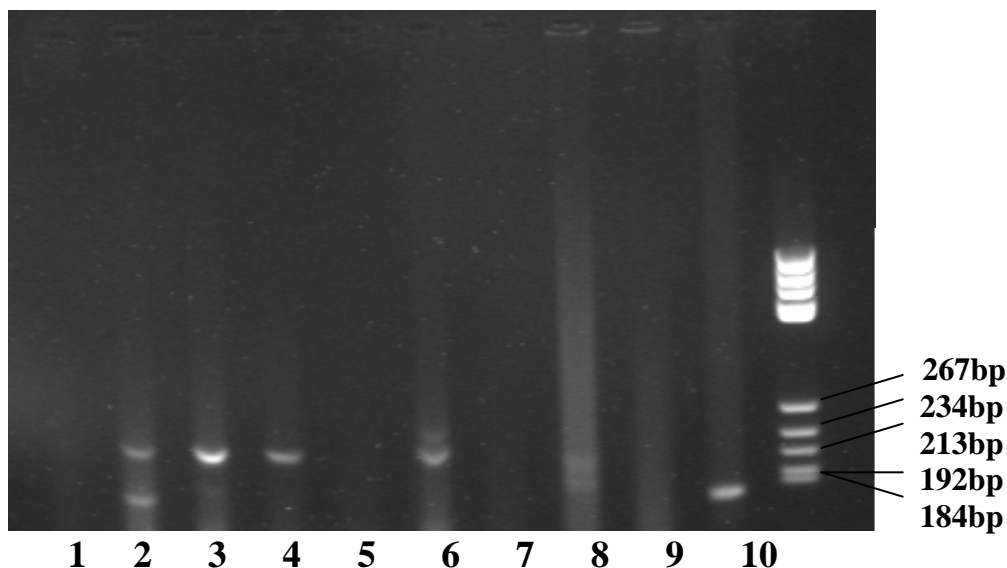
6.3.1.2. Ērcu encefalīta vīrusa detektēšana ar RT-PCR

Ar molekulārām metodēm tika izmeklēti 12 ērcu puli (5 ērces pulā) un 22 ērcu homogenāti no pacientiem, kuros iepriekš ar ELISA metodes palīdzību bija apstiprināta ērcu encefalīta vīrusa klātbūtne.

Kā RT-PCR (reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcija) mērķa gēns tika izmantoti divu gēnu - 5'NCR (nekodējošā reģiona) un NS5 (nestrukturālā) gēnu fragmenti.

Ar 5'NCR gēnu saistītās PCR metodes palīdzību ērcu encefalīta vīrusa prevalence tika atklāta 7 ērcu pulos (no 12), bet tikai vienā no pacientiem noņemto

ērču homogenizātiem. Ar NS5 saistītās PCR metodes palīdzību vīrusa klātbūtne tika konstatēta tikai 3 pulos (no 12). 5'NCR-RT-PCR metodes rezultāti uzrādīja atšķirīgus PCR amplikonu garumus vienai pozitīvajai kontrolei, kas saturēja K23 ērču encefalīta vīrusa štammu, un otrai pozitīvajai kontrolei, kas saturēja *Soffyn* štammu (attiecīgi ~178 bp un ~215 bp). *K23* saturošā parauga amplikona garums bija identisks literatūrā minētajam (Han et al. 2001), bet *Soffin* štammu saturošais amplikons bija garāks, nekā teorētiski sagaidāmais (28. att.).



28. attēls: 5'NCR-RT-PCR metode ērču pulu noteikšanai. 1., 5., 7., 8. joslas: negatīvo ērču paraugu puli; 2., 3., 4., 6. joslas: pozitīvo ērču pulu paraugi; 11. josla – DNS standarta garuma marķieris (100 bp Gene Ruler Ladder+); 9. josla – negatīvā kontrole; 10. josla – pozitīvā kontrole (*K23* štamms)

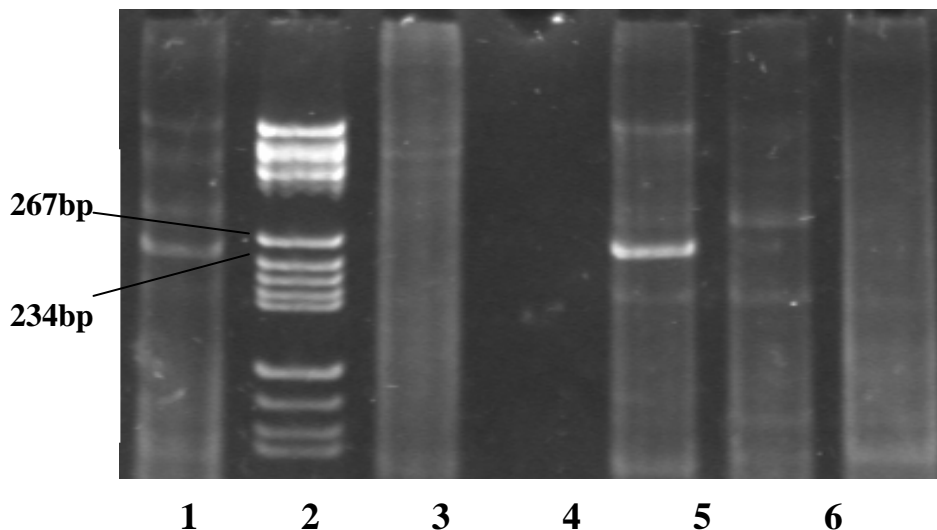
Ar NS5 gēnu saistītās PCR metodes pozitīvās kontroles *K23* gēna fragmenta amplifikācijas produkta garums bija atbilstošs literatūrā aprakstītajam, bet pozitīvā kontrole, kas saturēja *Soffin* štammu, neuzrādīja pozitīvu rezultātu.

5'NCR-RT-PCR metode deva ērču pulu amplifikācijas produktu, kura garums (~220bp) atšķīrās no *K23* štammu saturošās pozitīvās kontroles un bija tuvāk *Soffin* štammu saturošajai pozitīvajai kontrolei. Viens no pozitīvajiem paraugiem deva divus amplikonus, viens no kuriem bija identisks *K23* saturošās kontroles garumam (~178 bp), un pēc sekvencēšanas apstiprināja pozitīvo rezultātu, bet otrs deva ~220 bp garu amplikonu.

NS5-RT-PCR metode deva amplikonus, kuru garums (~252 bp) bija identiski pozitīvajai kontrolei, kas saturēja *K23* vīrusa štammu (29. att). 5'NCR-RT-PCR metodes jutība, noteikta ar *K23* vīrusa štamma atšķaidījumiem bija 9,8 fg ērču encefalīta vīrusa RNS, bet NS5-RT-PCR metodes jutība bija tikai 900 fg vīrusa RNS. 5'NCR-RT-PCR metode kā jutīgākā tika izmantota arī, lai konstatētu vīrusu 13 ērču encefalīta slimnieku asins serumos, tomēr neviens no paraugiem neuzrādīja pozitīvu rezultātu.

Rezultāti apliecināja, ka RT-PCR metodes izmantošana ērču encefalīta vīrusa pierādīšanai pagaidām vēl ir neskaidra, kaut gan pētījums apliecināja šīs metodes spēju izšķirt ērču encefalīta apakštipus.

Augstāki pozitīvie rezultāti tika iegūti, testējot ērcu pulu materiālu, kas pēc savākšanas tika nekavējoties sasaldētas un uzglabātas bez pārtraukuma pie $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, lai izvairītos no RNS degradācijas.



29. attēls: NS5-RT-PCR metode ērcu pulu noteikšanai. 1. josla – pozitīvā kontrole (ērcu encefalīta vīrusa K23 štamms); 2. josla – DNS standarta garuma marķieris (100 bp Gene Ruler Ladder+); 3. josla – negatīvā kontrole; 5., 6. josla: pozitīvo ērcu pulu paraugi; 7. josla: negatīvā ērcu parauga puls

Savukārt ērcu homogenāti vispirms tika iegūti, saberžot ērces bufera šķīdumā, pēc tam tie tika uzglabāti vienu diennakti pie $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sasaldēti $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, un atkal atkausēti transportējot. Tas norāda uz testējamā materiāla uzglabāšanas apstākļiem kā iespējamo iemeslu negatīvam reakcijas iznācumam. Lai gan 5'NCR-RT-PCR metode, kura uzrādīja 100 reizes augstāku jutību nekā NS5-RT-PCR metode, tomēr to limitē vīrusa RNS nestabilitāte, kas rada nepieciešamību pēc speciālām prasībām paraugu uzglabāšanai. Šo metodi būtu vērts izmantot tālākai vīrusa apakštipu noskaidrošanai Latvijā.

Pirmais ērcu encefalīta izolāts no Latvijas (RK 1424) tika iegūts no *I. persulcatus*, un tas piederēja Tālo Austrumu apakštipam. V/A “Virusoloģijas izmeklējumu laboratorijas” sadarbībā ar Vācijas zinātniekiem (Süss et al., 2002) noskaidroja, ka aptuveni 800 Latvijas centrālās daļas un austrumdaļas rajonos savāktajos ērcu paraugos atklātie vīrusi bija tuvu radniecīgi gan Eiropas apakštipam *Neudoerfl* (*I. ricinus*), gan Sibīrijas klastera apakštipam Vasilchenko. *I. persulcatus* ērcēs tika konstatēti abi (Mavtchoutko et al., 2000; Lundkvist et al., 2001). Trūkst datu par ērcu encefalīta vīrusa genotipiem Latvijas Rietumu daļā, kas būtu tālāku pētījumu objekts.

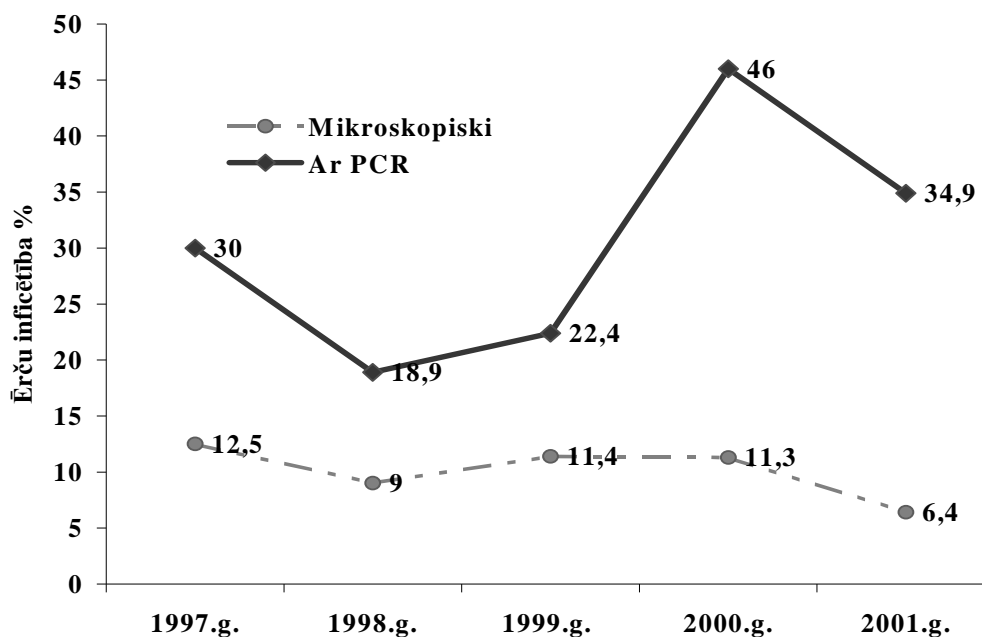
6.3.2. *B. burgdorferi* s.l. prevalence ērcēs (sniegti galvenie rezultāti, jo detalizēts apraksts šī patogēna pētījumiem, kuros piedalījies maģistra darba izstrādes laikā, ietverts Dr. Biol. Renātes Rankas promocijas darbā “*Borrelia burgdorferi sensu lato* molekulārbioloģiskais raksturojums Latvijā”, 2004. gads)

6.3.2.1. *B. burgdorferi* s.l. prevalence ērcēs, noteikta mikroskopiski

Ērcu inficētība ar *Borrelia burgdorferi* s.l., kas noteikta mikroskopiski, caurskatot fiksētus krāsotus ērcu preparātus, 1997. gadā bija $12,5 \pm 1,13\%$, 1998. gadā – $9,0 \pm 0,95\%$, 1999. gadā – $11,4 \pm 1,31\%$, 2000. gadā – $11,3 \pm 1,3\%$ un 2001. gadā – $6,4 \pm 1,8\%$, bez nozīmīgām inficētības līmeņa atšķirībām starp ērcu dzimumiem vai ērcu sugām (4. attēls).

6.3.2.2. *B. burgdorferi* s.l. prevalence ērcēs, noteikta molekulāri

Ar *Borrelia* inficēto ērcu procentuālais daudzums, kas tika noteikts mikroskopiski un ar PCR analīzes palīdzību (vairumā gadījumu *OspA*, retāk arī *FlaB* gēnu fragmentiem) uzrādīja gandrīz divreiz augstāku molekulārās metodes jutību un vairāk vai mazāk ticami atspoguļoja reālo inficēto ērcu procentuālo daudzumu dabā (30. att.).



30. attēls. *Ixodes* ērcu inficētība ar *B. burgdorferi* s.l. noteikta mikroskopiski un ar divpakāpju PCR metodi

B. burgdorferi s.l. prevalence *Ixodes* abu sugu ērcēs ar molekulārām metodēm (divpakāpju-PCR un PCR-RFLP analīzi), noteikta laika periodā no 1999. līdz 2001. gadam, variēja no 18% līdz 38% *I. ricinus* pieaugušajās ērcēs, un no 25% līdz 51% *I. persulcatus* pieaugušajās ērcēs (7.tabula). Jāatzīmē, ka, lai gan *I. persulcatus* ērcu inficētība kopumā arī izrādījusies nedaudz augstāka nekā *I. ricinus* inficētība, tomēr statistiskā atšķirība šajā gadījumā nav būtiska. Arī mātīšu un tēviņu inficētība kopumā daudz neatšķiras. Tas norāda, ka ērcu encefalīta vīrusa un borēliju prevalencei ērcēs ir atšķirīgas iezīmes.

135 pozitīvie *Ixodes imago* DNS paraugi, tika vēlāk izmantoti PCR-RFLP analīzei, no kuriem amplikons tika iegūts 110 paraugiem.

7. tabula. *Borrelia burgdorferi* s.l. prevalence dabas perēkļos savāktām ērcēm 1999. – 2001. gadā

		1999. gads % ± SD Inficētas/ testētas	2000. gads % ± SD Inficētas/ testētas	2001. gads % ± SD Inficētas/ testētas
<i>Borrelia</i> prevalence <i>I. ricinus</i>	Kopā	18.2% ± 5,25 10/55	38.2% ± 6.61 21/55	32.3% ± 4.21 40/124
	Māfītes	9.5% ± 6.56 2/21	45.8% ± 10.39 11/24	37.2% ± 5.51 29/78
	Tēviņi	23.5% ± 7.38 8/34	32.3% ± 8.53 10/31	23.9% ± 6.36 11/46
<i>Borrelia</i> prevalence <i>I. persulcatus</i>	Kopā	24.6% ± 4.12 27/110	51.3% ± 5.62 41/80	34.6% ± 3.86 53/153
	Māfītes	23.4% ± 5.34 15/64	50.0% ± 8.01 20/40	33.3% ± 5.48 25/75
	Tēviņi	26.1% ± 6.55 12/46	52.5% ± 8.00 21/40	35.9% ± 5.47 28/78

B. afzelii tika noteikta 56 no 69 (81.2±4,76%; p<0,05) izmeklētajām *I. persulcatus* un 24 no 37 (64.9±7,96%; p<0,05) Latvijas centrālajā daļā savāktajām un izmeklētajām *I. ricinus*. *B. garinii* tika atrasta 9 (24.3±7,15%; p<0,05) *I. ricinus* un 10 (14.5±4,27%; p<0,05) *I. persulcatus*.

B. burgdorferi sensu stricto tika atrasts vienīgi *I. ricinus* (2 paraugos no 37 jeb 5.4±3,77%; p<0,05) Rīgā), ērcu kopēja inficētība ar divām borēliju sugām - *B. afzelii* un *B. garinii* tika atklāta gan *I. ricinus* (2 paraugos, 5.4±3,77%; p<0,05; Krāslavas rajonā) un *I. persulcatus* (vienā paraugā, 1.5±1,45%; p<0,05; Ludzas rajonā). Abas ar *B. valaisiana* inficētās ērces (2.9±2,03%; p<0,05) bija *I. persulcatus* no Balvu rajona.

Lai gan šie pētījumu rezultāti atklāj, ka dermatoboreliozes izraisošā *B. afzelii* ir patogēns ar augstāko prevalences līmeni Latvijas ērcēs (Ranka et al., 2004), tomēr iespējams, ka daudzās ģeogrāfiskās vietās Latvijā varētu dominēt arī *B. garinii*, kuras izraisītā infekcija rada g.k. neiroloģiskus traucējumus, un ir grūtāk diagnosticējama, un tādēļ varētu netikt reģistrēta. Ievērojamāka nekā augstākminētā *B. garinii* prevalence *I. ricinus* ērcēs atklāta 2000. gadā sadarbībā ar Oksfordas (Lielbritānija) universitātes zinātniekiem (Kurtenbach et al., 2001). Saskaņā ar šiem datiem *B. garinii* prevalence Latvijas centrālajā daļā savāktajās ērcēs bija 34%, kamēr *B. afzelii* prevalence – tikai 39.4%. Bez tam konstatēts arī, ka augstāka *B. afzelii* prevalence bijusi *I. ricinu* nimfās, nevis pieaugušās ērcēs (Etti et al., 2003). Reģistrētajai Laima boreliozes incidencei ir tendence pieaugt, un iespējams, ka tas ievērojami saistīts ar pieaugošu ārstu un klīnicistu informētību par šo slimību un tās diagnostiku, un mazāk ar procesiem dabas perēkļos.

6.3.3. *Anaplasmataceae* dzimtas prokariotu prevalence ērcēs

Anaplasmataceae dzimtas sugu noteikšanai 2003. - 2005. gadā dažādos Latvijas rajonos savākto abu sugu *Ixodes* ērcu pulos tika izmantota 16S rRNS divpakāpju-PCR metode, amplificējot šī gēna fragmentus ar *Anaplasma phagocytophilum* sugas specifiskiem praimeriem ge3a/ge10r un ge9f/ge2, gan arī universāliem *Anaplasmataceae* ģints sugu praimeriem (ECC /ECB un ESP/GA1UR).

ESP praimera sekvenca tika iegūta, salīdzinot vairākas *Anaplasma* un *Ehrlichia* sugu 16S rRNS gēna sekvences ar *ClustalW* programmu, versija 5.a (Thompson et al., 1994), un izmantojot programmu *Whitehead Institute for Biomedical Research* (Kembridža, Lielbritānija) *Internet* programmu *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3/www.cgi>), bet GA1UR praimera sekvenca - no literatūras avotiem (Little et al., 1997.). Ar universālajiem dzimtas specifiskajiem praimeriem iegūtais produkts liecināja par kādas *Anaplasma* vai *Ehrlichia* sugas klātbūtni ērcu paraugā. Tālākai sugas identifikācijai izmantoja iegūtā produkta hibridizāciju ar *Anaplasma* un *Ehrlichia* sugu specifiskām zondēm un sekvencēšanas reakciju.

Anaplasma un *Ehrlichia* sugu hibridizācijai tika izmantots TBD-RLB komplekts (*Isogen*, Nīderlande), tomēr reakcijas apstākļi tika modificēti. Hibridizācijas mērķa gēns arī bija 16S rRNS. Hibridizācijas gaitā sākotnēji ar divpakāpju-PCR reakciju tika amplificēts *Anaplasma/Ehrlichia* sugu 16S rRNS gēna variablais rajons, pēc tam iegūtais PCR produkts tika hibridizēts ar membrānai kovalenti piesaistītām *Anaplasma* un *Ehrlichia* sugu specifiskām oligonukleotīdu zondēm (8. tabula). Divpakāpju-PCR reakcijai tika izmantoti nevis visi TBD-RLB komplekta praimeri, bet tikai biotilētais. I ciklā tika izmantota praimeru kombinācija ECC un ECB, II ciklā ECC un Ehr-R (biotilētais TBD-RLB komplekta praimeris, kas bija līdzīgs līdz šim izmantotajam GA1UR praimerim).

8. tabula. TBD-RLB *Anaplasma* un *Ehrlichia* ģints sugu specifiskās zondes

Nr.	Suga	Zondes sekvenca (5'-3'), R = A/G
1.	<i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	GGG GGA AAG ATT TAT CGC TA
2.	<i>Anaplasma centrale</i>	TCG AAC GGA CCA TAC GC
3.	<i>Anaplasma marginale</i>	GAC CGT ATA CGC AGC TTG
4.	1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	TTG CTA TAA AGA ATA ATT AGT GG
5.	2. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	TTG CTA TGA AGA ATA ATT AGT GG
6.	3. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	TTG CTA TAA AGA ATA GTT AGT GG
7.	4. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	TTG CTA TAG AGA ATA GTT AGT GG
8.	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	AGT ATC TGT TAG TGG CAG
9.	<i>Anaplasma bovis</i>	GTA GCT TGC TAT GRG AAC A
10.	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	ACC TTT TGG TTA TAA ATA ATT GTT
11.	<i>Ehrlichia</i> sp.strain Omatjene	CGG ATT TTT ATC ATA GCT TGC
12.	<i>Ehrlichia canis</i>	TCT GGC TAT AGG AAA TTG TTA

Atbilstoši hibridizācijas rezultātiem visbiežāk tika iegūts *A. phagocytophilum* 3. zondei atbilstošais variants (31. att.)

Ar minētajām metodēm kopumā tika pārbaudīti 424 ērcu puli (katrā pa 5 imago vai 10 nimfām), no tiem 48 (11,3±1,54%, p<0,05) saturēja *Anaplasmataceae* sugas prokariotus. *Ixodes ricinus* sugai piederēja pārbaudītie 289 imago un 40 nimfu puli, bet

I. persulcatus – 87 imago un 8 nimfu puli. Pozitīvs PCR rezultāts tika iegūts 28 *I. ricinus* imago puliēm un 20 *I. persulcatus* imago DNS puliēm (9. tabula). No 48 nimfu puliēm (t.i., no 480 g.k. *I. ricinus* sugas nimfām) neviens neuzrādīja pozitīvu PCR rezultātu.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

AF384214.E.phagocitoph.ASV.2.zonde TTATAGCCTTGCTATGAAGAATAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCAT
EF068228.A.phagoc.Vācija.3.zonde -TATAGCCTTGCTATAAAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCAT
AF470701.A.phagoc.Koreja.1.zonde TTATAGCCTTGCTATAAAGAATAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCAT
AY035312.E.phag.Norvēģija.4.zonde TTATAGCCTTGCTATAGAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCAT
*****
AF384214.E.phagocitoph.ASV.2.zonde AGGAATCTACCTAGTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATAC
EF068228.A.phagoc.Vācija.3.zonde AGGAATCTACCTAGTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATAC
AF470701.A.phagoc.Koreja.1.zonde AGGAATCTACCTAGTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATAC
AY035312.E.phag.Norvēģija.4.zonde AGGAATCTACCTAGTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATAC
*****

```

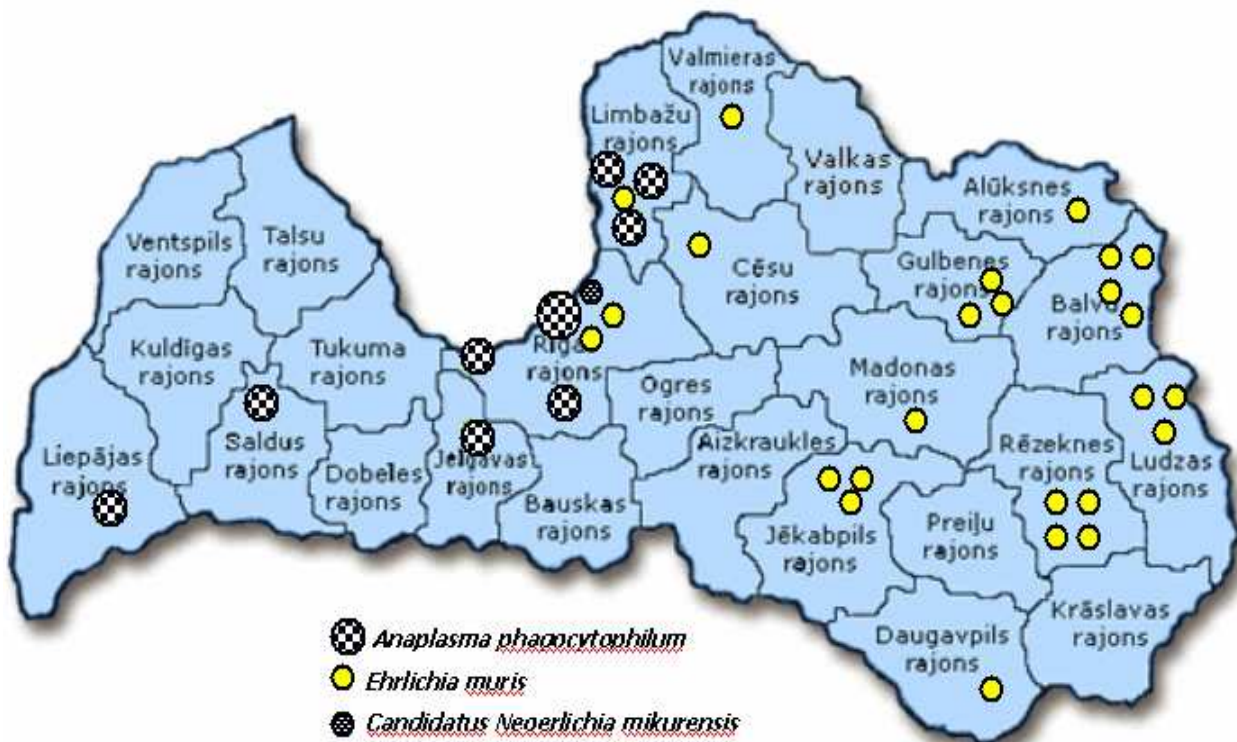
31. attēls. TBD–RLB *Anaplasma phagocytophilum* zonžu izvietojums un specifiskās atšķirības nukleotīdu pozīcijās 4 šīs sugas variantiem

17 pulos no 424 ($4,0 \pm 0,95\%$, $p < 0,05$) tika konstatēta *Anaplasma phagocytophilum*, 25 pulos ($5,9 \pm 1,15\%$, $p < 0,05$) – *Ehrlichia muris*, 5 pulu sekvences NCBI datu bāzē uzrādīja lielāko līdzību ar *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* ($1,2 \pm 0,52\%$, $p < 0,05$), un 1 puls ($0,2\% \pm 0,24\%$, $p < 0,05$) – ar *E. equi* (iepriekšējais *A. phagocytophilum* varianta nosaukums).

Jāatzīmē ka nevienā *I. persulcatus* sugas ērcu pulā netika atrasta *A. phagocytophilum*, savukārt *E. muris* bija vienīgā *Anaplasmataceae* suga, kura tika konstatēta minētās sugas ērcēs. *I. ricinus* ērcu pulos visbiežāk tika atrastas *A. phagocitophilum*, 5 gadījumos arī *E. muris*, 5 gadījumos *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, vienā - *E. equi* (šī suga gan kopā ar HGE aģentu 2001. gadā tika apvienota *A. phagocytophilum* sugā (Dumler et al., 2001), tomēr NCBI datu bāzēs ievietotās nukleotīdu sekvences vēl eksistē ar sākotnējo nosaukumu). Jāatzīmē, ka *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* pārstāv *Anaplasmatraceae* grupu, un atbilstoši NCBI datu bāzēs informācijai tajā iekļautas vairākas pasugas: *Ehrlichia* sp. “Rattus strain”, *Ehrlichia-like* sp. “Schotti variant”, *Ehrlichia* sp., cf. *Ehrlichia* sp. TK4456 un *Ehrlichia-like* sp. TK4456. Pirmoreiz *C. Neoehrlichia micurensis* tika konstatēta melnajās žurkās *Rattus norvegicus* un *Ixodus ovatus* ērcēs Japānas dienvidu daļā, Mikura salā, no kurienes arī cēlies sugas nosaukums (Kawahara, 2004).

I. ricinus mātīšu pulos *Anaplasmataceae* dzimtas prokariotu prevalence tika konstatēta 9 no 148 ($6,1 \pm 1,97\%$, $p < 0,05\%$) pārbaudītajiem puliēm, bet tēviņu pulos vairāk - 19 no 141 ($13,5 \pm 2,89\%$, $p < 0,05\%$). Pārbaudot *I. persulcatus* mātītes *Anaplasmataceae* prokariotu (tikai *E. muris*) prevalence tika konstatēta 12 pulos no 42 ($28,6 \pm 7,06\%$, $p < 0,05\%$), bet tēviņus - 8 gadījumos no 45 ($17,8 \pm 5,76\%$, $p < 0,05\%$). Vislielākā *Anaplasmataceae* sugu dažādība tika konstatēta Mežaparka (Rīgā) savāktajās ērcēs, kas arī pārbaudīto paraugu skaita ziņā sastādīja aptuveni pusi no visiem *I. ricinus* puliēm. Pozitīvo nimfu pulu iztrūkums varētu norādīt, vai nu uz pārāk maza daudzuma patogēnu klātbūtni šīs attīstības stadijas ērcēs, vai arī uz to, ka grauzēji, kas ir ērcu kāpuru, galvenie izbarotāji, ir mazāk nozīmīgs *Anaplasmataceae* sugu rezervuārs *I. ricinus* izplatības areālā Latvijā, un šīs dzimtas prokariotu eksistence dabā vairāk atkarīga no vidējiem zīdītājiem un putniem, kas ir galvenie nimfu izbarotāji.

Jāatzīmē, ka ērcēs konstatēto *Anaplasma* un *Ehrlichia* ģints prokariotu izplatība ģeogrāfiski atšķiras (32. att.): Latvijas rietumu daļā konstatētas atsevišķas *A. phagocytophilum*, bet ne *E. muris*, kamēr Latvijas austrumdaļā – tikai *E. muris*. Valsts centrālajā daļā ērcēs atrasti abu ģinšu prokarioti.



32. attēls. *Anaplasmataceae* dzimtas prokariotu izplatība Latvijā atbilstoši *Ixodes* ērcu ievākšanas vietām 2003. – 2005. gadā

Salīdzinot 12 sekvencētus līdz 250 nukleotīdiem garus *A. phagocytophilum* 16S rRNS gēna fragmentus, kas sekvencēti ar reverso praimeru GA1UR, konservatīva nukleotīdu secība novērota kopumā 230 bāzu garumā, variabla sekvenca bija kopumā 16 gēnu fragmenta nukleotīdu pozīcijās (33. un 34. att.).

Mežaparkā savāktās 6 ērces saturēja *A. phagocytophilum*, kam šajā gēnu fragmentā varēja novērot 3 dažādus sugas variantus ar 1 un 3 nukleotīdu atšķirībām. Limbažos savāktajām ērcēm savstarpējas atšķirības bija līdz 10 nukleotīdu pozīcijās. Sekvencētā PCR kontroles *A. phagocytophilum* (Vācija) fragments bija identisks Liepājas raj. un Plakanciēmā (Rīgas raj.) savāktajās *I. ricinus* ērcēs konstatētajiem *A. phagocytophilum* variantiem.

```

MEGA
!Format
  DataType=Nucleotide CodeTable=standard
  Nseqs=12 Nsites=250
  Identical=, Missing=? Indel=-;
!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;

#79.A.phagoc.Liepaja_Rt TAG ATG AGC CTA TGT TAG ATT AGC TAG TTG GTA GG- GTA AAG GCC TAC C-A AGG CGA TGA TCT ATA GCT GGT -CT GAG
#27.A.phag.Mezap_Rt ... ..
#33.A.phagoc.Flekanc_Rt ... ..
#39.A.phag.Mezap_Rm .T. CC. ... ..
#40.A.phag.Mezap_Rm .T. CC. ... ..
#28.A.phag.Mezap_Rt ... ..
#22.A.phag.VK ... ..
#30.A.phagoc.Mezap_Rt ... ..
#44.A.phag.Limbozi_Rm ... ..
#45.A.phag.Limbozi_Rm ... ..
#46.A.phag.Limbozi_Rt ... ..
#29.A.phagoc.Mezap_Rt ... ..

#79.A.phagoc.Liepaja_Rt AGG ATG ATC AGC CAC ACT GGA ACT GAG ATA CGG TCC AGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA GTG GGG AAT ATT GGA CAA TGG
#27.A.phag.Mezap_Rt ... ..
#33.A.phagoc.Flekanc_Rt ... ..
#39.A.phag.Mezap_Rm ... ..
#40.A.phag.Mezap_Rm ... ..
#28.A.phag.Mezap_Rt ... ..
#22.A.phag.VK ... ..
#30.A.phagoc.Mezap_Rt ... ..
#44.A.phag.Limbozi_Rm ... ..
#45.A.phag.Limbozi_Rm ... ..
#46.A.phag.Limbozi_Rt ... ..
#29.A.phagoc.Mezap_Rt ... ..

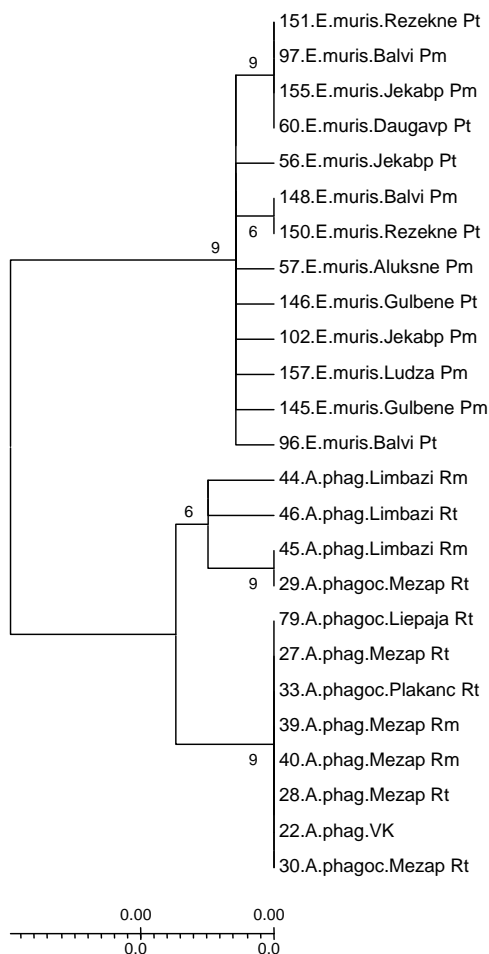
#79.A.phagoc.Liepaja_Rt GCG CAA GCC TGA TCC AGC TAT GCC GCG TGA GTG AGG AAG -GC CTT AGG GTT GTA AAA CTC TTT CAG TAG GGA AGA TAA
#27.A.phag.Mezap_Rt ... ..
#33.A.phagoc.Flekanc_Rt ... ..
#39.A.phag.Mezap_Rm ... ..
#40.A.phag.Mezap_Rm ... ..
#28.A.phag.Mezap_Rt ... ..
#22.A.phag.VK ... ..
#30.A.phagoc.Mezap_Rt ... ..
#44.A.phag.Limbozi_Rm ... ..
#45.A.phag.Limbozi_Rm ... ..
#46.A.phag.Limbozi_Rt ... ..
#29.A.phagoc.Mezap_Rt ... ..
  
```

>gi|88606690:c1058902-1057470 Anaplasma phagocytophilum HZ, complete
 16S rRNA 1433 bp

ge9f/GA1UR

TCCTGGCTCAGAACCAACGCTGGCGGCAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTCCTTATAGCT
 TGCATATAAAGAATAGTTAGTGGCCAGACGGGTGAGTAAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAG
 CCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATAGATGAGCCT
 ATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCACCAAGGCGATGATCTATAGCTGCTGAGAGGAT
 GATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTATGGACA
 ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCCGGTGAGTAGGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAACTCTTTCAG
 TAGGGAAGATAATGACGGTACCTACAGAGAAAGTCCCAGCAAACCTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATAC
 GGAGGGGCAAGCGTTGTTCCGAATTATGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGT
 GAAATGCCAGGGCTTAAACCTGGAGCTGCTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGG
 AATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTATCTGGT
 CCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTG
 TAAACGATGAGTGTGAATGTTGGGATTTTATCTCTGTGTTGAGCTAACCGGTTAAGCACTCCGCC
 TGGGACTACGGTCGCAAGACTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTTGAGCATGT
 GGTTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCACCTCCTTGACATGGAGATTAGATCCTTTTAAACGGA
 AGGGCGCAGTTCCGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTTGAGATGTTG
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGTAACCTCATCCTTAGTTGCCAGCGGTTAAGCCGGCACTTTAAAGGA
 AACTGCCAGTGGTAAACTGGAGGAAGGTGGGATGATGTCGAAGTCAGCACGGCCCTTATGGGGTGGGCT
 ACACACGTGCTACAATGGTACTACAATAGGTTGCAATGTCGAAGGCTGAGCTAATCCGTAAGTCA
 TCTCAGTTCCGATTGTCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATGACGA
 TGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTGTACACACTGCCCGTCCAGCCATGGGAATGGCTTAACCTCG
 AAGCTGGTGCACCAACGAAAGGAGGCACCCATTTAAGGTTGGGTCAAGTCACT

33. attēls. **Augšējais fragments:** Sekvencēto *Anaplasma phagocytophilum* sugas variantu atšķirības 16S rRNS gēna 250 bāzu (attēlā redzamas 230) garā fragmentā. Paraugi apzīmēti pēc to sekvencēšanas numuriem, sugas nosaukuma (saīsinātā veidā), ērcu ievākšanas vietas, ērcu sugas un dzimuma (Rm, Rt – *I. ricinus* māģite un tēviņš; Pm, Pt – *I. persulcatus* māģite un tēviņš). Variantu gēnu fragmentu salīdzinājums veikts MEGA 3.1 programmā (Kumar, Tamura, Nei 2004), iezīmēšana veikta, izmantojot Microsoft Paint. **Apakšējais fragments:** sekvencētā gēna fragmenta (violets) lokalizācija *A. phagocytophilum* 16S rRNS gēnā.



34. attēls. *Anaplasma*, *Ehrlichia* un *Babesia* ģints sugu garāko sekvenču filoģenētiskā analīze veikta ar Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) datorprogrammas 3.1 versiju, izmantojot *neighbour-joining* datu analīzi.

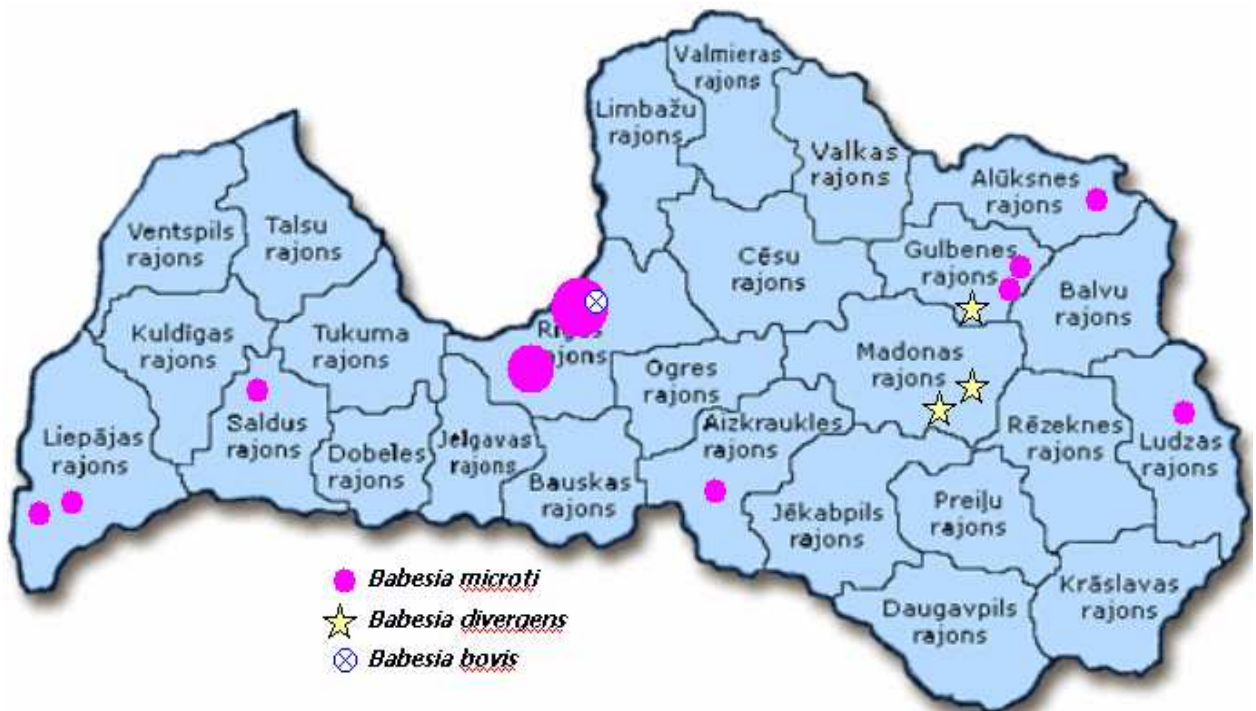
6.3.4. *Babesia* sp. prevalence ērcēs

Babesia sp. (un *Theileria* sp.) ģints sugu noteikšanai tika izmantots TBD–RLB komplekts (*Isogen*, Nīderlande). Hibridizācijas mērķa gēns bija 18S rRNS. Hibridizācijas gaitā sākotnēji ar tika amplificēts *Babesia/Theileria* sugu 16S rRNS gēna variablais rajons, pēc tam iegūtais PCR produkts tika hibridizēts ar membrānai kovalenti piesaistītām *Babesia* un *Theileria* sugu specifiskām oligonukleotīdu zondēm.

Ar hibridizācijas metodi kopumā tika pārbaudīti 297 abu sugu ērcu puli (10. tab.), no tiem *Babesia* ģints sugas saturēja 29 ērcu puli ($9,8 \pm 1,73\%$, $p < 0,05$). Pozitīvs PCR rezultāts tika iegūts 22 *I. ricinus* puliem no 219 ($10,1 \pm 2,04\%$, $p < 0,05$) un 7 *I. persulcatus* DNS puliem no 78 ($8,9 \pm 3,26\%$, $p < 0,05$). No 80 *I. ricinus* mātišu puliem tika konstatēti 3 *B. microti* saturoši puli ($3,8 \pm 2,14\%$, $p < 0,05$), un no 98 *I. ricinus* tēviņu puliem – 12 *B. microti* ($12,2 \pm 3,33\%$, $p < 0,05$) un 1 *B. bovis* saturošs pulis ($1,0 \pm 1,02\%$, $p < 0,05$). No 32 *I. persulcatus* mātišu puliem tika atrasti 2 *B. microti* ($6,3 \pm 4,35\%$, $p < 0,05$) un 1 *B. divergens* ($3,1 \pm 3,13\%$, $p < 0,05$) saturošs pulis, bet no 40 pārbaudītajiem *I. persulcatus* tēviņu puliem 2 saturēja *B. microti* ($5,0 \pm 3,49\%$, $p < 0,05$), un 2 – *B. divergens* ($5,0 \pm 3,49\%$, $p < 0,05$).

No 41 *I. ricinus* nimfu pula 6 ($14,6 \pm 5,59\%$, $p < 0,05$), kuros bija tikai ērces no Tīreļu monitoringa vietas Rīgas rajonā, saturēja *B. microti*, bet 6 pārbaudītie *I. persulcatus* puli neuzrādīja pozitīvu rezultātu. *B. microti* tika konstatēts abu sugu ērcēs, *B. bovis* – tikai *I. ricinus*, bet *B. divergens* – tikai *I. persulcatus* ērcēs.

B. microti atrasta gan Latvijas rietumu un centrālajā daļā, kur sastopamas tikai *I. ricinus* sugas ērces, gan arī tās austrumdaļā – *I. persulcatus* izplatības rajonos, kas liecina, ka šis patogēns nav piesaistīts vienas sugas vektoram. *Babesia bovis* pagaidām konstatēts tikai Rīgā, un *B. divergens*, suga, kas izceļas ar īpašu patogenitāti cilvēkam, konstatēta 2 Latvijas rajonos – Gulbenes un Madonas rajonā (35. att.).



35. attēls. *Babesia* ģints eikariotu izplatība Latvijā atbilstoši *Ixodes* ērcu ievākšanas vietām 2003. – 2005. gadā

6.4. Ar ērcu izplatību, aktivitāti un inficētību saistītie faktori

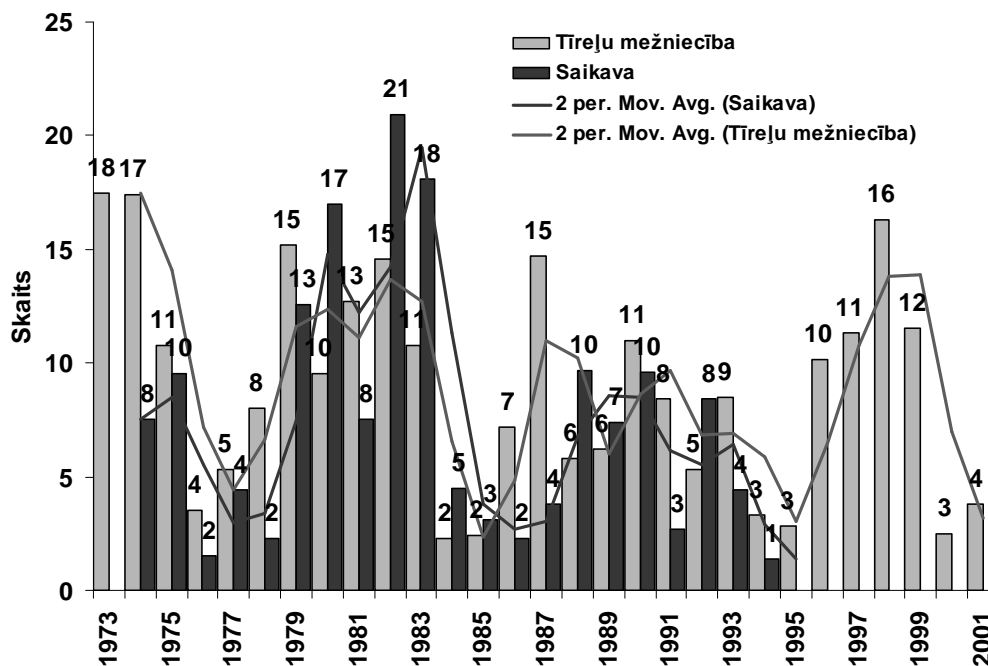
6.4.1. Izbarotāji

Ilggadīgi **grauzēju** – *Ixodes* ērcu preimarginālo stadiju, g.k. kāpuru, izbarotāju aktivitātes novērojumu dati sanitāri epidemioloģiskā dienesta uzraudzības ietvaros (1973.g. – 1992.g. novērojumus veica SES entomoloģe J.Skadiņa) norāda, ka periodā no 1973. līdz 2001. gadam abu *Ixodes* ērcu sugu izplatības areālu stacionāros ērcu aktivitātes sezonā atķertam grauzēju skaitam (dominējoša suga - *Clethrionomys glareolus*) bija novērojami vairāk vai mazāk izteikti pacēluma un krituma periodi, kuru cikli bija līdzīgi līdzīgi abās novērošanas vietās (korelācijas koeficients no 1974.g. – 1994.g. $r=0,51$).

I. ricinus areālā Tīreļu mežniecībā novēroti 4 grauzēju skaita pacēluma/krituma cikli, *I. persulcatus* areālā novērojumu periods bijis īsāks, un šeit reģistrēti 3 cikli.

Grauzēju skaita pacēlumi tika reģistrēti 1973. un 1974. gadā, 1979.-1983. gadā, 1987.-1993. gadā un 1996.-1999. gadam (36. att.).

No 1997. līdz 2001. gadam Tīreļu mežniecībā tika atķerti 333 peļveidīgie grauzēji, kuru vidū bija 286 ($85,9 \pm 1,91\%$; $p < 0,05$) *Clethrionomys glareolus*, 36 ($10,8 \pm 1,7\%$, $p < 0,05$) *Sorex araneus*, 9 ($2,7 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$) *Apodemus flavicollis* un 2 ($0,6 \pm 0,4\%$, $p < 0,05$) *Apodemus agrarius* sugas grauzēji. Savukārt Mežaparkā veiktā grauzēju uzskaitē, kuras laikā 2000.-2001. gadā tika atķerti 72 grauzēji, liecina, ka šeit dominē (43 jeb $59,7 \pm 5,8\%$; $p < 0,05$) tīrumiem raksturīgā *Apodemus agrarius*, izplatīta arī *Apodemus flavicollis* (23 jeb $31,9 \pm 5,8\%$; $p < 0,05$), retāk sastopami ciršļi *Sorex araneus* (5 jeb $6,9 \pm 3,02\%$; $p < 0,05$), un tikpat kā nav Tīreļos dominējošās sugas – *Clethrionomys glareolus* (1 jeb $1,4 \pm 1,39\%$; $p < 0,05$). Ilggadīgi arhīva dati par Saikavā atķertajiem grauzējiem liecina, ka šeit dominējošā suga arī ir *Clethrionomys glareolus*.



36. attēls. Vidējais grauzēju skaits uz 100 slazdu diennaktīm gadā Tīreļu un Saikavas monitoringa vietās (no 1973.-1994. gadam izmantoti SVA arhivētie dati (J.Skadiņa); no 1995. gada dati iegūti pētījuma ietvaros)

Krievijas zinātnieki (Okulova, 1986) norāda, ka nimfu galvenās izbarotājas ir lauku jeb svīttrainās klaidoņpeles *Apodemus agrarius*. Nimfas reti atrodamas uz *Clethrionomys glareolus* sugas grauzējiem, un vēl retāk uz ciršļiem, kas konstatēts arī ilggadīgu novērojumu laikā mūsu Tīreļu un Saikavas monitoringa vietās. Laika periodā no 1973. gada līdz 1995. gadam vidējais nimfu skaits uz sezonas laikā noķertajiem grauzējiem (galvenokārt *C. glareolus*) Tīreļu monitoringa vietā bija 15 reizes, bet Saikavas monitoringa vietā – 9 reizes mazāks nekā kāpuru skaits. Saikavā, kur dominē *I. persulcatus*, grauzēju infestācija ar ērcu preimarginālajām stadijām bija kopumā zemāka nekā Tīreļos – ar kāpuriem 3 reizes, bet ar nimfām 1,8 reizes zemāka.

Tomēr grauzēju aktivitātei un ar karogu uzskaitītajai ērcu aktivitātei no 1973. – 1994. gadam ir atšķirīga ikgadējā tendence ($r=[-0,00; -0,25]$; $p<0,05$); grauzēju skaita tendence arī iepriekšējos gados vēl mazāk ietekmē ērcu nimfu un imago skaita svārstības. Grauzēju skaita ikgadējām svārstībām un uz tiem konstatētā ērcu preimaginālo stadiju skaitam pa gadiem arī nav saistības, tomēr savstarpēji līdzīga tendence uz grauzējiem uzskaitīto nimfu un kāpuru daudzumiem (Tīreļos $r=0,57$, bet Saikavā $r=0,88$; $p<0,05$).

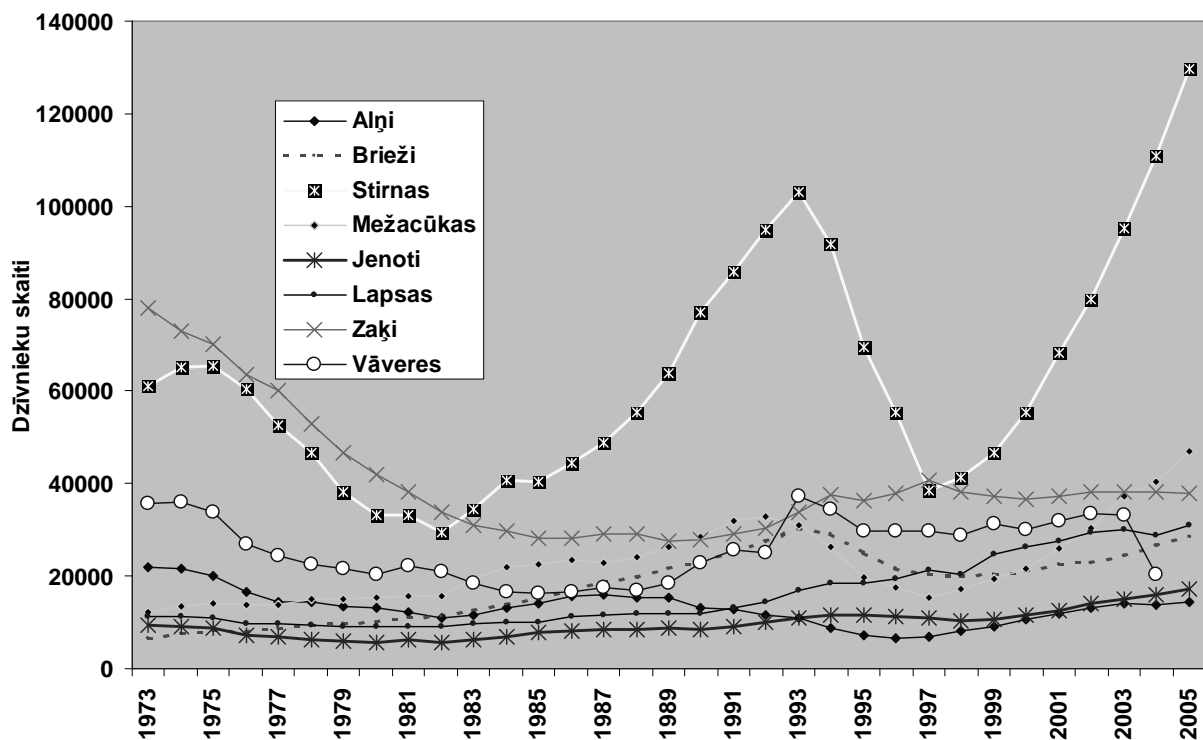
Tas varētu norādīt uz to, ka mežam raksturīgo grauzēju skaita izmaiņas nav limitējošs faktors ērcu preimaginālo stadiju eksistencei; iespējams, to daudzums ir pietiekošs ērcu attīstībai arī šo zīdītāju depresijas gados, iespējams arī, ka šajā gadījumā kāpuri vairāk izmanto citus zīdītājus, vai putnus.

Ixodes ērcu nimfu un imago izbarotāji ir galvenokārt Latvijas mežos sastopamie zīdītāji – zaķi, lapsas, vāveres, seski, caunas, jenoti, mežacūkas, stirnas, brieži, aļņi u.c. zīdītāji, putni, kas bieži uzturas uz zemsedzes, kā arī mājdzīvnieki ganību tuvumā – g.k. sīklopi un liellopi (Filipova, 1995).

Atbilstoši Valsts meža dienesta sniegtajai informācijai skaita ziņā lielākās **vidējo un lielo zīdītāju** populācijas Latvijā ir stirnām, zaķiem un vāverēm, pie kam zaķu un stirnu populācijas skaitliskais lielums pēdējo 30 gadu laikā mainījies attiecīgi trīs- un četrkārtīgi.

ASV brieži tiek uzskatīti par (Frank et al., 1998) ir nozīmīgākiem imago izbarotāji, un tiem ir galvenā nozīme ērcu populāciju uzturēšanā, savukārt Krievijas zinātnieki atzīmē, ka (Okulova, 1986) vietās, kur meža tuvumā ir ganības, galvenie vietējās ērcu populācijas izbarotāji ir tieši mājlopi, g.k. govīs.

Salīdzinot *Ixodes* ērcu aktivitātes un zīdītāju populācijas izmaiņu tendenci Latvijā no 1973. līdz 2005. gadam (37. att.), jāsecina, ka nozīmīgākie ērcu nimfu un imago izbarotāji ir lapsas, jenoti, zaķi un vāveres.



37. attēls. Meža dzīvnieku skaita izmaiņas no 1973. līdz 2005. gadam (Valsts Meža dienesta dati)

I. ricinus imago aktivitātei novērota korelācija ar jenotu un lapsu skaita izmaiņām (tai pašā gadā, attiecīgi $r=0,58$ un $0,72$; iepriekšējā gadā – $r=0,60$ un $0,75$, un pirms 2 gadiem vēl augstāka $r=0,69$ un $0,81$; $p<0,05$), kā arī ar vāverēm divus gadus iepriekš ($r=0,50$; $p<0,05$). Arī *I. persulcatus* imago aktivitātei novērota korelācija ar jenotiem (vienāda tai pašā gadā un pirms gada $r=0,53$; $p<0,05$) un lapsām (minētajos periodos attiecīgi $r=0,68-0,62$; $p<0,05$).

Savukārt nimfu aktivitātes tendences matemātiski vairāk saistītas ar zaķiem un vāverēm: *I. ricinus* nimfu korelācija ar zaķiem t.p. gadā, gadu iepriekš un 2 gadus iepriekš ir līdzīga un nedaudz pieaugoša ($r=0,51-0,57$; $p<0,05$), bet ar vāverēm tai pašā gadā ($r=0,52$; $p<0,05$). Savukārt *I. persulcatus* nimfas visos trīs salīdzinājuma periodos korelē ar zaķiem ($0,72-0,75$; $p<0,05$).

Lai gan faktoru analīzes korelācijas matrice neuzrāda *Ixodes* ērcu attīstības stadiju aktivitātes matemātisku saistību ar lielajiem meža zīdītājiem, tomēr tie ietilpst Faktoru analīzes 1. faktora noslodzes rādītājos ar salīdzinoši augstu indeksu, tādēļ var uzskatīt, ka arī lielajiem meža zīdītājiem ir pietiekama nozīme *Ixodes* ērcu populāciju izplatībā un pieaugumā pēdējo 30. gadu laikā.

Centrālā Statistika biroja dati saistībā ar **lauksaimniecības dzīvnieku** daudzuma izmaiņām Latvijā kopš 1980. gada norāda, ka liellopu, zirgu, un aitu skaitam bijusi tendence samazināties, t.sk. liellopu skaits samazinājies 3,7 reizes. Savukārt kazu skaitam bija tendence pieaugt 2,5 reizes. Acīmredzot liellopiem un sīklopiem varētu būt tikai lokāla nozīme populācijas uzturēšanā.

Ixodes ērcu izbarotāji putnu populāciju vidū varētu biežāk sastopamie mežu putni, kas barojas vai ligzdo uz zemes. Pie tādiem pieder žubītes (*Fringilla coelebs*), paceplīši (*Troglodytes troglodytes*), ļauķi (*Sylvia borin*, *S. atricapilla* u.c.), čunčiņi (*Phylloscopus collybita*), zīlītes (*Parus major* u.c.), koku čipstes (*Anthus trivialis*), sarkanrīklītes (*Erithacus rubecula*), svirlīši (*Phylloscopus sibilatrix*), vītīši (*Phylloscopus trochilus*), strazdi (*Turdus merula* u.c.), plukšķi (*Turdus iliacus*), apdzīvotu vietu tuvumā, mežmalās un ikrūmājos arī brūnspārnu ļauķi (*Sylvia communis*) u.c. ļauķu sugas, pelekīe strazdi (*Turdus pilaris*), vārnas (*Corvus corone*), žagatas (*Pica pica*) u.c. Latvijas dabas fonda projekta “Pļavu un lauksaimniecības zemju sugu biotopu monitorings 2004. gadā” gala pārskatā ietvertajiem datiem par putnu populāciju lieluma izmaiņu tendencēm 1995. līdz 2004. gadā norādīts, ka daudzu putnu sugām vērojama populācijas pieauguma tendence, kas saistāma ar lauksaimniecības zemju aizaugšanu ar krūmiem. Minētajā laika periodā 4 novērošanas vietās reģistrēts čunčiņu, ļauķu, zīlīšu, čipstu un strazdu populācijas pieaugums.

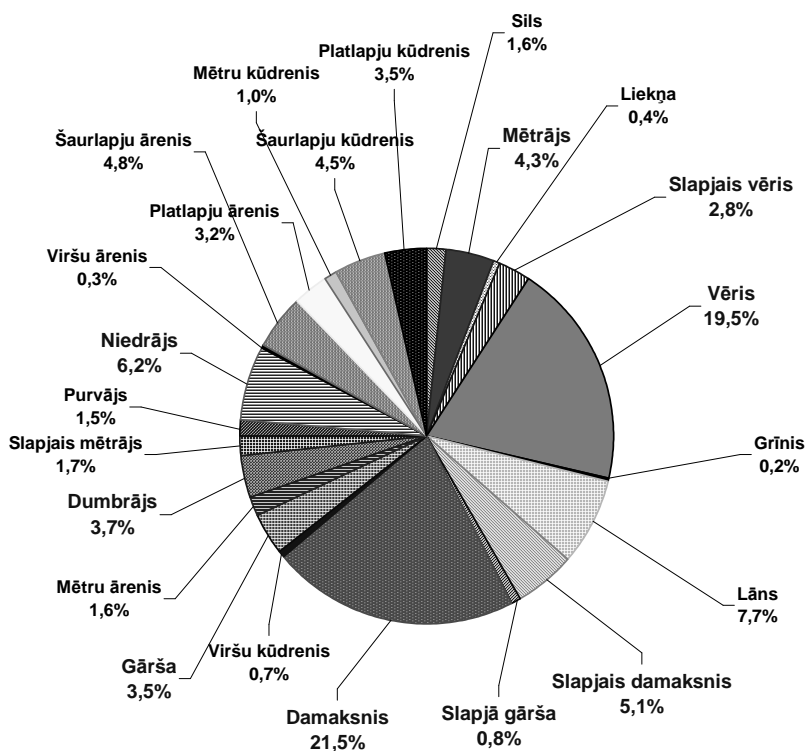
6.4.2. Biocenožu tips un mainība

Ērcu attīstībai un eksistencei piemērotas vietas ir meži un krūmāji. *CORINE Land cover* dati, kas atrodami *United Nations Environment Programme (UNEP) GRID-Arendal* Internet mājaslapā – *CORINE (COoRdination of INformation on the Environment)* par Latviju (<http://enrin.grida.no/biodiv/biodiv/national/latvia/ecosys/forests/forests.htm>) liecina, ka Latvijā meži aizņem 44,1% no kopējās valsts teritorijas un tiem raksturīgs mozaīkveida izkārtojums un ievērojama dažādība.

Latvijas kopējā virsmas teritorijas aizņem 6 458 900 ha. Atbilstoši LVĢMA datiem platlapju meži aizņem 576325,0 ha (jeb 8,9%), skujkoku meži - 965344,9 ha (14,9%), jauktie meži - 1215993,3 jeb 18,8%. Pārejoši mežu apgabali un krūmi aizņem 558951,2 ha (8,7%), bet purvi (mitrāji – 0,4% un kūdras purvi - 2%) ērcu attīstībai ir piemēroti tikai to sausākajos apgabalos.

Kopumā biocenozes, kur vairāk vai mazāk varētu būt sastopamas abu sugu *Ixodes* ērces, Latvijā aizņem pat vairāk par pusi no kopējās valsts teritorijas.

Latvijā mežu platība salīdzinot ar 20.gs. sākumu ir ļoti mainījusies. Salīdzinot ar 1935. gadu – mežu platība ir pieaugusi par 1176 tūkst. ha, jeb 40%, bet kopš 1970. gadiem pieaugusi par 14,4% (CSB statistikas dati - <http://www.csb.gov.lv/>). Atbilstoši Latvijas Mežu dienesta 1997. gadā sniegtajiem datiem ievērojamu daļu no kopējās mežu platības Latvijā aizņem damaksnis (21,5%) un vēris (19,5%) (38. att.).



38. attēls. Mežu augšanas apstākļu tipi Latvijā atbilstoši Valsts Mežu dienesta datiem (2001. gads)

I. ricinus un *I. persulcatus* raksturīga diezgan līdzīga sastopamības pakāpe dažādos mežu tipos. Vislielākais *I. ricinus* imago skaits atrasts dumbrājā, gāršā un vērī, nedaudz mazāk niedrājā, damaksnī un mētrājā. Lielākais *I. persulcatus* imago skaits atrasts vērī, gāršā, niedrājā, mazāk dumbrājā un damaksnī (Bormane, 1999). Jāsecina, ka vairāk nekā 2/3 no Latvijas mežu platībām atbilstoši to tipoloģijai ir īpaši piemērotas *Ixodes* ērcu attīstībai un eksistencei.

CSB dati liecina, ka kopš 1990. gadiem 1,6 reizes samazinājusies lauksaimniecības kultūru sējumu platība, kas netieši liecina par krūmājiem aizaugušo platību pieaugumu. Krūmāju platību palielināšanās rada strukturāli kompleksāku biotopu, kas varētu būt sugām bagātāks un radīt optimālus apstākļus ne tikai grauzējiem, bet arī citiem ērcu izbarotājiem (Frank et al., 1998)

6.4.3. Atsevišķi meteoroloģiski rādītāji

Ixodes ērcu aktivitātes izmaiņas plašākā ģeogrāfiskā areālā saistītas ar globālām un lokālām klimatiskām izmaiņām. Randolph et Rogers (2000) norāda, ka periodā no 1980. līdz 1990. gadiem ziemas periodā tika reģistrēts mazāks dienu skaits ar temperatūrām, kas bija zemākas par -12°C . Šis apstākļi veicinājis *I. ricinus* izplatības areāla izplešanos ziemeļu virzienā, savukārt ērcu skaita pieaugums to izplatības zonās Eiropā varētu būt saistīts maigākām ziemām, agrāku pavasari un vēlāku rudeni, pieaugot dienu skaitam ar minimālo temperatūru $5-8^{\circ}\text{C}$.

Latvijā novērotais temperatūras pieaugums aprīļa 3. dekādē kopš 1990. gadu vidus varētu būt sekmējis vienlaicīgu kāpuru un nimfu vienlaicīgu barošanos uz peļveidīgajiem grauzējiem, kas nodrošina ērcu encefalīta vīrusa cirkulāciju ērcu populācijā (Sumilo, 2006).

Nosakot saistību ar meteoroloģiskiem apstākļiem (vidējo temperatūru un nokrišņu summu ziemas, pavasara, vasaras un rudens mēnešos) un ērcu aktivitāti (Rīgas rajonā) vairāk vai mazāk ticama *Ixodes ricinus* imago, nimfu un *I. persulcatus* imago korelācija vērojama ar vasaras un rudens (jūlijs-oktobris) vidējo temperatūru summu iepriekšējā gadā (r ir attiecīgi 0,51; 0,65 un 0,49, $p < 0,05$). Šie novērojumi daļēji sakrīt ar Krievijā konstatēto sakarību, ka ērcu attīstības stadiju aktivitātes līmeni visvairāk ietekmē divi meteoroloģiskie faktori – minētā temperatūru summa iepriekšējā gadā un esošā gada jūnija nokrišņu daudzums (Okulova, 1986). Jāatzīmē, ka jūnija nokrišņu daudzumam gan netika konstatēta saistība ar imago un nimfu aktivitāti Latvijā, bet gan tikai ar kāpuru aktivitāti ($r=0,69$; $p < 0,05$). Salīdzinot ērcu aktivitātes ikgadējo līmeni un meteoroloģiskos apstākļus ar tā paša gada visiem mēnešiem, pozitīvu korelāciju var novērot gaisa temperatūrai aprīlī un *I. ricinus* imago, nimfu aktivitātei (attiecīgi 0,50 un 0,64; $p < 0,05$), *I. persulcatus* imago un februāra nokrišņu daudzumam ($r=0,55$; $p < 0,05$), savukārt negatīvu septembra vidējo nokrišņu daudzumam un *I. ricinus* imago, nimfu un *I. persulcatus* nimfu aktivitātei (attiecīgi $-0,54$; $-0,51$ un $-0,50$; $p < 0,05$).

7. Secinājumi

1. Divu Latvijā epidemioloģiski nozīmīgu *Ixodidae* ērcu sugu – *I. ricinus* L. un *I. persulcatus* P.Sch. sezonālā aktivitāte tika novērota un analizēta saistībā ar to ietekmējošiem faktoriem un saslimstības rādītājiem; konstantās monitoringa vietās kopš 1995. gada ievākts materiāls laboratoriskai izpētei. Tika noskaidrots, ka:

- a. Ērcu encefalīta incidences ikgadējie maksimumi 1994. un 1995. gadā bija saistīti galvenokārt tikai ar *I. ricinus* aktivitāti šīs ērcu sugas izplatības rajonos Latvijā, bet ne ar *I. persulcatus* aktivitāti. Neskatoties uz ērcu aktivitātes īpatnībām imunizācija pret ērcu encefalītu bija faktors, kas varētu būt ietekmējis slimības incidences ikgadējo tendenci, jo konstatēts salīdzinoši augsts negatīvs korelācijas koeficients ($r = -0,84$; $p < 0,05$). Ikgadējā Laima boreliozes incidences tendence bija atšķirīga, ar vairāk vai mazāk līdzīgām ikgadējām svārstībām abu *Ixodes* sugu izplatības rajonos.

- b. *I. ricinus* un *I. persulcatus* ikgadējai aktivitātei monitoringa vietās novērota līdzīga tendence ($r=0,72$; $p<0,05$), tomēr atšķirīga amplitūda – kopš 1990. gada vidējais ikgadējais *I. ricinus* imago skaits izmainījās seškārtīgi, kamēr vidējais ikgadējais *I. persulcatus* imago skaits tikai 3,6 reizes.
- c. Paaugstināta ikgadējā ērcu encefalīta vīrusa prevalence dabā savāktās ērcēs bija galvenokārt dēļ vīrusa paaugstinātās prevalences abu sugu mātītēs. Tas daļēji varētu izskaidrot būtisko vīrusa prevalences atšķirību dabā savāktajām ērcēm (mātītēm un tēviņiem) un pacientiem noņemtajām ērcēm (gandrīz tikai mātītēm un nimfām), attiecīgi ap 1:10. Matemātiski nav konstatēta ērcu inficētības sezonālo svārstību saistība ar saslimstības tendencēm. Savukārt konstatēta kopīga tendence ikgadējai ērcu encefalīta incidencei un vīrusa prevalences dabas perēkļos savāktajās abu sugu ērcēs ($r=0,63$; $p<0,05$).
- d. Būtisku faktoru vidū, kas iespaido ikgadējo ērcu aktivitātes modeli, bija tieši vidēja lieluma ērcu izbarotāju – jentū, lapsu, zaķu un vāveru skaita svārstības, kuru ikgadējās skaita svārstības uzrādīja ciešāko saistību ar imago un nimfu aktivitātes tendencēm ($r=[0,52-0,81]$, $p<0,05$).
- e. Meteoroloģisko apstākļu saistība ar *Ixodes* sugu attīstības stadiju aktivitāti: vasaras-rudens temperatūru summa iepriekšējā gadā, nokrišņu summa februārī un aprīļa temperatūra esošajā gadā uzrādīja pozitīvu korelāciju ar ikgadējām ērcu aktivitātes svārstībām ($r=[0,49-0,65]$, $p<0,05$), savukārt septembra nokrišņu summa – negatīvu korelāciju ($r=[-0,50-(-0,54)]$, $p<0,05$).

2. *Ixodes* sugas tika noteiktas morfoloģiski un attīstīta PCR metode *Ixodes* ērcu morfoloģiski noteikto sugu molekulārai pārbaudei, pamatojoties uz ērcu ITS2 gēna fragmenta sugas specifiskām atšķirībām.

3. Apstiprināta 5'NCR-RT-PCR metodes jutība un izmantošanas iespēja molekulārai ērcu encefalīta vīrusa noteikšanai, lai gan nepieciešama tās tālāka attīstīšana.

4. *B. burgdorferi* s.l. prevalence ērcēs, noteikta ar divpakāpju PCR metodi 1999. – 2001. gadā variēja no 18% līdz 38% *I. ricinus* imago, un no 25% līdz 51% *I. persulcatus* imago. Netika konstatēta atšķirība *Borrelia* sp. prevalences mātītēs un tēviņos, kas norādīja uz iespējami atšķirīgu *B. burgdorferi* s.l. un ērcu encefalīta vīrusa transmisijas paraugu.

5. Attīstītas metodes *Anaplasmataceae* dzimtas prokariotu prevalences noteikšanai *Ixodes* ērcu pulos (nested-PCR, hibridizācija un sekvencēšana). Pārbaudīti 424 ērcu puli, no kuriem 48 imago puli (11,3%) saturēja *Anaplasmataceae* dzimtas prokariotus. Nimfu puliem netika konstatēts pozitīvs rezultāts. 4% pulu tika konstatēta *A. phagocytophilum*, 5,9% pulu – *E. muris*, 1,2% - *Candidatus neoehrlichia micurensis*, un 0,2% - *E. equi* (*A. phagocytophilum* variants). *I. persulcatus* saturēja vienīgi *E. muris*, kas tika konstatēta Latvijas centrālajā daļā un austrumu rajonos, savukārt *A. phagocytophilum* – Latvijas rietumdaļā un centrālajā daļā. Tika konstatēti vairāki *A. phagocytophilum* varianti gan pēc hibridizācijas zonžu izvietojuma, gan arī pēc iegūto fragmentu sekvencēšanas.

6. Hibridizācijas metode tika izmantota, lai atklātu *Babesia* ģints sugu prevalenci ērcēs. Izmeklējot 297 *Ixodes* ērcu pulus, *Babesia* ģints klātbūtne tika konstatēta 9,8%

(29) gadījumos. No 219 pārbaudītiem *I. ricinus* ērcu puliem 10,1% (22) uzrādīja pozitīvu rezultātu, un no 78 *I. persulcatus* puliem pozitīvi bija 8,9% (7). *I. ricinus* saturēja *B. microti* un *B. bovis*, bet *I. persulcatus* – *B. microti* un *B. divergens*. *B. microti* konstatēta Latvijas rietumu, centrālajā un austrumu daļā, kamēr *B. bovis* – Rīgas rajonā, un *B. divergens* – Gulbenes un Madonas rajonā.

7. Turpmāk nepieciešami pētījumi par *Ixodes* ērcu attīstības stadiju atšķirīgu aktivitātes modeli saistībā ar to izbarotājiem dažādās ainavās; antropogēno faktoru ietekmi uz ērcu pārnesto slimību incidences tendenci, kā arī ērcu encefalīta vīrusa apakštipu un dažādu mazāk pazīstamu ērcu patogēnu prevalenci un ģeogrāfisko izplatību, tālāk attīstot molekulārās detektēšanas metodes.

8. Pateicības

Tēzes ir izstrādātas galvenokārt uz divu institūtu bāzes – Latvijas Biomedicīnas studiju un pētījumu centrā (LZP projekti 01.0012.6.1, 02.0924, 05.1628) veicot ērcu un to patogēnu molekulāro analīzi, un Valsts aģentūrā „Sabiedrības veselības aģentūra” nodrošinot materiālu molekulāriem pētījumiem un statistiskos datus, kā arī veicot *Ixodes* sugu monitoringu. Daļa promocijas darbam nepieciešamo retrospektīvo datu tika savākta Eiropas Komisijas finansētās 6. ietvara programmas „Globālās izmaiņas un ekosistēmas” integrētā projekta EDEN (*Emerging Diseases un a Changing European Environment*) apakšprojektā EDEN-TBD „Ērcu pārnestās slimības” izpildes gaitā.

Šo tēžu izstrāde nebūtu iespējama bez darba vadītāja profesora Viestura Baumaņa vērtīgajiem ieteikumiem, viņa un Intas Jansones, Renātes Rankas un Liānas Pliss atbalsta BMC laboratorijā veiktajos pētījumos. Augstu vērtēju padomus un informāciju, ko sniedza darba vadītājs asociētais profesors Voldemārs Spuņģis.

Ļoti pateicīga esmu Valentīnai Čapļiginai, ar kuru kopīgi tika veikta patogēnu izpēte pēdējos divus gadus, kolēģei Ievai Vilcānei, ar kuru kopīgi visā pētījumu periodā tika veikts *Ixodes* ērcu monitorings un materiāla vākšana, un kolēģei Tatjanai Kļemjacionokai.

Par ilggadīgo informāciju un ieteikumiem esmu pateicīga SVA epidemiologiem un virusologiem – Irinai Lucenko, Jurijam Perevoščikovam, Arnim Dūkam, Violetai Mavčutko, bijušajai Sanitāri epidemioloģiskās stacijas entomoloģei Jevgeņijai Skadiņai, un SIA „Vakcinācijas dienests” ārstei Guntai Paukšēnai ar kolēģiem.

9. Literatūra

1. Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusatogui, I., Lopez, L., Rodriguez-Franco, F., Luaces, I., Cortes, O., Tesouro, M.A. 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 125 (3-4): 365-372
2. Alekseev, A. 1993. Tick-tick-borne pathogen system and its emergent qualities. (In Russian). St.Petersburg: Zoological Institute RAS, 204 pp.
3. Anderson, B.E., Dawson, J.E., Jones, D.C., Wilson, K.H. 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 2838-2842

4. Anziani, O.S., Ewing, S.A., Baker, R.W. 1990. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe *Ehrlichieae* by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 51: 929-931
5. Bakken, J.S., Dumler, J.S., Chen, S.M., Eckman, M.R., Van Etta, L.L., Walker, D. H. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *Journal of the American Medical Association*, 272: 212-218
6. Barker, S.C, Murrell, A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129; Suppl.: 15-36
7. Beaglehole, R., Bonita, R., Kjellström, T. 1993. *Basic epidemiology*. WHO, Geneva, pp. 170
8. Bekker, C.P., Postigo, M., Taoufik, A., Bell-Sakyi, L., Ferraz, C., Martinez, D., Jongejan, F. 2005. Transcription analysis of the major antigenic protein 1 multigene family of three in vitro-cultured *Ehrlichia ruminantium* isolates. *The Journal of Bacteriology*, 187 (14): 4782-4791
9. Bekker, C.P., Vos, S.de, Taoufik, A., Sparagano, O.A., Jongejan, F. 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Veterinary Microbiology*, 89: 223-38
10. Bown, K.J., Begon, M., Bennett, M., Woldehiwet, Z., Ogden, N.H. 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (1): 63-70
11. Brayton, K.A., Kappmeyer, L.S., Herndon, D.R., Dark, M.J., Tibbals, D.L., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Knowles, D.P. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 844-849
12. Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach I.L., Grunwaldt E.I., Davis I.P. 1982. Lyme disease - a tick -born spirochetosis ? *Science*. 216, 1317-1319
13. Burke, M.S., Fordham, L.A., Hamrick, H.J. 2005. Ticks and tick paralysis: imaging findings on cranial MR. *Pediatric Radiology*, 35 (2):206-208
14. Carlyon, J.A., Fikrig, E.. 2003. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiology*, 11:743-754
15. Chen, S.-M., Dumler, J.S., Bakken, J.S., Walker D.H.. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 589-595
16. Chin, J.(ed.) 2000. *Control of Communicable Diseases. Manual*, 17th Edition. Edited by: J.C. Washington, American Public Health Association, 623 pp.
17. Cinco, M., Padovan, D., Murgia, R., Maroli, M., Frusteri, L., Heldtander, M., Johansson, K.E., Ollson-Engvall, E. 1997. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 3365-3366

18. Colomba, C., Saporito, L., Polara, V.F., Rubino, R., Titone, L. Mediterranean spotted fever: clinical and laboratory characteristics of 415 Sicilian children. *BMC Infectious Diseases*, 22; 6:60
19. Conrad, P.A., Thomford, J.W., Yamane, I., Whiting, J., Bosma, L., Uno, T., Holshuh, H.J., Shelly, S. 1991. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 199: 601–605
20. Cowdry, E.V. 1926. Studies on the aetiology of heartwater: III. The multiplication of *Rickettsia ruminantium* within the endothelial cells of infected animals and their discharge into the circulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 44: 803-814
21. Dawson, J.E., Anderson, B.E., Fishbein, D.B., Sanchez, J.L., Goldsmith, C.S., Wilson, K.H., Duntely, C.W. 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 2741-2745
22. Donatien, A., Lestoquard, F. 1935. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 28: 418-419
23. Dumler, J.S., Walker, D.H. 2001. Tick-borne ehrlichioses. *The Lancet. Infectious Diseases*, 4: 21-28
24. Estrada-Pena, A. 1999. Geostatistics as predictive tool to estimate *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) habitat suitability in the western Palearctic from AVHRR satellite imagery. *Experimental & Applied Acarology*, 23: 337-349
25. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*, 80(1):179-85
26. Estrada-Pena, A., Jongejans, F. 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting *Ixodoidea* with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology*, 23: 685–715
27. Etti, S., Hails, R., Schafer, S. M., De Michelis, S., Sewell, H-S., Bormane, A., Donaghy, M., Kurtenbach, K. 2003. Habitat-Specific Diversity of *Borrelia burgdorferi* Sensu lato in Europe, Exemplified by Data from Latvia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (5): 3008-3010
28. Filipe, A.R., Casals, J. 1979. Isolation of Dhoru virus from *Hyalomma marginatum* ticks in Portugal. *Intervirology*, 11 (2):124-127
29. Filipova, N. 1985. Taiga tick *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae) (in Russian). Leningrad, Nauka Publishers, 420 pp.
30. Fishbein, D.B., Sawyer, L.A., Holland, C.J., Hayes, E.B., Okoroanyanwu, W., Williams, D., Sikes, R.K., Ristic, M., McDade, J.E. 1987. Unexplained febrile illness after exposure to ticks: infection with an *Ehrlichia*? *Journal of the American Medical Association*, 257: 3100-3104
31. Frank, D.H, Fish, D., Moy, F.H. 1998. Landscape features associated with Lyme disease risk in a suburban residential environment. *Landscape ecology*, 13: 27-36
32. Fuente, J., Garcia-Garcia, J., Blouin, E., Saliki, J., Kocan, K. 2002. Infection of Tick Cells and Bovine Erythrocytes with One Genotype of the Intracellular Ehrlichia *Anaplasma marginale* Excludes Infection with Other Genotypes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3: 658-668

33. Fukunaga, M., Yabuki, M., Hamase, A., Oliver, J.H.Jr., Nakao, M. 2000. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *Journal of Parasitology*, 86 (1): 38-43
34. Giammanco, G.M., Vitale, G., Mansueto, S., Capra, G., Caleca, M.P., Ammatuna, P. 2005. Presence of *Rickettsia conorii* subsp. israelensis, the causative agent of Israeli spotted fever, in Sicily, Italy, ascertained in a retrospective study. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (12): 6027-6031
35. Grattan-Smith, P.J., Morris, J.G., Johnston, H.M., Yiannikas, C., Malik, R., Russell, R., Ouvrier, R.A. 1997. Clinical and neurophysiological features of tick paralysis. *Brain*, 120 (11): 1975-1987
36. Gratz, N. (Ed.). 2004. The vector-borne human infections of Europe, their distribution and burden on public health. WHO Regional Office for Europe, p.144
37. Grīnbergs, A. 1966. Zooparazitoloģiskie faktori ērču encefalīta epidemioloģijā Latvijas PSR. Disertācija bioloģijas zinātņu kandidāta grāda iegūšanai. Rīga, 203 lpp.
38. Guerrero, F.D., Bendele, KG, Chen, A.C., Li, A.Y., Miller, R.J., Pleasance, E., Varhol, R., Rousseau, M.E., Nene, V.M. 2007. Serial analysis of gene expression in the southern cattle tick following acaricide treatment of larvae from organophosphate resistant and susceptible strains. *Insect Molecular Biology*, 16 (1): 49-60
39. Guilfoile, P.G., Packila, M. 2004. Identification of four genes expressed by feeding female *Ixodes scapularis*, including three with sequence similarity to previously recognized genes. *Experimental & Applied Acarology*, 32 (1-2): 103-110
40. Han, X., Aho, M., Vene, S., Peltomaa, M., Vaheri, A., Vapalahti, O. 2001. Prevalence of Tick-Borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *Journal of Medical Virology*, 64: 21-28
41. Heile, C., Heydorn, A.O., Schein, E. 2006. *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) - distribution, biology and vector for *Babesia canis* in Germany. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 119 (7-8): 330-334
42. Herwaldt, B.L., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S., Pieniasek, N.J. 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (8): 942-948
43. Hlinka, O., Murrell, A., Barker, S.C. 2002. Evolution of the secondary structure of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in hard ticks (Ixodidae, Arthropoda). *Heredity*, 88 (4): 275-279
44. Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H. 2000. Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (3): 451-469
45. Hubalek, Z., Mittermayer, T., Halouzka, J., Cerny, V. 1988. Isolation of "exotic" Bhanja virus (*Bunyaviridae*) from ticks in the temperate zone. *Archives of Virology*, 101 (3-4): 191-197

46. Jacomo, V., Kelly, P.J., Raoult, D. 2002. Natural History of *Bartonella* Infections (an Exception to Koch's Postulate). *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9 (1): 8-18
47. Jorge, S., Anderes, L., Sumner, J. 2000. PCR Detection of Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* Ticks and Wild Small Mammals in Western Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (3): 1002-1007
48. Kaiser, R. 2002. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany and clinical course of the disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 291; Suppl.33: 58-61
49. Kawahara, M., Ito, T., Suto, C., Shibata, S., Rikihisa, Y., Hata, K., Hirai, K. 1999. Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and animals with *E. muris* as antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:1123-1129
50. Kocan, K.M., Fuente, J.de la, Guglielmo, A.A., Melendez, R.D. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (4): 698-712
51. Kugeler, K.J., Gurfield, N., Creek, J.G., Mahoney, K.S., Versage, J.L., Petersen, J.M. 2005. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-Like Endosymbionts when Screening Ticks by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 7594-7597
52. Kurtenbach, K., Michelis, S., Etti, S., Schafer, S., Sewell, H., Brade, V., Kraiczky, P. 2002. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. *Trends in Microbiology*, 202 (10); 2: 74-79
53. Kurtenbach, K., Michelis, S., Sewell, H., Etti, S., Schafer, S., Hails, R., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Hanincova, K., Labuda, M., Bormane, A., Donaghy, M. 2001. Distinct Combinations of *Borrelia Burgdorferi* Sensu Lato Genospecies Found in Individual Questing Ticks From Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4926-4929
54. Kurtenbach, K., Sewell, H., Ogden, N.H., Randolph, S.E., Nutall, P.A. 1998. Serum Complement Sensitivity as a Key Factor in Lyme Disease Ecology. *Infection and Immunity*, 66: 1248-1251
55. Little, S.E., Dawson, J.E., Lockhart, J.M., Stallknecht, D.E., Warner, C.K., Davidson, W.R. 1997. Development and use of specific polymerase reaction for the detection of an organism resembling *Ehrlichia* sp. in white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases*, 33: 246-253
56. Little, S.E., Stallknecht, D.E., Lockhart, J.M., Dawson, J.E., Davidson, W.R. 1998. Natural coinfection of a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) population with three *Ehrlichia* spp. *Journal of Parasitology*, 84: 897-901
57. Liz, J.S. 2002. Ehrlichiosis in *Ixodes ricinus* and wild mammals. *International Journal of Medical Microbiology*, 33: 104-105
58. Liz, J.S., Anderes, L., Sumner, J.W., Massung, R.F., Gern, L., Rutti, B., Brossard, M. 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1002-1007
59. Lundkvist, Å., Vene, S., Golovljova, I., Mavtchoutko, V., Forsgren, M., Kalnina, V., Plyusnin, A. 2001. Characterization of tick-borne encephalitis virus

- from Latvia: Evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *Journal of Medical Microbiology*, 65: 730-735
60. MacLeod, J. R., and W. S. Gordon. 1933. Studies in tick-borne fever of sheep. Transmission by the tick, *Ixodes ricinus*, with a description of the disease produced. *Parasitology*, 25: 273-285
 61. Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R.C., Ristic, M., Cox, D., McDade, J.E. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *The New England Journal of Medicine*, 316: 853-856
 62. Massung, R.F., Slater, K., Owens, J.H., Nicholson, W.L., Mather, T.N., Solberg, V.B., Olson, J.G. 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1090-1095
 63. Mavtchoutko, V., Vene, S., Haglund, M., Forsgren, M., Duks, A., Kalnina, V., Hörling, J., Lundkvist, A. 2000. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia. *Journal of Medical Virology*, 60: 216-222
 64. Mehlhorn, H. (Ed.). 2001. *Encyclopedic Reference of Parasitology*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co, 2 Ed., 2000 pp.
 65. Misao, T., and Y. Kobayashi. 1955. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow, and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 6: 145-152
 66. Munderloh, U.G., Tate, C.M., Lynch, M.J., Howerth, E.W., Kurtti, T.J., Davidson, W.R. 2003. Isolation of an *Anaplasma* sp. organism from white-tailed deer by tick cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4328-4335
 67. Nicholson, W.L., Comer, J.A., Sumner, J.W., Gingrich-Baker, C., Coughlin, R.T., Magnarelli, L.A., Olson, J.G., Childs, J.E. 1997. An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (6): 1510-1516
 68. Nijhof, A.M., Pillay, V., Steyl, J., Prozesky, L., Stoltsz, W.H., Lawrence, J.A., Penzhorn, B.L., Jongejan, F. 2005. Molecular characterization of *Theileria* species associated with mortality in four species of African antelopes. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (12): 5907-5911
 69. Nuttall, P.N. and Labuda, M. 1994. Tick-borne Encephalitis subgroup. In: *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses* (Sonenshine and Mather, eds), Oxford University Press, Oxford, pp. 351–481.
 70. Okulova, N. 1986. *Biological relationships in forest ecosystems* (in Russian). M.: Nauka, 248 pp.
 71. Oschmann P., Kraiczy P., Halperin J., Brade V. (Eds.). 1999. *Lyme Borreliosis and Tick – Borne Encephalitis*. UNI-MED, Germany, 144 pp.
 72. Parola, P., and D. Raoult. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infection Diseases*, 32: 897-928
 73. Parola, P., Davoust, B., Raoult, D. 2005. Tick – and flea – borne rickettsial emerging zoonoses. *Veterinary Research*, 36: 469-492
 74. Patarapadungkit, N., Nuchadomrong, S., Sattayasai, N., Patchima Indrakamhang, P., Daduang, S. 2004. Specific and Highly Sensitive Primers for PCR Detection of *Babesia bovis*. *ScienceAsia*, 30: 67-73

75. Petrovec, M., Sumner, J., Nicholson, W., Childs, J., Strle, F., Barlič, J., Lotrič-Furlan, S., Avšič-Županc, T. 1999. Identity of Ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1168-1169
76. Polin H., Hufnagl, P., Haunschmid, R., Gruber, F., Ladurner, G. 2004. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 2285-2286
77. Pusterla, N., Huder, J.B., Lutz, H., Braun, U. 1998. Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* ticks from areas in Switzerland where tick-borne fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 9: 2735-2736
78. Randolph, S.E., Rogers, D.J. 2000. Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 7; 267 (1454): 1741-1744
79. Ranka, R., Bormane, A., Salmina, K., Baumanis, V. 2004. Identification of Three Clinically Relevant *Borrelia burgdorferi* Sensu lato genospecies by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S-23S Ribosomal DNA Spacer Amplicons. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (4): 1444-1449
80. Rich, S.M., Rosenthal, B.M., Telford, S.R.3rd, Spielman, A., Hartl, D.L., Ayala, F.J. 1997. Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS-2) region within individual deer ticks. *Insect Molecular Biology*, 6 (2): 123-129
81. Richter, D., Schlee, D.B., Matuschka, F.R. 2003. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (6): 697-701
82. Rikihisa, F., Rurangirwa, R. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 2145-2165
83. Rikihisa, Y. 1991. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 286-308
84. Sanogo, Y.O., Zeaiter, Z., Caruso, G., Merola, F., Shpynov, S., Brouqui, P., Raoult, D. 2003. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (3): 329-32
85. Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, F., Dumler, J.S. 2004. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (9): 1643-1648
86. Sarih, M., M'Ghirbi, Y., Bouattour, A., Gern, L., Baranton, G., Postic, D. 2005. Detection and Identification of *Ehrlichia* spp. in Ticks Collected in Tunisia and Morocco. *Journal of Clinical Microbiology*, 3: 1127-1132
87. Schouls, L.M., Van De Pol, I., Rijpkema, S.G., Schot, C.S. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella*

- species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. Journal of Clinical Microbiology, 37: 2215-2222
88. Schrader C., Süß J. 1999. A nested RT-PCR for detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. Zentralblatt fuer Bakteriologie, 289: 319-328
 89. Shao, R., Barker, S.C., Mitani, H., Aoki, Y., Fukunaga, M. 2005. Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoa: a case study with Australasian *Ixodes* ticks. Molecular Biology and Evolution, 22 (3): 620-629
 90. Shpynov, S.N., Rudakov, N.V., Iastrebov, V.K., Leonova, G. N., Khazova, T.G., Egorova, N.V., Borisova, O.N., Preider, V.P., Bezrukov, G.V., Fedorov, E.G., Fedianin, A.P., Sherstneva, M.B., Turyshev, A.G., Gavrilov, A.P., Tankibaev, M.A., Fournier, P.E., Raoult, D. 2004. New evidence for the detection of ehrlichia and anaplasma in *Ixodes* ticks in Russia and Kazakhstan (in Russian). Meditsinskaia Parazitologija i Parazitarnye Bolezni (Mosk), 2: 10-14
 91. Süß, J., Schrader, C., Abel, U., Bormane, A., Duks, A., Kalnina, V. 2002. Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997-2000). International Journal of Medical Microbiology, 291, Suppl. 33: 34-42
 92. Šumilo, D., Bormane, A., Asokliene, L., Lucenko, L., Vasilenko, V., Randolph, S. 2006. Tick-borne encephalitis in the Baltic States: Identifying risk factors in space and time. International Journal of Medical Microbiology, 296; Suppl.1: 76-79
 93. Theiler, A. 1910. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In report to the Government, Transvaal, South Africa. Veterinary Bacteriology, Dept. of Agriculture, 1908-1909: 7-64
 94. Vedanarayanan V., Sorey W.H., Subramony S.H. 2004. Tick paralysis. Seminars in Neurology, 24 (2): 181-184

10. Publikācijas

1. Šumilo, D., **Bormane, A.**, Asokliene, L., Lucenko, L., Vasilenko, V., Randolph, S. **2006**. Tick-borne encephalitis in the Baltic States: Identifying risk factors in space and time. International Journal of Medical Microbiology, 296; Suppl.1: 76-79
2. **Bormane, A.**, Zeltiņa, A., Lucenko, I., Mavčutko, V., Duks, A., Pujate, E., Ranka, R., Baumanis V. **2004**. Tick-borne encephalitis - pathogen, vectors and epidemiological situation in Latvia 2002-2003. Acta Universitatis Latviensis, 670: 27-37
3. **Bormane, A.**, Lucenko, I., Duks, A., Mavtchoutko, V., Ranka, R., Salmina, K., Baumanis, V. **2004**. Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002. International Journal of Medical Microbiology, 293; Suppl.37: 36-47
4. Ranka, R., **Bormane, A.**, Salmina, K., Baumanis, V. **2004**. Identification of Three Clinically Relevant *Borrelia burgdorferi* Sensu lato genospecies by PCR-

- Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S-23S Ribosomal DNA Spacer Amplicons. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (4): 1444-1449
5. Ranka, R., Salmina, K., Zygutiene, M., Morkunas, B., **Bormane, A.**, Baumanis, V. **2003**. Prevalence of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in *Ixodes* ticks in three Baltic countries. *Acta Universitatis Latviensis*, 662: 7-15
 6. Etti, S., Hails, R., Schafer, S. M., De Michelis, S., Sewell, H-S., **Bormane, A.**, Donaghy, M., Kurtenbach, K. **2003**. Habitat-Specific Diversity of *Borrelia burgdorferi* Sensu lato in Europe, Exemplified by Data from Latvia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (5): 3008-3010
 7. Süß, J., Schrader, C., Abel, U., **Bormane, A.**, Duks, A., Kalnina, V. **2002**. Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997-2000). *International Journal of Medical Microbiology*, 291; Suppl. 33: 34-42
 8. Kurtenbach, K., Michelis, S., Sewell, H., Etti, S., Schafer, S., Holmes, E., Hails, R., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Hanincova, K., Labuda, M., **Bormane, A.**, Donaghy, M. **2002**. The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 291; Suppl. 33: 152-154
 9. **Bormane, A.**, Ranka, R., Lucenko, I., Lavrinoviča, M., Kloviņš, J., Kalniņa, V., Puzuka, A., Vetce-Vecmane, K., Baumanis, V. **2001**. *Borrelia burgdorferi* – infected ticks and incidence of Lyme borreliosis in Latvia. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B*, 55; 4 (615): 164-170
 10. Kurtenbach, K., Michelis, S., Sewell, H., Etti, S., Schafer, S., Hails, R., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Hanincova, K., Labuda, M., **Bormane, A.**, Donaghy, M. **2001**. Distinct Combinations of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies Found in Individual Questing Ticks From Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4926-4929
 11. **Bormane, A.** **1999**. Ērču encefālīta un Laima boreliožu nozīmīgākie struktūrelementi un to izpēte Latvijā. *Latvijas Entomologs*, 37: 46-57

11. Konferenču tēzes

1. Increased TBE incidence in the Baltic States in response to human-induced environmental change (Abstract). Sumilo, D., Bormane, A., Asokliene, L., Vasilenko V., Zygutiene, M., Lucenko, I., Randolph, S. IX International Jena Symposium on tick-borne diseases. Jena, Germany, 15-17 March 2007.
2. Tick-borne Encephalitis (TBE) in the Baltic States: identifying risk factors in space and time. (Abstract). D. Sumilo, A. Bormane, S.E. Randolph. VIII International Potsdam Symposium. Jena, Germany, March 2005, Abstract book.
3. Natural foci of tick-borne diseases (TBD) and epidemiological situation in Latvia during the last decade (Abstract). Bormane, A., Ranka, R., Duks, A., Lucenko, I., Salmiņa, K. International Potsdam Symposium. Berlin, Germany, 13-14 March 2003, Abstract book.
4. Molecular typing of bacterial infections in Latvia (Abstract). Baumanis, V., Kalniņa, V., Jansone, I., Bormane, A., Ranka, R., Marga, O., Pole, I., Panchuka, T.: *EJB The FEBS Journal*. Volume 268, Supplement 1, July 2001, pp. 48

5. Molecular diagnostics of *Borrelia burgdorferi* infected ticks (Abstract). Ranka, R., Bormane, A., Salmiņa, K., Baumanis, V. Towards optimal diagnostics and management. Sanct-Petersburg, Russia, May 22-25 2002. Abstract book, pp. 42
6. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks collected in Latvia (Abstract). Ranka, R., Salmiņa, K., Bormane, A., Baumanis, V. FEBS forum for young scientists. Istanbul, Turkey, 18-20 Oct. 2002. Abstract book, pp. 95

6. tabula. Anaplasmataceae dzimtas prokariotu prevalences *Ixodes* ērcu pulos (ērces ievāktas no 2003. līdz 2005. gadam)

Rajons	Vieta	Testētie ērcu puli (x 5 imago; x 10 nimfas)						Pozitīvie ērcu puli (x 5 imago; x 10 nimfas)						Pozitīvie puli
		<i>I. ricinus</i>			<i>I. persulcatus</i>			<i>I. ricinus</i>			<i>I. persulcatus</i>			
		Imago		Nimfas	Imago		Nimfas	Imago		Nimfas	Imago		Nimfas	
		Mācītes	Tēviņi		Mācītes	Tēviņi		Mācītes	Tēviņi		Mācītes	Tēviņi		
Aizkraukles r	Koknese	2	3											
Alūksnes r	Alsviķi	1	1		2	4					1 <i>E. muris</i>			1
Balvu r	Kubuļi					1					1 <i>E. muris</i>			1
	Susāji				5	7	2				2 <i>E. muris</i>	1 <i>E. muris</i>		3
Bauskas r.	Iecava	1	2											
	Vecumnieki	1	1											
Cēsu r	Pipariņi	5	5	1				1 <i>E. muris</i>						1
Daugavpils r	Kalupe				4	5	1					1 <i>E. muris</i>		1
	Sventes p.	1	2	1										
Dobeles r	Biksti	3	2	2										
Gulbenes r	Lejasciems				4	4					1 <i>E. muris</i>	2 <i>E. muris</i>		3
Jekabpils r	Ābeļu p				3	4					1 <i>E. muris</i>			1
	Kūkas				1	1					1 <i>E. muris</i>			1
	Laši				1	2						1 <i>E. muris</i>		1
Jelgavas r	Ozolnieki	1	2							1 <i>A. phagocytoph</i>				1
Jūrmala	Ķemeri	13	1	1				1 <i>A. phagocytoph</i>						1
Krāslavas r	Kaplava	3	4											
Kuldīgas r.	Ēdole, Vārme	2	2	2										
	Laidze, Rumba	3	2											
Liepājas r	Vērgale	2	2	2						1 <i>A. phagocytoph</i>				1
Limbažu r	Skulte	4	5					1 <i>A. phagocytoph</i>	2 <i>A. phagocytoph</i>					3
Ludzas r	Cirimas p.	1			3	2					1 <i>E. muris</i>			1
	Nirza				3	1					2 <i>E. muris</i>			2
Madonas r	Saikava 2				6	5	2				1 <i>E. muris</i>			1
Ogres r.	Ikšķile, Jumprava	1	1	2										
Preiļu r.	Jersika				2	2	2							
Rezeknes r	Audriņi				6	7	1				2 <i>E. muris</i>	2 <i>E. muris</i>		4
Rīga	Jaunciems	3	5	4						2 <i>C.N. mikurensis</i>				2
	Mežaparks 1	36	38	4				1 <i>A. phagocytoph</i>	3 <i>A. phagocytoph</i> 1 <i>C.N. mikurensis</i>					5
	Mežaparks 2	26	34					2 <i>A. phagocytoph</i>	3 <i>A. phagocytoph</i> 1 <i>C.N. mikurensis</i>					6
	Mežaparks 3	25	14					1 <i>A. phagocytoph</i> 1 <i>C.N. mikurensis</i> 1 <i>E. muris</i>	1 <i>C.N. mikurensis</i> 1 <i>E. muris</i>					5
Rīgas r	Plakanciems	2	1							1 <i>A. phagocytoph</i>				1
	Tīreļi	4	7	14										
Saldus r	Saldus m.	1	1							1 <i>E. equi</i>				1
	Zirņi	1	1	2										
Talsu r	Lauciena	1	1											
	Roja	1	1											
Tukuma r.	Kandavas p.			2										
Valkas r	Strenči	2	2	1	2									
Valmieras r.	Kocēni, Tārgale	1		2										
	Mazsalacas p.	1	1							1 <i>E. muris</i>				1
Kopā	424 puli	148	141	40	42	45	8	6 <i>A. phagocytoph</i> 1 <i>C.N. mikurensis</i> 2 <i>E. muris</i>	11 <i>A. phagocytoph</i> 4 <i>C.N. mikurensis</i> 3 <i>E. muris</i> 1 <i>E. equi</i>	0	12 <i>E. muris</i>	8 <i>E. muris</i>	0	48

7. tabula. *Babesia* ģints eikariotu prevalence *Ixodes* ērcu pulos (ērces ievāktas no 2003. līdz 2005. gadam)

Rajons	Vieta	Testētie ērcu puli (x 5 imago; x 10 nimfas)						Pozitīvie ērcu puli (x 5 imago; x 10 nimfas)						Pozitīvie puli
		<i>I. ricinus</i>			<i>I. persulcatus</i>			<i>I. ricinus</i>			<i>I. persulcatus</i>			
		Imago		Nimfas	Imago		Nimfas	Imago		Nimfas	Imago		Nimfas	
		Mātītes	Tēviņi		Mātītes	Tēviņi		Mātītes	Tēviņi		Mātītes	Tēviņi		
Aizkraukles r	Koknese	2	2					1 <i>B. microti</i>						1
Alūksnes r	Alsviķi	1	1		2	5					1 <i>B. microti</i>			1
Balvu r	Susāji				4	8	2							
Bauskas r	Iecava	1	3											
Cēsu r	Pipariņi	5	5	1										
Daugavpils r	Kalupe				3	4								
	Svente	1	1	1										
Dobeles r	Biksti	3	2	3										
Gulbenes r	Lejasciems				4	4					1 <i>B. divergens</i> 1 <i>B. microti</i>	1 <i>B. microti</i>		3
Jēkabpils r	Ābelu p				1	2								
	Kūkas					3								
Jelgavas r	Ozolnieki		2											
Jūrmala	Ķemeri	13	1											
Krāslavas r	Kaplava	1	4											
Kuldīgas r	Ēdole	3	2	2										
	Rumbas	1	2											
Liepājas r	Vērgale	1	1	2				1 <i>B. microti</i>	1 <i>B. microti</i>					2
Limbažu r	Skulte	4	5											
Ludzas r	Nirza				3	1					1 <i>B. microti</i>			1
	Cirma	1			1	1								
Madonas r	Saikava				6	3	2				2 <i>B. divergens</i>			2
Ogres r	Jumprava	1	1	2										
Preiļu r	Jersika				2	2	1							
Rēzeknes r	Audriņi				6	7	1							
Rīga	Jaunciems	3	5	5					1 <i>B. bovis</i>					1
	Mežaparks 1	10	32	4					6 <i>B. microti</i>					6
	Mežaparks 2	8	10						2 <i>B. microti</i>					2
	Mežaparks 3	8	5					1 <i>B. microti</i>	2 <i>B. microti</i>					3
Rīgas r	Plakanciems	2	1											
	Tīreļi	4	7	14						6 <i>B. microti</i>				6
Saldus r	Saldus mežn.	1	1	1										
	Zirņi	1	1	1					1 <i>B. microti</i>					1
Talsu r	Lauciena	1	1											
	Roja	1	1											
Tukuma r	Kandava			2										
Valkas r	Strenči	2	2	1										
Valmieras r	Valmieras p	1		1										
Ventspils r	Tārgale			1										
Kopā	297 puli	80	98	41	32	40	6	3 <i>B. microti</i>	1 <i>B. bovis</i> 12 <i>B. microti</i>	6 <i>B. microti</i>	2 <i>B. microti</i> 1 <i>B. divergens</i>	2 <i>B. microti</i> 2 <i>B. divergens</i>	0	29

