

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

*BABESIA* SUGU MOLEKULĀRĢENĒTISKĀ IZPĒTE SUŅU  
ASINS UN ĒRĀU PARAGOS LATVIJĀ

Bakalaura darbs

Autors: Agne Namiņa

Stud. apl. Nr. ap09135

Darba vadītājs: Maģ.biol. Valentīna Čapligina

RĪGA 2017

## Kopsavilkums

Babēzija ir viencelšu eikariotisks organisms, kurš parazitē mugurkaulnieku eritrocītos, izraisot infekcijas slimību- babeziozi. To izplatība ir tieši saistīta ar tā vektora izplatību, kas, galvenokārt, ir cietās ērces.

Darba mērķis: izmantojot molekulārās metodes detektēt babēziju sugas patogēnus ērcu, kā arī suņu asins paraugos Latvijā, un salīdzināt babēziju prevalences izmaiņas piecu gadu laikā. Kopumā ir analizēti 632 ērces, kas noņemtas no suņiem 2011. un 2016. gadā, kā arī 11 suņu asins paraugi. Tika veikta babēziju sugu noteikšana un filoģenētiskā analīze.

Salīdzinot kopējo babēziju infekcijas prevalenci ērcu paraugos 2011. un 2016. gadā, tika novērota tās pieauguma tendence: no 2,5% uz 5,4%. Pieauga *B. canis canis* pozitīvo ērcu prevalence no 0,4% uz 2,3%. Pārējām babēziju sugām tika konstatēts neliels prevalences pieaugums: *B. microti* no 1,2% uz 1,5%, *Babesia* sp. *venatorum* no 0,8% uz 1,3% un *B. capreoli* no 0% uz 0,3%.

**Atslēgas vārdi: babēzija, babezioze, ērces, suns.**

## Summary

*Babesia spp.* are protozoan eukaryotic intraerythrocytic parasites, causing infection disease babesiosis in humans and animals. The prevalence of *Babesia* in different areas is strongly associated with distribution of hard ticks.

The aim of the study was to identify *Babesia* pathogens by molecular methods in ticks acquired from domestic dogs in Latvia, and to compare the prevalence and distribution within a 5 year period. In total, 632 ticks and 11 blood samples collected from dogs in year 2011 and 2016, were analysed. *Babesia spp.* were identified and A phylogenetic analysis was performed.

The results showed that *Babesia* prevalence in tick samples from dogs has grown from 2.5% to 5.4% in years 2011 and 2016, respectively. A pronounced change in prevalence was observed for *B.canis canis* species: from 0.4% to 2.3%. For other *Babesia spp.* there was a slight change within these years: from 1.2% to 1.5% for *B.microti*, from 0.8% to 1.3% for *Babesia sp. venatorum*, and from 0% to 0,3% for *B.capreoli*.

**Key words: Babesia, Babesiosis, ticks, dog.**

## Saturs

Ievads.....	6
1. Literatūras apskats .....	7
1.1 <i>Babesia</i> sp. izpētes vēsture .....	7
1.2. <i>Babesia</i> sp. taksonomija .....	7
1.2.1. Lielās babēzijas .....	9
1.2.2. Mazās babēzijas.....	9
1.3. <i>Babesia</i> sp. saimniekorganismi .....	10
1.3.1. <i>Ixodes</i> sp. ērcu raksturojums .....	10
1.3.2. <i>Dermacentor</i> sp. ērcu raksturojums .....	11
1.4. <i>Babesia</i> sp. dzīves cikls .....	12
1.5. <i>Babesia</i> sp. ģeogrāfiskā izplatība .....	13
1.6. Babeziozes diagnostika.....	13
1.7. <i>Babesia</i> sp. slimības pazīmes un ārstēšana.....	14
1.7.1. <i>Babesia</i> sp. infekcija cilvēkos .....	14
1.7.2. <i>Babesia</i> sp. infekcija dzīvniekos .....	15
2. Materiāli un metodes .....	17
2.1. Ērces un asins paraugi .....	17
2.2. Izmantotie reaģenti .....	18
2.3. Izmantotie praimeru.....	19
2.4. Izmantotie šķīdumi un gēli .....	20
2.5. Izmantotā aparatūra .....	22
2.6. Izmantotā programmatūra.....	22
2.7. Metodes .....	23
2.7.1. DNS izdalīšana no ērcēm .....	23
2.7.2. DNS izdalīšana no asinīm .....	23
2.7.3. <i>Babesia</i> sp. 18S rRNS gēna noteikšana DNS paraugos ar PCR metodi .....	24
2.7.4. PCR produktu analīze agarozes gelā ar elektroforēzes metodi .....	25

2.7.5. PCR produktu apstrāde pirms sekvenčēšanas ar fermentiem <i>ExoI</i> un FastAP. ....	26
2.7.6. PCR produkta sekvenēšana .....	26
2.7.7. Sekvenēto paraugu attīrīšana ar sefadeksu. ....	27
2.7.8. DNS sekvenču analīze .....	27
2.7.9. Paraugu filoģenētiska analīze .....	27
3. Rezultāti un diskusija .....	29
4. Secinājumi .....	41
5. Pateicības .....	42
6. Literatūras saraksts .....	43

## Ievads

Babēzijas ir mugurkaulnieku eritrocītos parazitējoši protozoji, kuri spēj izraisīt babeziozi. Par babēziju vektoriem- pārnēsātājiem kalpo bezmugurkaulnieki, galvenais pārnēsātājs ir ērces, kas nodrošina babēziju cirkulāciju dabā. Ir zināmas vairāk kā 100 babēziju sugas. *Babesia canis* izraisa babeziozi suņiem, savukārt cilvēkiem babeziozi spēj izraisīt *B.microti*, *B.divergens* un *Babesia sp. venatorum*, turklāt Eiropā lokālas izcelsmes babeziozi cilvēkiem izraisa tieši pēdējās divas sugas.

Līdz šim Latvijā nav diagnosticēta lokāli/endēmiskas izcelsmes babeziozes gadījumi cilvēkiem, bet kopš 2013. gada ir publicēti dati par suņu babeziozes gadījumiem, lai gan molekulāri neapstiprināti saslimšanas gadījumi ir bijuši arī iepriekš (Berzina et al. 2013).

Veterinārajās klīnikās suņu asinīs babēzijas apstiprina, apskatot gaismas mikroskopā asins iztriepi, tomēr šī metode nav pilnīga, to izmantojot, nevar noteikt babēziju sugu, tādēļ ir nepieciešams pielietot ātras molekulārās detektēšanas metodes, kas pilnveidotu babeziozes diagnostiku.

Ņemot vērā, ka suņi saskaras ar ērcēm biežāk kā cilvēki, no tiem ievāktās ērces var kalpot kā indikators babēziju prevalences noteikšanai konkrētajā reģionā.

**Bakalaura darba mērķis:** izmantojot molekulārās metodes, detektēt babēziju sugas patogēnus suņu asins un ērcu paraugos un salīdzināt babēziju prevalences izmaiņas piecu gadu laikā.

### **Bakalaura darba uzdevumi:**

1. Ērcu ģints noteikšana ērcēm, kas noņemtas no suņiem 2011. un 2016. gadā.
2. DNS izdalīšana no individuālām ērcēm un suņu asins paraugiem.
3. Babēziju 18S rRNS gēna amplifikācija ērcu un suņu asins DNS paraugos.
4. Babēziju sugas identificēšana ar sekvenēšanas metodi un sekvenču analīzi izmantojot GenBank datubāzi.
5. Iegūto babēziju sekvenču filoģenētiskā analīze.

# 1. Literatūras apskats

## 1.1 *Babesia* sp. izpētes vēsture

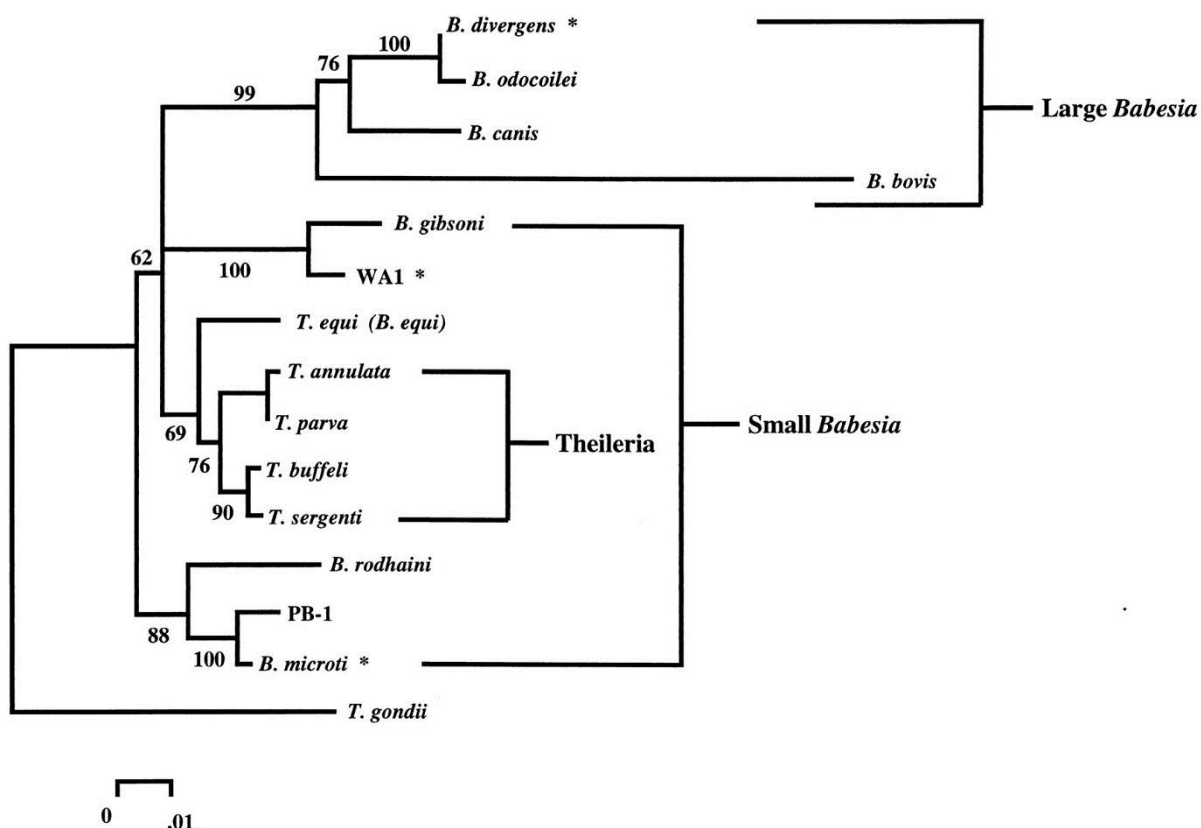
*Babesia* sp. ir viencelšu eikariotiski organismi, kuri parazitē mugurkaulnieku eritrocītos un izraisa infekcijas slimību babeziozi. Babeziozes var izpausties gan vieglā formā, kas ir hroniska, apslēpta un klīniski neizpaužas, gan smagā formā, kas ir akūta, līdzīga malārijai, un var beigties ar nāvi. Uzskata, ka *Babesia* infekcijas pastāv jau kopš seniem laikiem, pirmās vēsturiskas liecības par to var atrast Bībelē Vecā Derībā Otrā Mozus grāmatā *Exodus* (Homer et al. 2000). Tomēr ģints netika formāli atzīta līdz pat 1888. gadam, kad Beibss Rumānijā liellopa eritrocītos pamanīja mikroorganismus, saistot tos ar vēršu hemoglobīnūriju jeb Sarkanā ūdens drudzi. Nedaudz vēlāk līdzīgus mikroorganismus atklāja arī aitas sarkanajās asins šūnās (Babes 1888 cit. pēc Uilenberg 2006). Drīz pēc tam līdzīgs parazīts tika atklāts arī liellopu eritrocītos Teksasas liellopu drudža gadījumā (Smith 1893 cit. pēc Homer et al 2000). 1893. gadā atklātajiem parazītiem tika doti nosaukumi: liellopu babeziozes ierosinātajiem - *Babesia bovis* un *Babesia bigemina*, bet aitu babeziozes ierosinātajam - *Babesia ovis* (Starcovici 1893 cit. pēc Uilenberg 2006). Jau toreiz, 1893. gadā, Smits atklāja, ka babeziozes infekcijas pārnēsētājs ir iesaistītas ērces (Smith 1893 cit. pēc Homer et al 2000). 1957. gadā pirmo reizi tika dokumentēta babeziozes infekcija cilvēkam, kādam Dienvidslāvijas fermerim asins iztriepē tika atklāts *B. bovis* (Skrabalo et al. 1957 cit. pēc Homer et al. 2000). Tomēr, ņemot vērā jau mūsdienu zināšanas un publikāciju datus, ka galvenais cilvēku babeziozes ierosinātājs Eiropā ir *Babesia divergens*, un to, ka ir sarežģīti pēc asins iztriepes morfoloģiski identificēt babēziju sugu, tad pilnīgi iespējams, ka pirmo aprakstīto babeziozes gadījumu cilvēkam izraisīja *B. divergens* (Homer et al. 2000). Savukārt Ziemeļamerikā, tieši ASV, visbiežākais cilvēku babeziozes ierosinātājs ir *Babesia microti* (Vannier et al. 2008).

## 1.2. *Babesia* sp. taksonomija

*Babesia* pieder pie eikariotu domēna, *Apicomplexa* tipa, *Aconoidasida* klases, *Piroplazimda* kārtas, *Babesiidae* dzimtas (Levine 1971 cit. pēc Homer et al. 2000). Ir aprakstītas vairāk kā 100 *Babesia* sugu (Hunfeld et al. 2008 cit. pēc Chauvin et al 2009).

Sākotnēji, izmantojot morfoloģiskas izpētes metodes, tādās kā asins iztriepes gaismas mikroskopiju, pēc babēziju trofozoīta lieluma (viena no babēziju attīstības stadijām eritrocītu iekšpusē), babēzijas klasificēja lielās un mazās babēzijās. Pie lielām babēzijām pieskaitīja tādās, kam trofozoīta lielums bija robežās no 2.5 – 5 μm, piemēram, *B. bovis*, *B. caballi* un *B.*

*canis*, bet pie mazām babēzijām - kam trofozoīta lielums bija 1 – 2.5 μm, piemēram, *B. gibsoni*, *B. microti* un *B. rodhaini* (Homer et al. 2000). Šī morfoloģiskā klasifikācija pamatā sakrita arī ar turpmāk veikto filoģenētisko raksturošanu, kas pamatojas uz kodola mazās subvienības ribosomālo RNS gēna sekvenci, kas parādīja, ka lielās un mazās babēzijas tiešām veido divas filoģenētiski atšķirīgus klasterus (1. attēls). Pateicoties tam, ka 19. gs 80. gados strauji attīstījās un izplatījās molekulārās ģenētikas izpētes metodes, izveidojās gēnu sekvenču datu bāze, kā, piemēram, GenBank, un tika izstrādātas filoģenētiskas analīzes programmas, tas viss ļāva uzlabot babēziju sugu klasifikāciju un atklāt pat jaunas sugas un pasugas, kā, piemēram, *B. canis* gadījumā tika atklātas trīs pasugas: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* un *B. canis rossi* (Uilenberg et al. 1989). Filoģenētiska analīze palīdzēja arī atklāt to, ka mazās babēzijas ir radnieciskākas *Theileria* spp. (arī pieder *Piroplazimda* kārtai) nekā lielās babēzijas, kas liek domāt, ka viņas evolucionāri ir cēlušas no viena kopēja priekšteča. Tāpat filoģenētiska analīze bija par pamatu babēziju sugu reklasifikācijai, piemēram, *B. divergens*, kas morfoloģiski pieskaitāma pie mazām babēzijām (trofozoīta lielums 0.4-1.5 μm), bet ģenētiski ir radniecīga tieši lielām babēzijām (1. attēls) (Homer et al. 2000).



1. attēls. Dažu *Babesia* un *Theileria* sugu filoģenētiskais koks (Homer et al. 2000).

Figure 1. Phylogenetic tree representation of a neighbor-joining analysis of several species of *Babesia* and *Theileria* (Homer et al. 2000)

### 1.2.1. Lielās babēzijas

*B. bovis* ir liellopos parazitējoša babēzija, kura sastopama Āfrikā, Amerikā, Āzijā, Austrālijā un Eiropā (Uilenberg 2006). Suga ir nosaukta un aprakstīta jau 1893. gadā (Starovici 1893 cit. pēc Uilenberg 2006).

*B. caballi* izraisa zirgu piroplazmozi, kas ir visbiežāk sastopamā ērcu pārnēsātā slimība zirgiem. Biežāk sastopama Dienvidēiropā (Földvári et al. 2016).

*B. canis* izraisa babeziozi, dažos avotos dēvēta arī par piroplazmozi, suņiem. Galvenais tās izplatītājs ir *Dermacentor reticulatus* ērces (Földvári et al. 2016). Inficētās ērcu mātītes transovariāli spēj nodot *B. canis* arī nākamai ērcu paaudzei, tādējādi kalpojot ne tikai par *B. canis* infekcijas pārneseju, bet arī par tās rezervuāru (Mehlhorn and Schein 1984 cit. pēc Földvári et al. 2016). *B. canis* sugai izdala trīs pasugas, *B. canis canis* (sastopama Eiropā), *B. canis vogeli* (sastopama Āfrikā) un *B. canis rossi* (sastopama ASV, Āzijā, Āfrikā un Austrālijā), kuru izraisītās infekcijas klīniskās pazīmes dzīvniekiem var būtiski atšķirties (Földvári et al. 2016).

*B. divergens* tiek uzskatīts par galveno cilvēku babeziozes ierosinātāju Eiropā (Homer et al. 2000; Herwaldt et al. 2003). Par *B. divergens* rezervuāru kalpo liellopi, tādēļ lielāks risks inficēties ir tiem cilvēkiem, kuri strādā fermās (Vannier and Krause 2009). Atsevišķi pētījumi norāda, ka ar *B. divergens* var inficēties caur asins pārliešanu, kad inficētas donora asinis tiek pārlietas pacientam (Zintl et al. 2003).

*Babesia sp. venatorum* arī ir cilvēku babeziozes izraisītājs, galvenokārt Eiropā (Vannier and Krause 2009). Tikai ar PCR metodes attīstīšanu, tika izdalīta šī suga, saukta arī par *B. divergens* "māsas sugu", tomēr, atšķirībā no *B. divergens* infekcijas, kas bieži ir smaga un beidzas letāli, *Babesia sp. venatorum* infekcijai nav reģistrēti letāli gadījumi (Vannier and Krause 2009). Aprakstītie *Babesia sp. venatorum* infekcijas gadījumi tika saistīti ar Hodžkina slimību (Haselbarth et al. 2007 cit. pēc Vannier and Krause 2009).

### 1.2.2. Mazās babēzijas

*B. gibsoni* izraisa suņu babeziozi, ko pārnēs *Rhipicephalus sanguineus* ērces. Tas tiek uzskatīts par nozīmīgāko suņu babeziozes izraisītāju pasaulē (Chao et al. 2017). Ar *B. gibsoni* dzīvnieks var inficēties ne tikai pēc ērces koduma, bet arī pēc asins pārliešanas vai transovariāli. Augsta inficēšanās prevalence ir cīņās un darba suņiem (26-39%), jo ar *B. gibsoni* var viegli inficēties caur kostām brūcēm, ar siekalām vai asinīm (Chao et al. 2015 cit. pēc Chao et al 2017).

*B. microti* ir visizplatītākā cilvēku babeziozes izraisītāja ASV (Vannier and Krause 2009). Līdz 2010. gadam uzskatīja, ka tikai *Ixodes* ģints ērces spēj pārnēsāt *B. microti*, tomēr

pēc 2008. gada pētījumiem Polijā, tika pierādīts, ka arī *D. reticulatus* ērces var būt tās pārnēsātājs (Welc-Faleciak et al. 2008 cit.pēc Zygner et al. 2010). *B. microti* var tikt nodots arī ar asins pārliešanu no asimptomātiskiem donoriem vai no inficētās mātes auglim caur placentu (Vannier and Krause 2009).

### 1.3. *Babesia* sp. saimniekorganismi

*Babesia* parazitē gan bezmugurkaulniekos, gan mugurkaulniekos. *Babesia* sugas uzturēšana dabā ir atkarīga no abu tipu saimniekorganismiem, turklāt, tādi bezmugurkaulnieki kā ērces tiek uzskatītas par galvenajiem tās izplatītājiem (Homer et al. 2000).

Līdz šim ir aprakstīts, ka *Babesia* sp. galvenais bezmugurkaulnieku saimniekorganisms ir cietās *Ixodidae* dzimtai piederošas ērces, izņemot vienu, kur *B. meri* gadījumā tās ir *Ornithodoros erraticus* ērces (Gunders 1977 cit. pēc Homer et al. 2000). Atsevišķas *Babesia* sugas, piemēram, *B. bigemina* un *B. equi*, var inficēt vairāk nekā vienas ģints ērces (Telford III et al. 1993 cit. pēc Homer et al. 2000). Dažas ērces, piemēram, *Ixodes dammini*, spēj pārnest vienlaicīgi vairākas *Babesia* sugas (Piesman et al. 1986 cit. pēc Homer et al. 2000).

Mugurkaulnieku klāsts, ko spēj inficēt *Babesia* sp., ir ļoti plašs. Gandrīz katrs zīdītājs var būt *Babesia* saimniekorganisms, sākot no sīkiem grauzējiem, līdz pat savvaļas dzīvniekiem un mājlopiem, kā arī cilvēks (Telford III et al. 1993 cit. pēc Homer et al. 2000).

#### 1.3.1. *Ixodes* sp. ērcu raksturojums

*Ixodes* ērces pieder pie *Archnida* klases, *Ixodida* rindas, *Ixodidae* dzimtai (Mullen and Durden 2009). *Ixodes* ir lielākā ērcu ģints, kas ietverot sevī aptuveni 241 sugu, šis ģints pārstāvji sastopami visā pasaulē, tai skaitā arī Antarktīdā (Mullen and Durden 2009). epidemioloģiski nozīmīgākās *Ixodes* ģints ērces Latvijā ir *I. ricinus* jeb suņu ērce un *I. persulcatus* jeb taigas ērce (Bormane 2007).

*Ixodes* ģints ērcēm izšķir četras attīstības stadijas: ola, kāpurs, nimfa un pieaugušas ērces, mātīte un tēviņš. Vidēji *Ixodes* ģints ērcu dzīves cikls aizņem divus līdz trīs gadus, tomēr pie nelabvēlīgākajiem apstākļiem tas var ievilkties līdz pat sešiem gadiem (Hillyard 1996). Lai *Ixodes* ērces varētu veiksmīgi iziet cauri visām attīstības stadijām un kļūt par pieaugušo ērci, tad tai, sākot ar kāpura stadiju, nepieciešams baroties ar mugurkaulnieka asinīm. Kāpuri un nimfas mēdz baroties uz maziem zīdītājiem (pamatā uz grauzējiem), putniem un pat ķirzakām. Mātītes barojas uz vidēji lieliem un lieliem zīdītājiem, piemēram,

aitām, liellopiem un briežiem. Mātītēm asinis ir vitāli nepieciešama, lai veiksmīgi nobriestu tās apaugļotās olas. Mātītes barojas uz saimniekorganisma 6-12 dienas, pēc tam nokrīt zemē, seko inkubācijas periods, pēc kura tās izdēj vairākus 2000- 3000 olu un tad tās mirst. Pieaugušie tēviņi nemēdz baroties ar asinīm, reti kad tie ir atrasti piesūkušies pie saimniekorganisma, parasti uz tā viņi meklē mātītes (Hillyard 1996). *I. ricinus* un *I. persulcatus* ērcēm Ziemeļ-Eiropā, tostarp arī Latvijā, pieaugušām ērcēm izdala divus aktivitātes periodus, kad tās aktīvi meklē saimniekorganismus, lai uz tām barotos un vairotos. Pirmais aktivitātes periods ilgst no aprīļa līdz jūnijam, tad pieaugušām ērcēm iestājas pauze, otrais aktivitātes periods sākas agrā rudenī un ilgst līdz pat oktobra beigām, savukārt nimfas un kāpuri paliek aktīvas visu šo laiku. Ziemā *Ixodes* ērces nav aktīvas (Hillyard 1996; Bormane 2007).

### 1.3.2. *Dermacentor* sp. ērcu raksturojums

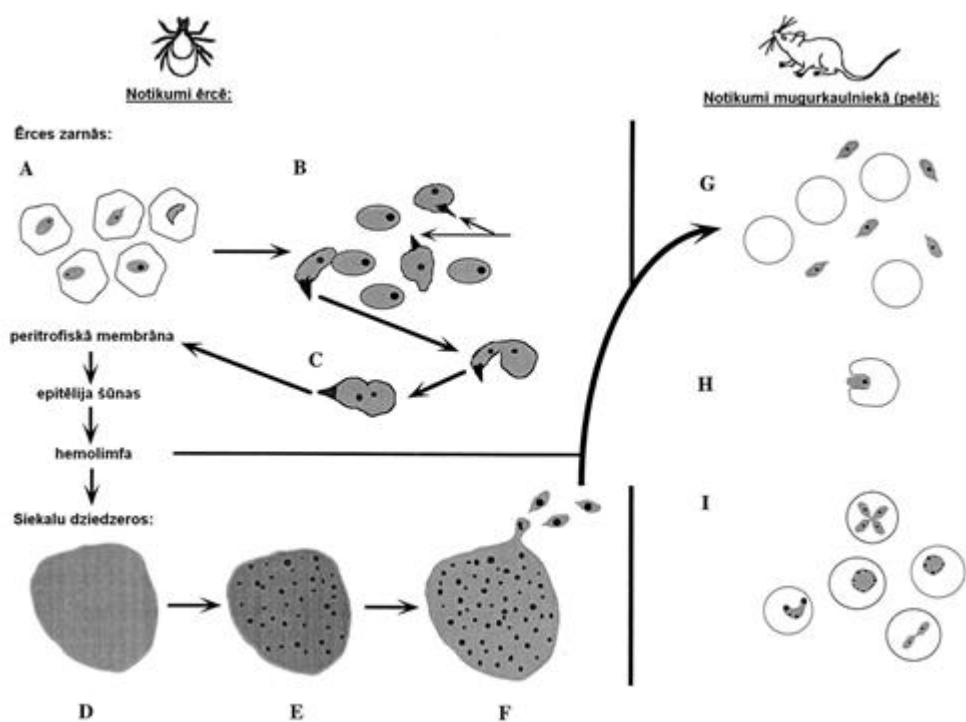
*Dermacentor* tāpat ka *Ixodes* ērces arī pieder pie *Archnida* klases, *Ixodida* rindas un *Ixodidae* dzimtai, kur izdala *Demacentor* ģinti, pie kuras pašlaik tiek pieskaitītas 35 ērcu sugas (Földvári et al. 2016). Īpaši jāizceļ *D. reticulatus* ērci, kas ir epidemioloģiski svarīga pasaules mērogā, jo piedalās vairāku infekcijas aģentu izplatībā (Mierzejewska et al. 2015). Centrālajā Eiropā *D. reticulatus* ir galvenais *B. canis* izplatītājs (Beugnet 2009 cit. pēc Mierzejewska et al. 2015).

*D. reticulatus* ir 3-5x lielākas nekā *Ixodes* sp. ērces, to kāpuri ir 0.5 mm lieli, nimfas - 1.8 mm, tēviņi ir lielāki ne kā mātītes, bet pilnībā paēdusi mātītes var sasniegt pat 1 cm lielumu (Földvári et al. 2016). Tāpat ka *Ixodes* sp. arī *D. reticulatus* ērcēm izšķir četras attīstības stadijas, taču tās ir krietni īsākas. Pie labvēlīgākiem apstākļiem *D. reticulatus* ērce visu dzīves ciklu var pagūt iziet viena gada laikā, vai divu gadu laikā, ja tā bija spiesta pārziemot esot nepaēdušai (Földvári et al. 2016). No tikko izdētās olas, jauns kāpur izšķelsies jau pēc 12-19 dienām (Nosek 1972 cit. pēc Földvári et al. 2016). Paēdušais *D. reticulatus* kāpurs jau pēc mēneša spēj attīstīties par nimfu (Randolph et al 1999 cit. pēc Földvári et al. 2016). Mēdz gadīties tā, ka uz viena saimniekorganisma nereti ir atrodamas *D. reticulatus* ērces, kas pārstāv vienu un to pašu paaudzi, bet atrodas dažādās attīstības stadijās (Paziewska et al. 2010 cit. pēc Földvári et al. 2016). Neēdušas pieaugušas ērces var saglabāt dzīvotspēju 3- 4 gadus (Földvári et al. 2016). Līdzīgi kā *Ixodes* sp. ērces, arī *D. reticulatus* ērcu kāpuri un nimfas barojas pamatā uz maziem zīdītājiem, bet pieaugušas ērces uz vidēji lieliem un lieliem zīdītājiem. *D. reticulatus* bieži barojas grupās, tādejādi saimniekorganismam radot makroskopiskus ādas bojājumus un lokālus iekaisumus (Buczek et al. 2015 cit. pēc Földvári et al. 2016). Atšķirībā no *Ixodes* sp ērcu tēviņiem, *D. reticulatus* tēviņi tiešām sūc asinis no

saimniekorganisma. Parasti *D. reticulatus* kāpuri uz saimniekorganisma barojas 2 - 6 dienas, nimfa 4 - 12, mātītes 7 - 15, bet tēviņi 3 - 5 dienas (Földvári et al. 2016). Apaugļota mātīte 6-25 dienu laikā spēj izdēt 3000-7200 olas, pēc tam tās mirst (Nosek 1972 cit. pēc Földvári et al. 2016). Arī *D. reticulatus* ērcēm ir atšķirīgi aktivitātes periodi, kas ir atkarīgs no to attīstības stadijas: kāpuri ir aktīvi maijā - jūlijā, nimfas parasti ir aktīvas jūlijā - augustā, savukārt pieaugušām ērcēm izdala divus aktivitātes periodus, pirmais ir martā - aprīlī, bet otrais septembrī - oktobrī, kuriem pa starpu iekrīt neaktīvais periods vasarā (Sonenshine, 1993 cit. pēc Földvári et al. 2016). Salīdzinot ar *Ixodes* sp. ērcēm, *D. reticulatus* pēc ziemas perioda ātri atkopjas un kļūst atkal aktīvas, kas ir saistīts ar to labāku pielāgošanas spēju izturēt zemas temperatūras (Kokhov et al. 2014 cit. pēc Földvári et al. 2016).

#### 1.4. *Babesia* sp. dzīves cikls

*Babesia* sp. dzīves ciklu sastāda vismaz trīs attīstības stadijas, kā parādīts 2.attēlā (Homer et al. 2000).



2.attēls. Babēziju dzīves cikls ērcēs un mugurkaulniekos (Homer et al. 2000).

Figure 2. Life cycle of *Babesia* spp. in the tick and vertebrate hosts (Homer et al. 2000).

Pirmā attīstības stadija notiek ērcu zarnās, kur notiek babēziju dzimumvairošanās, gametu veidošanās un saplūšana, veidojas zigota, kas caur ērces audiem nonāk ērcu siekalu

dziedzeros. Siekalu dziedzeros notiek babēziju otrā attīstības stadija – sporogonija, tā ir bezdzimumvairošanās stadija, kad no zigotas veidojas daudzkodolu sporoblasti, kuru izmēri svārstās no 60-300 μm diametrā (Chauvin et al. 2009). Babēziju trešā attīstības stadija notiek brīdī, kad ērce ir piesūkusies pie mugurkaulnieka un barojas ar tā asinīm. Tad ērcu siekalu dziedzeros no esošiem sporoblastiem attīstās 5000 – 10000 sporozoīti, kuri ērces barošanās laikā nokļūst mugurkaulnieka asinsritē (skatīt 2. attēlu G). Sporozoīti inficē mugurkaulnieka eritrocītus (2. attēls H), kur pārveidojas par trofozoītiem un sāk bināri dalīties – notiek babēziju bezdzimumvairošanās, veidojot dažādas gredzenveida un krustam līdzīgas formas (2. attēls I) (Kakoma et al. 1993 cit. pēc Homer et al. 2000). Daži trofozoīti kļūst par gametu priekštečiem, kuri vizuāli no pārējiem trofozoītiem atšķiras tikai izmēru ziņā, tie ir lielāki, taču neskatoties uz to mugurkaulniekos nevar notikt babēziju dzimumvairošanās. Babēziju dzimumvairošanās var notikt tikai ērcēs, kad cita ērce sasūcas slima mugurkaulnieka asinis, tad arī no gametu priekštečiem veidojas īstas gametas, kuras saplūstot veido zigotu, tā atsākas no jauna babēziju dzīves cikls (Homer et al. 2000).

### **1.5. *Babesia* sp. ģeogrāfiskā izplatība**

Raksturojot *Babesia* sp. ģeogrāfisko izplatības areālu, parasti izšķir divus līmeņus: endēmiskos reģionus, kuros patogēns ir sastopams visu laiku un regulāri tiek reģistrēti saslimšanas gadījumi, un reģionus, kuros *Babesia* sp. sastopamība tiek saistīta ar dzīvnieku vai cilvēku ceļošanu (Irwin 2009).

Katrai *Babesia* sugai izplatības reģions ir atšķirīgs, tomēr liela daļa sugu ir izplatītas Eiropā, Austrumu un Dienvidāzijā. Dažu *Babesia* sugu izplatības areāls aptver gandrīz visu pasauli, bet, piemēram, Ziemeļeiropā *Babesia* sp. ir reti sastopamas (Zygner et al. 2010).

### **1.6. Babeziozes diagnostika**

Tā kā babeziozes simptomi bieži vien ir nespecifiski, ir nepieciešami laboratoriski izmeklējumi, lai uzstādītu diagnozi (Vannier and Krause 2009). Lai diagnosticētu babēziju infekcijas, ir radīti neskaitāmi testi. Sarkanā ūdens drudža gadījumi parasti tiek atklāti pēc klīniskiem simptomiem un epidemioloģiskiem datiem, sezonas sākums un individuālās anamnēzes (Gray et al. 1985 cit. pēc Zintl et al. 2003). Laboratoriski parasti *Babesia* infekcijas diagnosticē, izmantojot asins iztriepes mikroskopēšanu gaismas mikroskopā (Trees 1974 cit. pēc Zintl et al. 2003), seroloģiski izmeklējot serumu uz specifisko anti-babēziju antivielu klātbūtni, izmantojot imunofluorescento antivielu testu (IFAT) (Zintl et al. 2003), kā

arī izmantojot molekulārās metodes, kā PCR (polimerāzes ķēdes reakciju) (Persing et al. 1992 cit. pēc Homer et al 2000). Klīniski morfoloģiskas izmaiņas slimā organismā var tikt noteiktas arī ar magnētisko rezonansi, veicot aksiālās tomogrāfijas skenēšanu (Homer et al. 2000). *Babesia* parazitēmiņu var diagnosticēt arī mikrobioloģiski, veicot bioloģisko provi, kad ar slima pacienta asinīm inficē laboratorijas dzīvniekus, piemēram, jūras cūciņas, tomēr šī metode nav piemērota ātrai diagnozes uzstādīšanai, jo *Babesia* parazitēmiņa dzīvnieka asinīs parasti parādās 2 - 4 nedēļas pēc ievadīšanas (Vannier and Krause 2009).

## **1.7. *Babesia* sp. slimības pazīmes un ārstēšana**

### **1.7.1. *Babesia* sp. infekcija cilvēkos**

Pirmais reģistrētais un aprakstītais gadījums, kad *Babesia* infekcija tika atklāta cilvēkam, notika 1957. gadā (Skrabalo and Deanovic 1957 cit. pēc Vannier and Krause 2009).

Vieglākos slimības gadījumos, galvenokārt pie *B. microti* infekcijām, simptomi ir līdzīgi virusālām infekcijām, kas izpaužas ar vispārējās intoksikācijas simptomiem: nogurumu, vārgumu, ar pārejošu drudzi un/vai drebuļiem, svīšanu, galvassāpēm, miaļģiju, anoreksiju, klepu un sliktu dūšu (Krause et al. 1996, Hatcher et al. 2001, White et al. 1998 cit. pēc Vannier and Krause 2009). Šāda babeziozes forma parasti ilgst no nedēļas līdz pat vairākiem mēnešiem, retos gadījumos pat līdz gadam. Ja infekciju neārstē, tad tā pāriet hroniskā formā, tai izšķir divas stadijas, remisiju (simptomi izzūd, pacients jūtas labi) un recidīvu (infekcijas reaktivējas, parādās simptomi, pacients jūtas slikti), kas mijās savā starpā (Krause et al. 2008 cit. pēc Vannier and Krause 2009).

Smagākie babeziozes gadījumi parasti novēroti cilvēkiem, kuriem jau pamatā ir kāda imunodepresīva slimība, kā, piemēram, HIV un ļaundabīgi audzēji (Krause et al. 2008 cit. pēc Vannier and Krause 2009). Visbiežāk sastopamās klīniskas izpausmes pie babeziju infekcijām ir akūts respiratorais stress elpošanas sistēmā, sirds, aknu un nieru mazspēja (Hatcher et al. 2001 cit. pēc Vannier and Krause 2009). Eiropā cilvēkiem pamatā diagnosticē *B. divergens* infekciju, kas parasti izpaužas smagā formā (Zintl et al. 2003). Simptomi parasti parādās vienu līdz trīs nedēļas pēc ērces piesūkšanās, un izpaužas ar drudzi, kam seko intravaskulāra hemolīze, kas rezultējas hemoglobīnēmijā, hemoglobīnūrijā un dzeltē. Slimība ātri progresē, nedēļas laikā aptuveni trešdaļa neārstēto pacientu mirst (Vannier and Krause 2009).

Asimptomiskas infekcijas, kuras izraisa *B. microti*, var iegūt, veicot asins pārlišanu no inficēta, asimptomiska donora; infekcijas inkubācijas periods parasti ilgs no vienas līdz deviņām nedēļām (Hunfeld et al. 2008 cit pēc Vannier and Krause 2009). Asimptomiska

infekcija organismā var eksistēt no dažiem mēnešiem līdz pa vairākiem gadiem, tikai pēc tam attīstās babeziozes klīniskās pazīmes (Krause et al. 1998 cit. pēc Vannier and Krause 2009).

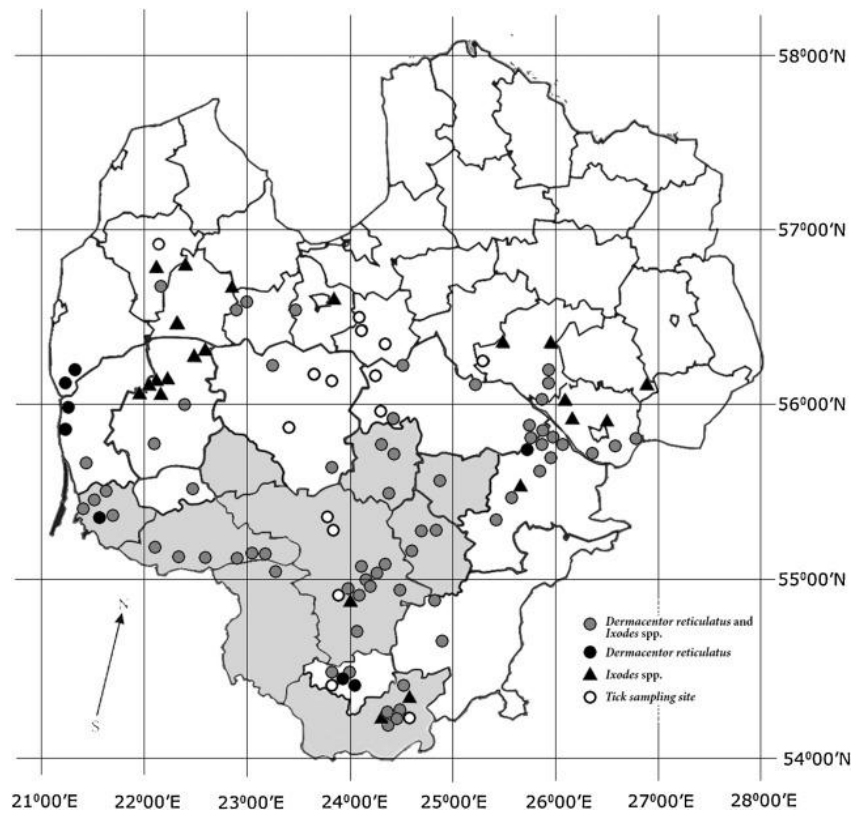
Bieži vien babeziozi veiksmīgi var izārstēt 1-2 nedēļu laikā, lietojot atovakonu un azitromicīnu, retāk klindamicīnu un kvinīnu (smagākos gadījumos) (Krause et al. 2000 cit. pēc Krause et al. 2008). Smagākos gadījumos, lai samazinātu *Babesia* daudzumu asinīs, pacientam veic asins pārlišanu ar pilnu asins apmaiņu, kad pacienta asinis pilnīgi aizvieto ar donora asinīm (Vannier and Krause 2009). Līdz šim Latvijā nav reģistrēti lokāli/endēmiskas izcelsmes babeziozes gadījumi cilvēkiem.

### **1.7.2. *Babesia* sp. infekcija dzīvniekos**

Dzīvniekiem, kuri ir inficēti ar *Babesia* sugas patogēnu, parasti piedzīvo novēro drudzi, apātiju, ēstgribas trūkumu, anēmiju un trombocitopēniju (Sollano-Gallego et al. cit. pēc Berzina et al. 2013). Pašlaik Eiropā *Babesia* infekcijas ārstē, izmantojot imidokarba dipropionātu (Imizol, Scherig Plough) (Zintl et al. 2003). Tā kā imidokarbs ir ļoti toksisks, tas ir jāievada tikai intramuskulāri (Wood 1971 cit. pēc Zintl et al. 2003). Akūtos, smagākos gadījumos, kad dzīvniekam novēro smagu parazitēmiju, arī izmanto pilnu asins apmaiņu (Sherlock et al. 2000 cit. pēc Zintl et al. 2003). Tāpat kā cilvēki, arī dzīvnieki var būt asimptomātiski pret babēzijām (Conrad et al. 1991 cit. pēc Bormane 2007).

Eiropā galvenais suņu babeziozes izraisītājs ir *B.canis*. Ir apstiprināti suņu babeziozes gadījumi no Austrijas, Horvātijas, Francijas, Vācijas, Ungārijas, Itālijas, Nīderlandes, Portugāles, Spānijas, Šveices, kā arī Norvēģijas (Matijatko et al. 2012; Azmi et al. 2016; Blaschitz et al. 2008). Latvijā pirmais babeziozes gadījums sunim, kas nav ceļojis ārpus Latvijas, apstiprināts tikai 2013. gadā publicētajā pētījumā. Lai arī ir bijušas aizdomas par babēziju infekciju suņiem Latvijā jau iepriekš, tomēr nav bijis skaidrs, vai dzīvnieki nav inficējušies ārpus Latvijas (Berzina et al. 2013). Līdzīgi arī Lietuvā- lai arī jau kopš 2003. gada ir konstatēti suņu babeziozes gadījumi, tikai 2014. gadā tika molekulāri apstiprināta *B.canis* infekcija, turklāt norādīja, ka cirkulē divu genotipu *B.canis*, kas, visticamāk, izraisa atšķirīgas klīniskās izpausmes (Paulauskas et al. 2014).

*B.canis* izplatība tiek tieši saistīta ar *D.reticulatus* ērcu izplatības areālu (Paulauskas et al. 2014). Līdz 2015. gadam nebija oficiāli publicētu datu par *Dermacentor* ģints izplatību Latvijā, tikai npublicēti novērojumi (Bormane 2007, Bērziņa 2013), līdz Lietuvas zinātnieki publicēja datus par 2013. un 2014. gadā ievāktām ērcēm no Latvijas dienvidu daļas (3. attēls), kuru vidū bija arī *D.reticulatus* ērces (Paulauskas et al. 2015).



3.attēls Ērču ievākšanas vietas Lietuvā un Latvijā 2013.-2014.gadā (Paulauskas et al. 2015)

Figure 3. Tick sampling sites in Lithuania and in Latvia, 2013–2014 (Paulauskas et al. 2015).

## 2. Materiāli un metodes

### 2.1. Ērces un asins paraugi

Ērces tika noņemtas no suņiem 2011. un 2016. gadā veterinārajās klīnikās no dažādiem Latvijas reģioniem. Lai atvieglotu statistisku analīzi, paraugi tika dalīti par reģioniem, par pamatu ņemot Latvijas administratīvā iedalījuma karti 3.attēlā.



4. attēls. Latvijas administratīvā iedalījuma karte.

Figure 4. Map of statistical regions of Latvia.

Kopā no suņiem tika ievāktas 632 ērces (2011. gadā 243 ērces, 2016. gadā 389 ērces). Tās tika ievietotas 70% etanolā un uzglabātas pie  $-20^{\circ}\text{C}$  līdz DNS izdalīšanai. Tā kā ērces to ievākšanas momentā tika mehāniski deformētas un daļa ērcu bija sasūkušas ar asinīm, tad to sugas piederību pēc morfoloģiskām pazīmēm bija grūti noteikt, līdz ar to ievākto ērcu taksonomisko piederību noteica tikai līdz ģintij par pamatu ņemot taksonomiskām pazīmēm, kas aprakstītas pēc Hilljarda (Hillyard 1996).

2016. gadā tika ievākti arī 10 asins paraugi no klīniski slimiem suņiem, kam bija babeziozes simptomātika un 1 liesas paraugs no mirušā suņa, kurš miris no babeziozes. Klīnisko paraugu ievākšanu veica veterinārajā klīnikā, asinis līdz DNS tika uzglabātas pie  $+4^{\circ}\text{C}$ . Asins un liesas paraugu sadalījums pēc to ievākšanas vietas ir apkopotas 1. tabulā.

1. tabula.

2016. gadā no suņiem ievākto asins un liesas paraugu sadalījums pēc to ievākšanas vietas.

Table 1.

Territorial belonging of blood and spleen of dog samples in 2016.

Reģions	Novads/Mikrorajons	Asins paraugs	Liesas paraugs
Rīgas	Mežaparks	1	0
	Āgenskalns	2	0
	Bolderāja	1	0
	Daugavgrīva	3	1
Pierīgas	Babītes	1	0
	Tukuma	1	0
Zemgales	Neretas	1	0
Kopā :		10	1

## 2.2. Izmantotie reaģenti

2. tabula.

Izmantot reaģentu saraksts.

Table 2.

List of reagents that were used in this study.

Reaģenta nosaukums	Ražotājs	Izcelsmes valsts
10mM dNTPs	Thermo Fisher Scientific	ASV
10x Taq buferis ar (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> bez MgCl <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific	ASV
25mM MgCl <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific	ASV
5x Big Dye sekvencēšanas buferis	Applied Biosystems	ASV
Top Vision Agarose (Agarozē)	Thermo Fisher Scientific	ASV
Big Dye Terminator Mix	Applied Biosystems	ASV
Sephadex G-50 Fine	Sigma-Aldrich	ASV
HiDi (formaldehīds)	Applied Biosystems	ASV
Etanols 96°	Enola	Latvija
EDTA (etilēndiamīntetraetiķskābe)	AppliChem	Vācija
Efīdija bromīds 10mg/ml	Serva	Vācija
Fenols	Sigma-Aldrich	ASV
Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (garuma marķieris)	Thermo Fisher Scientific	ASV
Hloroforms	PENTA	Čehija

Izopropanols	Stanchem	Polija
NaCl	P.P.H.Stanlab	Polija
Nātrija acetāts	Merck	ASV
SDS (nātrija dodecilsulfāts)	Serva	Vācija
TRIS (trihidroksiaminometāns)	Reneal	Ungārija
6x Loading Dye solution (paraugu uznešanas krāsa)	Thermo Fisher Scientific	ASV
Water, Nuclease free	Thermo Fisher Scientific	ASV
Glicerīns	Sigma-Aldrich	ASV

3. tabula.

Izmantotie fermenti

Table 3.

Enzymes used in this study

<b>Fermenta nosaukums</b>	<b>Ražotājs</b>	<b>Izcelsmes valsts</b>
Taq DNA Polymerase, 5U/μl (DNS polimerāze)	Thermo Scientific	ASV
<i>ExoI</i> , 20 U/μl (Eksonukleāze I)	Thermo Scientific	ASV
Proteināze K, 20 mg/ml	Thermo Scientific	ASV
FastAP, 1U/μl (Sārmainā fosfotāze)	Thermo Scientific	ASV

### 2.3. Izmantotie praimerī

4. tabula.

Izmantotie praimerī.

Table 4.

Primers used in this study

<b>Primera nosaukums</b>	<b>Sekvence (5' – 3')</b>	<b>Avots</b>
5-22F	GTTGATCCTGCCAGTAGT	Birkenheuer et al. 2003
1661R	AACCTTGTTACGACTTCTC	Birkenheuer et al. 2003
455-479F	GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC	Birkenheuer et al. 2003
793-772R	ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA	Birkenheuer et al. 2003

Visi praimerī tika ražoti Metabion International AG, Vācijā.

## 2.4. Izmantotie šķīdumi un gēli

- **2x Loading Dye**
  - 50 µl 6x Loading Dye
  - 50 µl destilēts ūdens
  - 30 µl glicerīns
- **Šķelšanas buferis (koncentrāts)**
  - 300 mM NaCl
  - 30 mM TRIS (pH 7,6)
  - 75 mM EDTA (pH 8,0)
  - 1,5% SDS
- **1x TE buferis**
  - 10 mM Tris (pH 8,0)
  - 1 mM EDTA
- **1x TAE buferis**
  - 40 mM Tris
  - 20 mM Nātrija acetāts
  - 1 mM EDTA
- **1M Tris (pH 7.6) uz 1 litru**
  - 121,14 g Tris
  - 600 ml H<sub>2</sub>O

Ar koncentrētu HCl noved līdz pH 7.6, tad ar H<sub>2</sub>O noved līdz gala tilpumam 1 litrs, autoklāvē 10 min pie +110°C un 0,5 atm., uzglabā istabas temperatūrā.

- **2M Tris (pH 8.2) uz 1 litru**
  - 242,28 g Tris
  - 600 ml H<sub>2</sub>O

Ar koncentrētu HCl noved līdz pH 8.2, tad ar H<sub>2</sub>O noved līdz gala tilpumam 1 litrs, autoklāvē 10 min pie +110°C un 0,5 atm., uzglabā istabas temperatūrā.

- **0,5 M EDTA (pH 8.0) uz 500 ml**

93,06 g EDTA

300 ml H<sub>2</sub>O

Negaidot, kad EDTA izšķīst, sāk novest pH ar 10 M NaOH līdz pH 8.0, tad ar H<sub>2</sub>O noved līdz gala tilpumam 500 ml, autoklāvē 10 min pie +110°C un 0,5 atm., uzglabā istabas temperatūrā.

- **5 M NaCl uz 500 ml**

146,1 g NaCl izšķīdina līdz gala tilpumam 500 ml ar H<sub>2</sub>O

Autoklāvē 10 min pie +110°C un 0,5 atm., uzglabā istabas temperatūrā.

- **10% SDS uz 100 ml**

10 g SDS

100 ml H<sub>2</sub>O.

Autoklāvē 10 min pie +110°C un 0,5 atm., uzglabā istabas temperatūrā.

- **10 M NaOH uz 100 ml**

40 g NaOH

100 ml H<sub>2</sub>O

- **CSS (Cell suspension solution)**

25 mM EDTA (pH 8.0)

200mM NaCl

- **Buferēts fenols (pH 8.0) uz 1 litru**

Pagatavošanas darba gaita:

1. Lēni un uzmanīgi atkausē fenola kristālus ūdens vannā.

2. Attiecībā 1 kg fenola un 1 litrs 0.2 M Tris bufera (100 ml 2M Tris (pH 8.2) + 900 ml H<sub>2</sub>O), maisa uz magnētiska maisītājā velkmes skapī 30 min, nostādina 30 min, tad nolej pēc iespējas vairāk virsējo ūdens fāzi.

3. Pievieno 1 litru 0,1M Tris bufera (50 ml 2M Tris (pH 8.2) + 950 ml H<sub>2</sub>O) maisa uz magnētiska maisītājā velkmes skapī 30 min, nostādina 30 min, tad nolej pēc iespējas vairāk virsējo ūdens fāzi, atstājot plānu bufera slāni, kas pasargās fenolu no tiešas saskares ar gaisu un ātras oksidēšanās.

4. Glabā tumsā pie +4°C. Neizmantojot, ja fenols ir kļuvis rozā krāsā.

## 2.5. Izmantotā aparatūra

5. tabula.

Izmantotā aparatūra

Table 5.

Hardware used in this study

Iekārtas nosaukums	Ražotājs	Izcelsmes valsts
Stereomikroskops OPTIKA ST-170	Optika Microscopes	Itālija
Centrifūga Eppendorf 5415R	Eppendorf	Vācija
Mikrocentrifūga Microspin FV-2400	Biosan	Latvija
Vorteksētājs V-01/3	Labotek	Dānija
Termostats Heto DT Hetotherm	Bergman&Bevaving Lab	Zviedrija
Elektroniskie svāri Sartorius TE 412	Data Weighing Systems	ASV
Spektrofotometrs NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific	ASV
UV gaismas transluminators ar gelu fotogrāfēšanas sistēmu C-80 Epi-Illumination UV Darkroom	Ultra-Violet products	Lielbritānija
PCR termocikleris GeneAmp <sup>®</sup> PCR system 9700	Applied Biosystems	ASV
Elektroforēzes iekārta Wide-Mini Sub <sup>®</sup> Cell GT	Bio-Rad Laboratories	ASV
Līdzstrāvas avots Electrophoresis Power Supply-EPS 301	Amersham Biosciences	Lielbritānija
ABI PRISM 3130xl	Applied Biosystems	ASV

## 2.6. Izmantotā programmatūra

Finch TV Version 1.4.0 software (Geospiza Inc., USA) – sekvenču hromatogrammas apskatīšanai un kvalitātes pārbaudei.

BLAST programma (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) – parauga sekvenču salīdzināšana ar datu bāzē pieejamām sekvenču.

NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) – publiski pieejamo sekvenču datu bāze.

MEGA6 software version 6.0 package (Tamura et al. 2013; <http://www.megasoftware.net>) – filoģenētiskas analīzes veikšanai.

QuicCalcs Software (GraphPad Software, ASV, <http://graphpad.com>) - Fišera precizitātes testa (two-tailed Fisher exact test) aprēķināšanai.

## 2.7. Metodes

### 2.7.1. DNS izdalīšana no ěrcēm

DNS izdalīta no ěrcēm pēc V. Čapliginas modificētās metodes (Capligina et al. 2014)

1. ěrci izvelk no spirta, ar salvetes palīdzību to nosusina.
2. ěrci pārnēs tīrā mikrostobrā, pievieno 300 μl ūdens (mikrobioloģiski un ķīmiski tīra) un saspaida ar plastmasas sterilo, vienreizlietojamo piestu.
3. ěrču suspensiju 100 μl pārfasē tīrā mikrostobriņā, pievieno 50 μl šķelšanas bufera koncentrāta un 2,5 μl Proteināzi K. Inkubē 1-2 stundas karstā ūdens vannā pie +50°C.
4. Pievieno 150 μl fenola, vorteksē vismaz 15 sekundes un centrē istabas temperatūrā 10 min pie 4000 apgr./min (1500x g).
5. Augšējo frakciju 120 μl pārnēs uz jaunu mikrostobriņu, pievieno 120 μl hloroforma, vorteksē vismaz 15 sek un pēc tam centrē istabas temperatūrā 10 min pie 4000 apgr./min (1500x g).
6. Augšējo frakciju 90 μl pārnēs uz jaunu mikrostobriņu, pievieno 90 μl izopropilspirta, maigi samaisa, centrē 15 min pie +4°C un 12 000 apgr./min (13400x g).
7. Nosūc supernatantu un izmet. Pie nogulsnēm pievieno 200 μl auksta 70% etanola un centrē 5 min pie +4°C un 12 000 apgr./min (13400x g).
8. Nosūc supernatantu un izmet. DNS nogulsnes žāvē istabas temperatūrā 10 min, kamēr izgaro viss etanols.
9. Pie nogulsnēm pievieno 50 μl 1xTE bufera, tur pa nakti istabas temperatūrā, lai DNS izšķīst.
10. Mēra DNS koncentrāciju un tīrību uz NanoDrop 2000 spektrofotometriski pie 260/280 nm un 260/230 nm.
11. DNS glabā pie -20°C.

### 2.7.2. DNS izdalīšana no asinīm

DNS izdalīta no asinīm pēc modificētas metodes (Tiškina et al. 2016)

1. Pie 500 μl asinīm pievieno 500 μl CSS, 100 μl 10% SDS un 2,5 μl Proteināzi K, samaisa mikrostobriņu trīs reizes apgriežot otrādi un inkubē ūdens vannā 1-2 stundas pie +50°C.
2. Pievieno 1 ml buferēta fenola (pH 8.0), maisa uz vorteksa 30 sekundes un centrē 10 minūtes istabas temperatūrā pie 4000 apgr./min (1500x g).

3. Augšējo frakciju pārnes uz jaunu mikrostobriņu, vēlreiz pievieno 1 ml buferēta fenola (pH 8.0), maisa uz vorteksa 30 sekundes un centrē 10 minūtes istabas temperatūrā pie 4000 apgr./min (1500x g).

4. Augšējo frakciju pārnes uz jaunu mikrostobriņu, pievieno 1 ml hloroforma, maisa uz vorteksa 30 sekundes un centrē 10 minūtes istabas temperatūrā pie 4000 apgr./min (1500x g).

5. Augšējo frakciju pārnes uz jaunu mikrostobriņu, pievieno 1 ml izopropilspirta, maigi samaisa apgriežot mikrostobriņu otrādi vairākas reizes, nedrīkst kratīt. To dara, kamēr izveidojas DNS precipitāts. Ja DNS precipitāts neizveidojas, tad stobriņu ievieto pie -20°C vismaz uz 20 min (var turēt pie -20°C 2 diennaktis).

6. Centrifugē mikrostobriņu 15 minūtes +4°C pie 12 000 apgr/min (13400x g).

7. Atsūc un izmet visu supernatantu, un pievieno 1 ml auksta 70% etanola, nedrīkst maisīt un kratīt.

8. Centrifugē mikrostobriņu 15 minūtes +4°C pie 12 000 apgr./min (13400x g).

9. Atsūc un izmet visu supernatantu, nogulsnes žāvē istabas temperatūrā 10-30 minūtes, kamēr izgaro viss etanols.

10. Pie nogulsnēm pievieno 50-250 µl 1x TE bufera (daudzums ir atkarīgs no tā, cik liels bija DNS precipitāts), atstāj istabas temperatūrā pa nakti, lai DNS nogulsnes izšķīst.

11. Mēra DNS koncentrāciju un tīrību uz NanoDrop 2000 spektrofotometriski pie 260/280 nm un 260/230 nm.

12. DNS glabā pie -20°C.

### **2.7.3. *Babesia* sp. 18S rRNS gēna noteikšana DNS paraugos ar PCR metodi**

*Babesia* sugu klātbūtni noteica, izmantojot divpakāpju polimerāzes ķēdes (PCR) reakciju (Birkenheuer et al. 2003), kura tika optimizēta mūsu apstākļiem (Pavulina 2011).

6. tabula.

PCR reakcijas maisījums vienam paraugam (V=26µl)

Table 6.

PCR mix for 1 sample (V=26µl)

	Gala konc.	1par. (µl)
millipora H2O		17,6
10x Taq buferis ar (NH4)2SO4	1x	2,6
25mM MgCl2	2,5 mM	2,6
10mM dNTP mix	200 µM	0,52
10 µM forward praimeris	0,2 µM	0,52
10 µM reverse praimeris	0,2 µM	0,52
5 u/µl Taq DNA Polymerase	0,8 U	0,16
PCR mix tilpums µl		24
Parauga DNS µl		2

Pirmās PCR reakcijas apstākļi un izmantotie praimeris:

Tiešais praimeris: 5-22F

Reversais praimeris: 1661R

sākuma denaturācija 1 minūte pie +95°C

denaturācija 20 sekundes pie +95°C

hibridizācija 30 sekundes pie +55°C

elongācija 60 sekundes pie +72°C

beigu elongācija 5 minūtes pie +72°C

} 35 cikli

Otrās PCR reakcijas apstākļi un izmantotie praimeris:

Tiešais praimeris: 455-479F

Reversais praimeris: 793-772R

sākuma denaturācija 1 minūtes pie +95°C

denaturācija 20 sekundes pie +95°C

hibridizācija 30 sekundes pie +55°C

elongācija 30 sekundes pie +72°C

beigu elongācija 5 minūtes pie +72°C

} 35 cikli

PCR reakcijas produktus analizēja 1,5% agarozes gelā.

#### 2.7.4. PCR produktu analīze agarozes gelā ar elektroforēzes metodi

1. Nosver 1,5 g agarozes un pievieno 100 ml 1xTAE bufera.

2. Maisījumu karsē mikroviļņu krāsnī pie 750W aptuveni 2 min vai līdz agaroze izkūst.

3. Pievieno 5 µl etīdija bromīdu (10mg/ml) un samaisa.

4. Atdziest agarozu līdz +60°C.

5. Agarozu ielej elektroforēzes vannītē, ievieto ķemmītes un ļauj tai sacietēt.

6. Kad agaroze sacietējusi, izņem ķemmītes un gelu ievieto elektroforēzes kamerā.

7. Elektroforēzes kamerā ielej 1xTAE buferi, lai tas aplātu gelu un tā bedrītes.

8. Ņem 5µl otrās PCR reakcijas produkta (amplikona) un sajauc ar 2µl 6x Loading Dye, tad iepilda gela bedrītē. PCR produkta garuma kontrolei, atsevišķā bedrītē iepilda arī 5µl garuma marķiera Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder.

9. Elektroforēzes kameru pieslēdz pie līdzstrāvas avota, izvēlas režīmu pie 100V, 70 mA, 50 min.

10. Gēlu apskata un nofotografē UV starojumā pie 590 nm.

#### 2.7.5. PCR produktu apstrāde pirms sekvencēšanas ar fermentiem *ExoI* un FastAP.

1. PCR produktam pievieno 0,5µl *ExoI* (20 U/µl) un 2µl FastAP (1U/µl).

2. Paraugu vorteksē, nocentrē un liek termociklerī pie sekojošiem apstākļiem:

+37°C 40 min

+95°C 20 min

#### 2.7.6. PCR produkta sekvenēšana

1. Sagatavo reakcijas maisījumu (1 paraugam):

H <sub>2</sub> O (tīrs no nukleāzēm)	5µl
5x Big Dye sekvencēšanas buferis	2µl
Big Dye Terminator Mix	0,5µl
10µM Praimeris	0,5µl

2. Pie 8µl sekvenēšanas reakcijas maisījuma pievieno 2 µl PCR produkta, kas pirms tam tika apstrādās ar fermentiem *ExoI* un FastAP, paraugu kārtīgi vorteksē un nocentrē.

3. Veic sekvencēšanas reakciju termociklerī pie sekojošiem apstākļiem:

+95°C 5 min

+95°C 15 sek

+50°C 5 sek

+60°C 4 min

} 25 cikli

### **2.7.7. Sekvenēto paraugu attīrīšana ar sefadeksu.**

#### **1. Uzbriedina Sefadeksu G50:**

a) dozē sefadeksu, izmantojot metāla trafaretu plati ar bedrītēm;

b) pārber dozēto sefadeksu pus caurlaidīgajā Millipore platē;

c) katrā plates bedrītē sefadeksam virsū uzlej 300µl auksta destilēta ūdens, tad plati liek ledusskapī pie +4°C uz 2-3 stundām (vai atstāj pa nakti), lai uzbriest sefadeks.

2. Plati ar uzbriedināto sefadeksu izņem no ledusskapja un liek virsū atkritumu savācēj platei, abas plates kopā centrifugē 10 min pie 1500 apgr./min (370x g). No atkritumu savācēj plates izlej ūdeni un liek atpakaļ.

3. Sefadeksam virsū katrā bedrītē uzlej 150 µl auksta destilēta ūdens un kopā ar atkritumu savācēj plati centrifugē 8 min pie 2000 apgr./min (657x g). Noņem atkritumu savācēj plati un tā vietā liek tīru MicroAmp plati.

4. Virsū sefadeksam, katras bedrītes centrā, uznes 10 µl parauga, kuru vajag attīrīt. Abas plates, sefadeksa un MicroAmp, abas kopā centrifugē 8 min pie 2500 apgr./min (1027x g).

5. Noņem apakšējo MicroAmp plati, kur tagad ir ietecējis 30 µl attīrīta parauga un liek žāvēties termociklerī pie +70°C uz 1 stundu un 30 min. Svarīgi ir atstāt vāku vaļā, lai viss ūdens varētu iztvaikot.

6. Klāt pie katra nu jau izžāvētām parauga nogulsnēm pievieno 11µl HiDi, platei virsū uzlīmē alumīnija foliju un kārtīgi vorteksē 1 min, īsi nocentrifugē un liek karsēties termociklerī 5 minūtes pie +95°C. Izņem plati un strauji atdzesē saldētavā pie -20°C, tur vismaz 10 min.

7. Attīrītos un apstrādātus paraugus liek uz ABI PRISM 3130xl sekvences nolasīšanai.

### **2.7.8. DNS sekvenču analīze**

Finch TV programmā tika pārbaudītas iegūto paraugu sekvences hromatogrammas kvalitāte un vajadzības gadījumā koriģēta. Tad ar BLAST programmas palīdzību paraugiem tika identificēta *Babesia* suga piederība. Visu pozitīvo paraugu sekvences kopā ar atlasītām sekvencēm no GenBank datubāzes tika savādītas MEGA6 programmā un tika veikta to filoģenētiska analīze.

### **2.7.9. Paraugu filoģenētiska analīze**

Filoģenētiska radniecība starp pozitīviem paraugiem un GenBank datu bāzē pieejamām sekvencēm tika veidota balstoties uz *Babesia* sp. 18S ribosomālā RNS gēna sekvenci. Filoģenētiska analīze tikai veikta izmantojot MEGA6 programmu (Tamura et al.

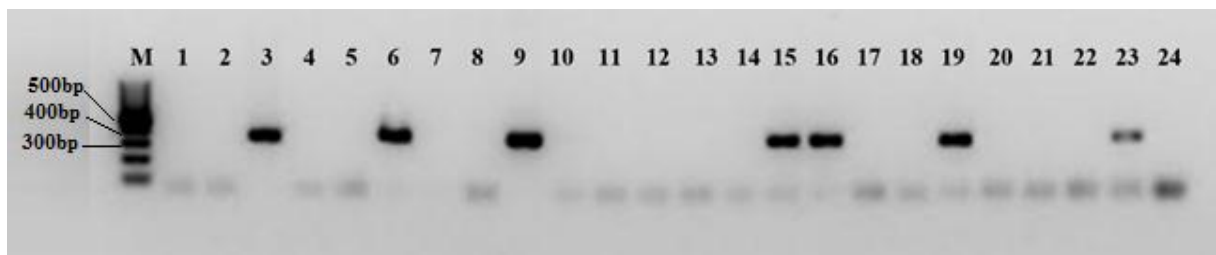
2013) par pamatu ņemot Neighbor-Joining metodi (Saitou and Nei 1987). Filoģenētiska koka ticamības pārbaudei tika veikts saknēšanas tests (bootstrap test) ar 500 atkārtojumiem, rezultāts ir norādīts procentos blakus zariem (attēlo vērtību, kas pārsniedz 50%), tas parāda cik procentu gadījumos no 500 filoģenētiska koka veidošanas atkārtojumiem analizējamie taksoni (sekvences) grupējas kopā uz viena zara (Felsenstein 1985). Evolūcijas attālumi tika aprēķināti, izmantojot Jukes-Cantor metodi (Jukes and Cantor 1969), un ir norādītas vienībās, kas atbilst nukleotīdu aizvietošanas skaitam vienā pozīcijā. Filoģenētiska koka zaru garumi atbilst to aprēķinātam evolūcijas attālumam. Konstruējot koku uz MEGA6 programmas, tika izvēlēti sekojošie papildus parametri: analīzē iekļāvā 1.+2.+3.+nekodējošo kodonu (Select Codon Positions = 1st+2nd+3rd+Noncoding); variabilitātes lielums starp pozīcijām tika modelētas pēc gamma sadalījuma (Rates among Sites = Gamma Distributed, shape parameter 1); visas pozīcijas ar cilpām un/vai nepilnīgiem datiem tika izdzēstas (Gaps/Missing Data Treatment = Complete deletion).

### 3. Rezultāti un diskusija

Bakalaura darbs tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju centrā laika posmā no 2016. gada aprīļa līdz 2017. gada maijam. Kopumā tika izanalizētas 632 ērces, kas tika noņemtas no suņiem 2011. un 2016. gadā veterinārajās klīnikās no dažādiem reģioniem Latvijā. Pēc morfoloģiskiem taksonu marķieriem (Hillyard 1996) tika noteikta ērcu ģints. No 2011. gada ievāktajām ērcēm, visas 243 piederēja *Ixodes* sp. ģintij, savukārt starp 2016. gadā ievāktām ērcēm 27 piederēja *Dermacentor* sp. un 362 - *Ixodes* sp. ģintij (7. un 8. tabula).

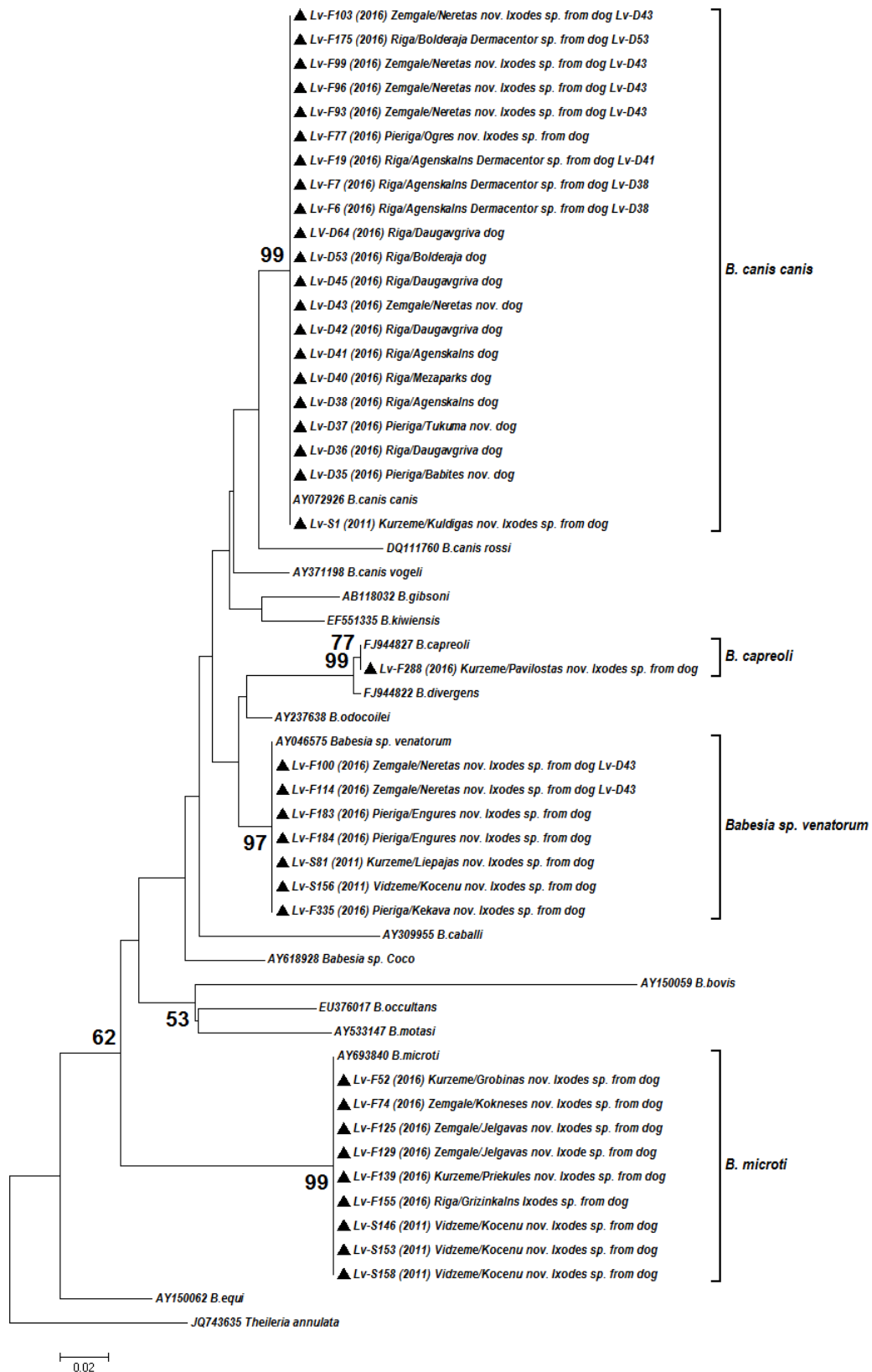
Tika izanalizēti arī 10 asins paraugi no klīniski slimiem suņiem ar babeziozes simptomātiku un 1 liesas paraugs no mirušā suņa, kam babezioze izpaudās ļoti smagā formā (ārstēšana nelīdzēja, suns tika eitanizēts).

No visiem paraugiem izdalīja DNS, veica uz *Babesia* sp. 18S rRNS gēna fragmenta klātbūtni mērķētu PCR reakciju, pozitīvus paraugus vizualizēja 1,5% agarozes gelā (4.attēls) un sekvenēja pēc Sangera metodes principa. Babēziju sugas piederība tika identificēta, izmantojot BLAST programmu, līdzīgas sekvences meklēšanai datu bāzē, un veicot filoģenētisko analīzi MEGA6 programmā (5. attēls).



4. attēls *Babesia* sp. detektēšana DNS paraugos ar PCR reakciju. 1,5% agarozes gels, 5µl etīdija bromīds. M celiņš - garuma marķieris Gene Ruler 100bp Ladder 5µl, 1.-22. celiņš - pārbaudāmie paraugi 5µl + 2µl uznešanas krāsviela 2x Loading Dye, 23. celiņš - pozitīvā kontrole + 2µl uznešanas krāsviela 2x Loading Dye, 24. celiņš-negatīvā kontrole.

Figure 4. Analysis of seminested PCR products by 1,5% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. From left to right the lanes contain the following: molecular weight marker Gene Ruler 100bp Ladder 5µl (lane M), questioning samples 5µl with 2µl 2x Loading Dye (lane 1-22), positive control 5µl with 2µl 2x Loading Dye (lane 23) and negative control 5µl with 2µl 2x Loading Dye (lane 24).



5.attēls. *Babesia* spp. filogēnētiskais koks. *Theileria annulata* ir izmantota kā ārējā grupa.

Melni trijstūri ir paraugu sekvenses, kas tika identificētas šajā darbā.

Figure 5. Phylogenetic tree of *Babesia* spp.. *Theileria annulata* was used as an outgroup.

Filled triangle is our sample sequences identified in the present study.

Analizējot rezultātus, noteikti ir jāņem vērā fakts, ka ērces tika noņemtas no suņiem, tās vairums gadījumos bija piesūkušās un barojās ar suņu asinīm. No publikāciju datiem, pēc veiktiem eksperimentiem, ir zināms, ka ērces var inficēt viena otru ar asins plūsmas starpniecību barojoties uz viena dzīvnieka (Homer et al. 2000). Ņemot vērā šo faktu, šajā darbā gūtos rezultātus, *Babesia* sp. prevalenci tieši ērcu paraugos, ir jāizvērtē ļoti kritiski un tā visdrīzāk ir nedaudz zemāka nekā tika noteikta.

No 2011. gadā ievāktajām ērcēm (7. tabula) 2,5% gadījumos (6/243) tika atklātas babēzijas. Rīgas un Pierīgas, Latgales un Zemgales reģionos ērcu paraugos babēzijas netika atklātas. Kurzemē tika atklātas divas babēziju sugas, viena ērce bija inficēta ar *B.canis canis*, bet otra ērce - ar *Babesia* sp. *venatorum*. Savukārt Vidzemē viena ērce bija inficēta ar *Babesia* sp. *venatorum* bet trīs - ar *B. microti*, turklāt visas šīs četras ērces tika noņemtas no viena suņa.

7.tabula.

*Babesia* sugu prevalence no suņiem ievāktās ērcēs 2011.gadā.

Table 7.

Prevalance of *Babesia* pathogens in tick samples collected from domestic dogs.

Reģions	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>Ixodes</i> sp.	Reģionā ievāktu ērcu skaits	<i>Babesia</i> sp.				Prevalence
				<i>B.canis canis</i>	<i>B. microti</i>	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>	<i>Babesia capreoli</i>	
Rīgas/Pierīgas	0	65	65					0
Kurzemes	0	25	25	1 (0,4%)		1 (0,4%)		2 (0,8%)
Zemgales	0	22	22					0
Vidzemes	0	115	115		3 (1,2%)	1 (0,4%)		4 (1,6%)
Latgales	0	16	16					0
Kopā:	0	243	243	1 (0,4%)	3 (1,2%)	2 (0,8%)		6 (2,5%)

No 2016.gadā ievāktajām ērcēm (8. tabula) 5,4% gadījumos (21/389) tika atklātas babēzijas. Vidzemes un Latgales reģionos ērcu paraugos babēzijas netika atklātas. Vidzemes un Latgales reģionos ērcu paraugos babēzijas netika atklātas. No visām identificētajām babēziju sugām 2016. gada ērcu paraugos visizplatītākā bija *B. canis canis* ar prevalenci 2,3% (9/389), kam sekoja *B. microti* – 1,5% (6/389), *Babesia* sp. *venatorum* – 1,3% (5/389) un visbeidzot *B. capreoli* – 0,3% (1/389). Rīgas/Pierīgas reģionā tika konstatētas visvairāk

*B.canis canis* patogēnu 1,3% (5/389), turklāt no tiem četri pozitīvie paraugi bija *Dermacentor* ģints ērces un tās bija no Rīgas un viens - *Ixodes* sp. ērce no Pierīgas. *B.canis canis* tika atklāts arī Zemgalē ar prevalenci 1% (4/389) un tikai *Ixodes* ērcēs. Visvairāk ar *B. microti* inficēto ērcu paraugu atklāja Zemgales reģionā ar prevalenci 0,8% (3/389), kam sekoja Kurzemes reģions – 0,5% (2/389) un visbeidzot Rīgas/Pierīgas reģions – 0,3% (1/389), turklāt visas pozitīvas ērces piederēja *Ixodes* sp. ģintij. Ar *Babesia* sp. venatorum inficētas ērces, visas *Ixodes* sp., tika atklātas tikai Rīgas/Pierīgas un Zemgales reģionos ar prevalenci 0,8% (3/389) un 0,5% (2/389) attiecīgi. *B. capreoli* tika konstatēta tikai vienā *Ixodes* sp. ērcē un tikai no Kurzemes reģiona (8. tabula).

8.tabula.

*Babesia* sugu prevalence no suņiem ievāktās ērcēs Latvijā 2016.gadā.

Table 8.

Prevalence of *Babesia* pathogens in tick samples collected from domestic dogs in Latvia in 2016.

Reģions	<i>Dermacentor</i> sp	<i>Ixodes</i> sp.	Reģionā ievāktu ērcu skaits	<i>Babesia</i> sp.				Prevalence
				<i>B.canis canis</i>	<i>B. microti</i>	<i>Babesia</i> sp. venatorum	<i>Babesia capreoli</i>	
Rīgas/Pierīgas	11	172	183	5 (1,3%)	1 (0,3%)	3 (0,8%)		9 (2,3%)
Kurzemes	1	116	117		2 (0,5%)		1 (0,3%)	3 (0,8%)
Zemgales	3	45	48	4 (1%)	3 (0,8%)	2 (0,5%)		9 (2,3%)
Vidzemes	0	20	20					0
Latgales	12	9	21					0
Kopā:	27 (6,9%)	362 (93,1%)	389	9 (2,3%)	6 (1,5%)	5 (1,3%)	1 (0,3%)	21 (5,4%)

Visos 2016. gadā saņemtajos klīniskajos suņu paraugos, 10 asins un 1 liesas paraugā, molekulāri tika apstiprināta *B. canis canis* infekcija. Lielākais *B. canis canis*-inficēto suņu skaits bija tieši no pašas Rīgas 73% (8/11) un Pierīgas reģiona 18% (2/11). Viens gadījums tika identificētas arī Zemgales reģionā Neretas novadā (9. tabula).

9. tabula.

*Babesia canis canis* pozitīvie suņi Latvijā 2016.gadā

Table 9.

*Babesia canis canis* dogs in 2016.

<b>Rēģions</b>	<b>Novads/ Mikrorajons</b>	<b><i>B.canis canis</i></b>	<b>Prevalence</b>
Rīgas	Mežaparks	1	8 (73 %)
	Āgenskalns	2	
	Bolderāja	1	
	Daugavgrīva	4	
Pierīgas	Babītes	1	2 (18%)
	Tukuma	1	
Zemgales	Neretas	1	1 (9%)
Kopā :		11	11 (100%)

Visi 2011.un 2016. gada pozitīvie paraugi ar izcelsmes vietu un avotu un tajos identificētam *Babesia* sugām ir apkopotas 10. tabulā.

10. tabula.

*Babesia* sp. pozitīvie suņu paraugi, ērces un asins, Latvijā 2011. un 2016. gadā.

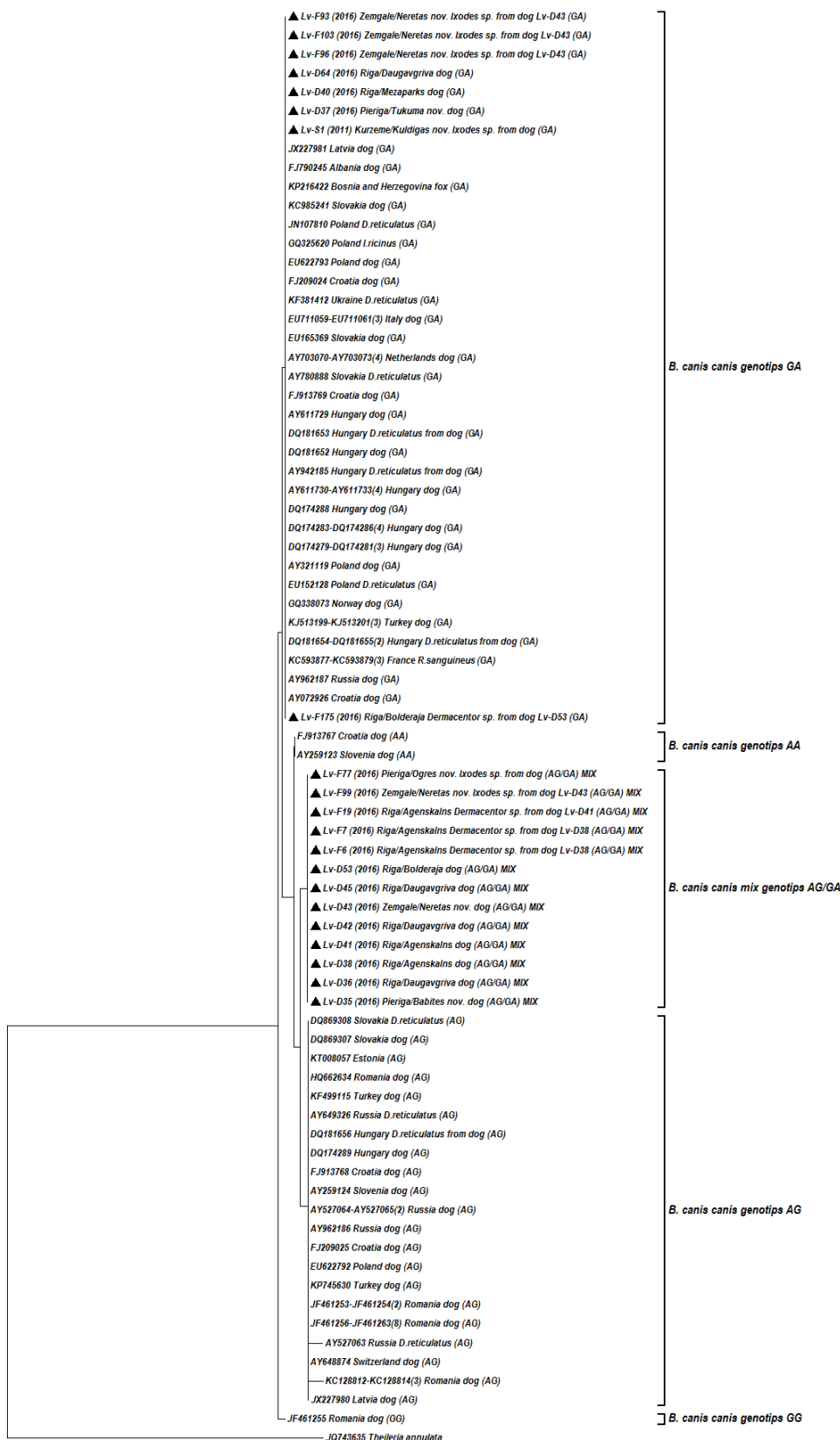
Table 10.

*Babesia* sp. positive samples of ticks and blood collected from dogs in Latvia in 2011 and 2016.

Gads	Reģions	Novads/ Mikrorajons	Suns Nr.	Parauga veids (skaits)	Pozitīvā parauga DNS Nr.	Pozitīvās ģints ērces	Noteikta <i>Babesia</i> sp.
2011.	Kurzeme	Kuldīgas	1	Ērces (9)	Lv-S1	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
		Liepājas	2	Ērces (2)	Lv-S81	<i>Ixodes</i> sp.	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>
	Vidzeme	Kocēnu	3	Ērces (48)	Lv-S146	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.microti</i>
					Lv-S153	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.microti</i>
					Lv-S156	<i>Ixodes</i> sp.	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>
Lv-S158	<i>Ixodes</i> sp.				<i>B.microti</i>		
2016.	Rīga	Daugavgrīva	4	Liesas gab.	Lv-D36		<i>B.canis canis</i>
		Āgenskalns	5	Asinis	Lv-D38		<i>B.canis canis</i>
				Ērces (2)	Lv-F6	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
					Lv-F7	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
		Mežaparks	6	Asinis	Lv-D40		<i>B.canis canis</i>
		Āgenskalns	7	Asinis	Lv-D41		<i>B.canis canis</i>
				Ērces (1)	Lv-F19	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
		Daugavgrīva	8	Asinis	Lv-D42		<i>B.canis canis</i>
		Daugavgrīva	9	Asinis	Lv-D45		<i>B.canis canis</i>
		Grīziņkalns	10	Ērces (1)	Lv-F155	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.microti</i>
	Bolderājā	11	Asinis	Lv-D53		<i>B.canis canis</i>	
			Ērces (1)	Lv-F175	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>B.canis canis</i>	
	Daugavgrīva	12	Asinis	Lv-D64		<i>B. canis canis</i>	
	Pierīga	Babītes	13	Asinis	Lv-D35		<i>B.canis canis</i>
		Ķekavas	14	Ērces (2)	Lv-F335	<i>Ixodes</i> sp.	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>
		Tukuma	15	Asinis	Lv-D37		<i>B.canis canis</i>
		Ogres	16	Ērces (2)	Lv-F77	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
		Engures	17	Ērces (5)	Lv-F183	<i>Ixodes</i> sp.	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>
	Lv-F184				<i>Ixodes</i> sp.	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>	
	Kurzeme	Grobiņas	18	Ērces (10)	Lv-F52	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.microti</i>
		Priekules	19	Ērces (4)	Lv-F139	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.microti</i>
		Pāvilostas	20	Ērces (42)	Lv-F288	<i>Ixodes</i> sp.	<i>Babesia capreoli</i>
	Zemgale	Kokneses		21	Ērces (2)	Lv-F74	<i>Ixodes</i> sp.
Asinis					Lv-D43		<i>B.canis canis</i>
Neretas			22	Ērces (25)	Lv-F93	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
					Lv-F96	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
					Lv-F99	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
					Lv-F100	<i>Ixodes</i> sp.	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>
					Lv-F103	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.canis canis</i>
					Lv-F114	<i>Ixodes</i> sp.	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>
Jelgavas			23	Ērces (6)	Lv-F125	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.microti</i>
					Lv-F129	<i>Ixodes</i> sp.	<i>B.microti</i>

Šajā darbā visiem 11 analizētiem suņu babeziozes klīniskiem gadījumiem bija lokāla izcelsme, pirms saslimšanas, vismaz vienu mēnesi iepriekš, suņi nav izceļojuši ārpus Latvijas, kā arī anamnēzē tika fiksēta ērces piesūkšanās. Apkopojot savus datus par molekulāri apstiprinātiem suņu babeziozes gadījumiem 2016. gadā un I. Bērziņas publicētus datus par 2011. gadu, kad tika fiksēti un apstiprināti tikai divi lokālas izcelsmes saslimšanas gadījumi, var secināt, ka piecu gadu periodā Latvijā suņu saslimstība ar babeziozi ir pieaugusi (Berzina et al. 2013). Turklāt 2011. un 2016. gadā kā vienīgais suņu babeziozes etioloģijas aģents tika identificēts *B. canis canis*. Suņu babeziozes saslimšanas pieaugumā ir vainojama *Dermacentor* sp. izplatīšanos Latvijā. Par to liecina ērcu morfoloģiskie un molekulārie izpētes rezultāti, kas iegūti šajā darbā. No 243 ērcēm, kas bija ievāktas no suņiem 2011. gadā, nebija nevienas *Dermacentor* sp. ērces, pat no Rīgas un Pierīgas reģiona, visas piederēja *Ixodes* sp. ģints ērcēm, kur tikai viena ērce bija pozitīva uz *B. canis canis*. Savukārt starp 389 ērcēm, kur 362 bija *Ixodes* sp. un jau 27 *Dermacentor* sp. ģints ērces, uz *B. canis canis* bija pozitīvas tikai 1,4% (5/362) *Ixodes* sp. un gandrīz 15% (4/27) *Dermacentor* sp. ērces, kam bija statistiski ticama atšķirība ( $p = 0,0018$ ; pie  $\alpha \leq 0,05$ ;  $p$  vērtība aprēķināta izmantojot Fišera precizitātes testu). Jāpiebilst, ka šajā darbā pārbaudītās *Dermacentor* sp. ērcēs no visām iespējamām babēziju sugām tika identificēta tikai un vienīgi *B. canis canis*. Pēc publikāciju datiem, tieši *Dermacentor reticulatus* ērces tiek uzskatīta par galveno *B. canis canis* pārnēsēju un izplatītāju Eiropā, līdz ar to varētu secināt, ka šajā darbā morfoloģiski noteiktas *Dermacentor* sp. ērces varētu piederēt tieši *D. reticulatus* sugai, taču pilnīgi droši to var apstiprināt tikai ar molekulārām metodēm, analizējot ērces DNS materiālu. Līdz šim no Latvijas biotopiem ievāktajās *Ixodes* sp. ērcēs *B. canis canis* netika atklāts (Capligina et al. 2016), savukārt šajā darbā skaidri var redzēt, ka Latvijā notiek *B. canis canis* patogēna pārnese no *Dermacentor* sp. uz *Ixodes* sp. ērcēm, jo 2011. gadā tā bija tikai viena *Ixodes* sp. pozitīva ērce, bet 2016. gadā tās jau ir piecas pozitīvas *Ixodes* sp. ērces. Tā kā *Ixodes* sp. ērces Latvijā ir vizizplatītākās un epidemioloģiski svarīgākās ērces, tad tuvā nākotnē varētu sagaidīt babeziozes saslimšanas pieaugumu suņu un citu dzīvnieku starpā, nav izslēgti arī cilvēku saslimšanas gadījumi.

Pēc filoģenētiskas analīzes rezultātiem, kur tika salīdzinātas mūsu *B. canis canis* sekvences ar GenBank datu bāzē pieejamām, kas tika iegūtas tieši no pozitīviem suņiem un ērcēm, var secināt, ka Latvijā cirkulē tie paši Eiropā biežāk sastopamie *B. canis canis* genotipi AG un GA, kas atbilst 610. un 611. nukleotīdu pozīcijai (Beck et al. 2009; Ionita et al. 2012). Pie tam, no mūsu 21 pozitīviem paraugiem, astoņiem bija GA genotips, bet 13 paraugiem - AG/GA genotipu maisījums (6. attēls). Sunim Nr. 4, kurš tika eitanizēts, dēļ smagas babeziozes izpausmes, tika identificēts tieši tāds *B. canis canis* AG/GA genotipu maisījums.



6. attēls. *B. canis canis* filogenētiskais koks. *Theileria annulata* ir izmantota kā ārējā grupa.

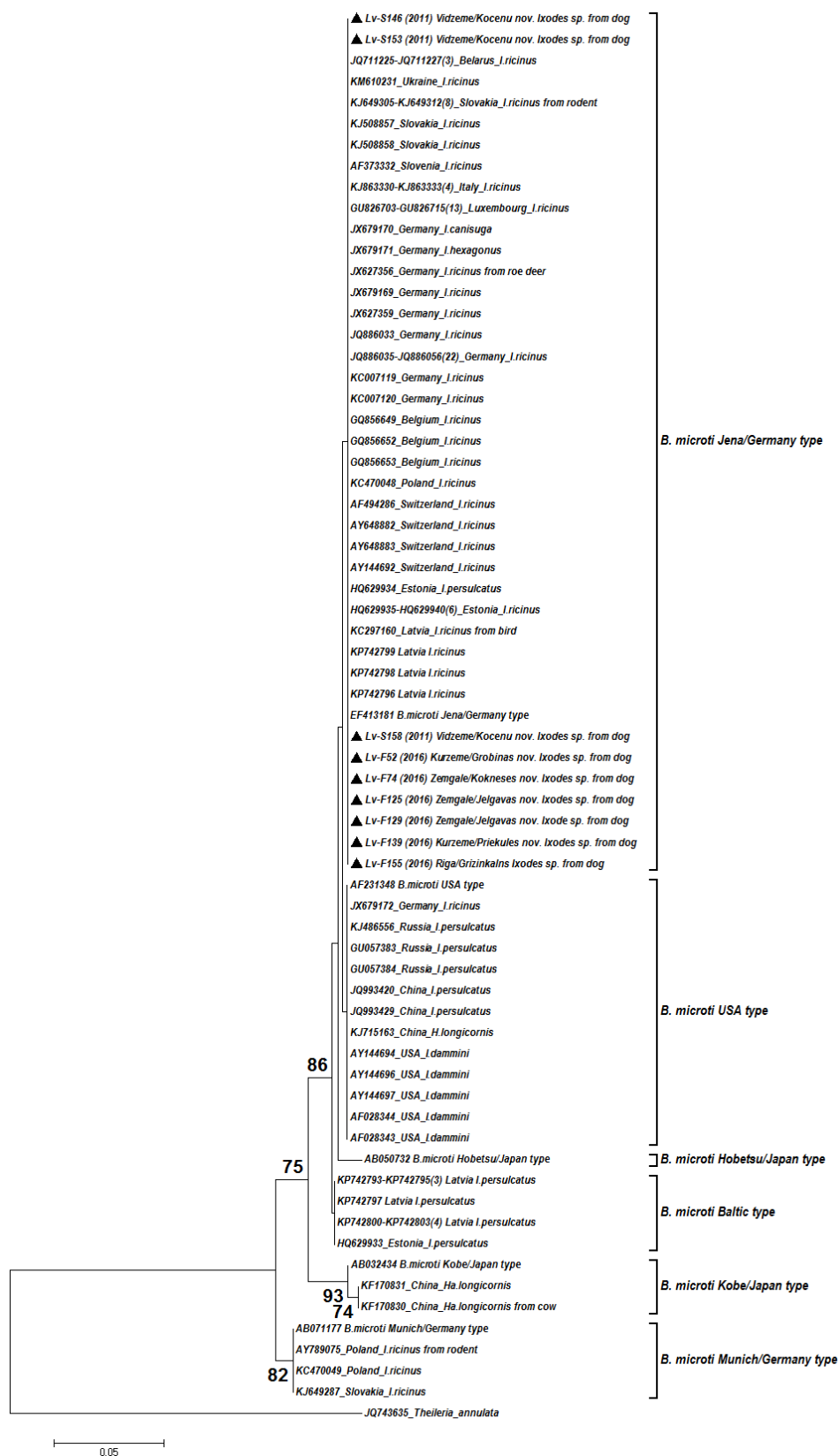
Melni trijstūri ir paraugu sekvenses, kas tika identificētas šajā darbā.

Figure 6. Phylogenetic tree of *B. canis canis*. *Theileria annulata* was used as an outgroup.

Filled triangle is our sample sequences identified in the present study.

Salīdzinot kopējo *Babesia* sp. infekcijas prevalenci ērcu paraugos starp 2011. un 2016. gadam, tad ir vērojama pieauguma tendence, no 2,5% uz 5,4% attiecīgi, lai gan pēc Fišera precizitātes testa tā nav statistiski ticama atšķirība ( $p = 0,1044$ ; pie  $\alpha \leq 0,05$ ,  $p$  vērtība aprēķināta izmantojot Fišera precizitātes testu). Piecu gadu periodā krasi pieauga tieši *B. canis canis* pozitīvo ērcu prevalence no 0,4% (2011. g.) uz 2,3% (2016. g.), lai gan šķiet krasi izmaiņa, tā nav gluži statistiski ticama atšķirība ( $p = 0,0980$ ; pie  $\alpha \leq 0,05$ ,  $p$  vērtība aprēķināta izmantojot Fišera precizitātes testu). Pārējām babēziju sugām kaut arī neliels arī ir vērojams prevalences pieaugums starp 2011. un 2016. gadiem, attiecīgi tas ir: *B. microti* no 1,2% uz 1,5% ( $p = 1,000$ ; pie  $\alpha \leq 0,05$  – nav statistiski ticama atšķirība,  $p$  vērtība aprēķināta izmantojot Fišera precizitātes testu), *Babesia* sp. *venatorum* no 0,8% uz 1,3% ( $p = 0,7129$ ; pie  $\alpha \leq 0,05$ , nav statistiski ticama atšķirība,  $p$  vērtība aprēķināta izmantojot Fišera precizitātes testu) un *B. capreoli* no 0% uz 0,3%. ( $p = 1,000$ ; pie  $\alpha \leq 0,05$ , nav statistiski ticama atšķirība,  $p$  vērtība aprēķināta izmantojot Fišera precizitātes testu). Iepriekšējos pētījumos, ko veica Čapligina ar līdzautoriem, analizējot *Babesia* sugu daudzveidību un prevalenci Latvijā *Ixodes* sp. ērcēs, kas bija ievāktas no Latvijas biotopiem laika posmā no 2005. – 2007. gadam, arī tika identificētas *B. microti*, ar prevalenci 1%, *Babesia* sp. *venatorum*, ar prevalenci 0,5%, un *B. capreoli*, ar prevalenci 0,2% (Čapligina et al. 2016), kas liecina, ka šīs babēziju sugas nav jaunas priekš Latvijas un to sastopamības biežums pa šiem gadiem ir saglabājusies līdzīgā līmenī.

Pēc filoģenētiskas analīzes rezultātiem, kur tika salīdzinātas visas mūsu 2011. un 2016. gada pozitīvo paraugu *B. microti* 18S ribosomālā RNS gēna fragmenta sekvences ar GenBank datu bāzē pieejamām, kas tika iegūtas tieši no ērcēm, var secināt, ka visi mūsu 9 paraugi pieder *B. microti* Jena/Germany tipam, kas ir visizplatītākais Eiropā un kurš tika identificēts iepriekšējos pētījumos arī Latvijā (7. attēls) (Čapligina et al. 2016). Līdzīgā veidā veicot filoģenētisko analīzi *Babesia* sp. *venatorum* paraugiem, varēja konstatēt, ka tie ne ar ko neatšķiras no pārējiem datu bāzē pieejamiem paraugiem. *Babesia* sp. *venatorum* celmi no Latvijas, Eiropas, Krievijas austrumdaļas, Ķīnas un Japānas, grupējas uz viena zara (8. attēls). Tas liecina, ka *Babesia* sp. *venatorum* ir pavisam jauna babēziju suga, kuras sekvenču vēl nav diverģējusies pēc to ģeogrāfiskas izcelsmes vietas. Šajā gadījumā *Babesia* sp. *venatorum* filoģenētiskai analīzei vajadzētu izvēlēties citu gēnu, piemēram, beta tubulīna gēna sekveni, jo 18S ribosomālā RNS gēns ir dzīvībai svarīgs tā dēvētais “housekeeping” gēns, kurš tiek ļoti sargāts no mutāciju ietekmes, tādēļ tā sekvenču ir ļoti konservatīva un nukleoīdu polimorfismi tajā krājas ļoti lēni.



7. attēls. *B. microti* filoģenētiskais koks. *Theileria annulata* ir izmantota kā ārējā grupa. Melni trijstūri ir paraugu sekvenses, kas tika identificētas šajā darbā.

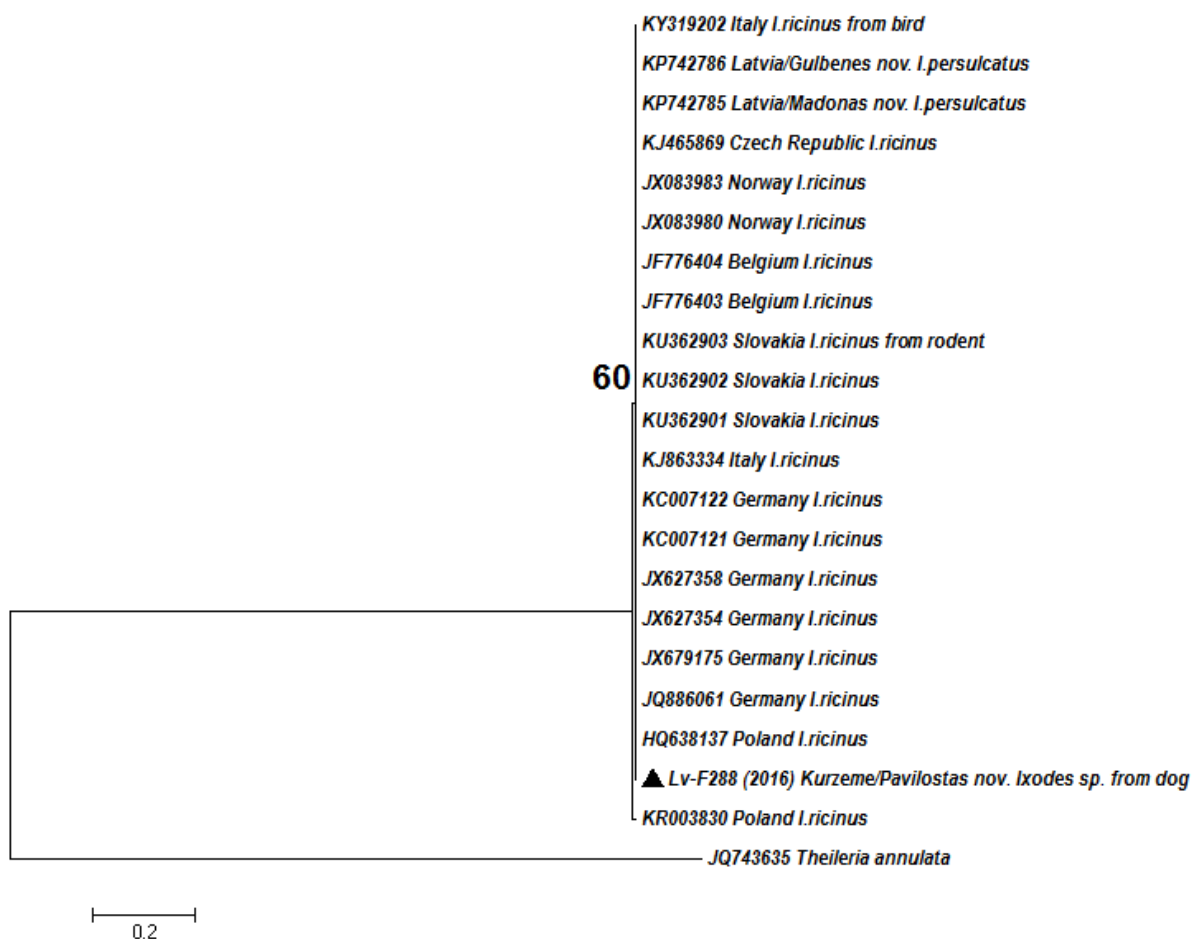
Figure 7. Phylogenetic tree of *B. microti*. *Theileria annulata* was used as an outgroup. Filled triangle is our sample sequences identified in the present study.



8. attēls. *Babesia* sp. *venatorum* filoģenētiskais koks. *Theileria annulata* ir izmantota kā ārējā grupa. Melni trijstūri ir paraugu sekvenses, kas tika identificētas šajā darbā.

Figure 8. Phylogenetic tree of *Babesia* sp. *venatorum*. *Theileria annulata* was used as an outgroup. Filled triangle is our sample sequences identified in the present study.

Visbeidzot, salīdzinot mūsu *B. capreoli* sekvenci ar datu bāzē pieejamām sekvencēm, kas tika izolētas no ērcēm, var secināt, ka mūsu paraugs ir radniecīgs gan ar Latvijas celmiem, kas tika atklātas iepriekšējos pētījumos biotopu ērcēs, gan arī citiem Eiropā identificētiem celmiem (9. attēls) (Capligina et al. 2016). Šī filoģenētiskā analīze parāda arī to, ka *B. capreoli* izplatības areāls aprobežojas ar Eiropu, jo tā tika identificēta tikai ērcēs, kas ievāktas no Eiropas biotopiem. Latvijā vistīcamāk, *B. capreoli* ir izplatījies ar gājputnu starpniecību caur eksportētām inficētām ērcēm, kas bija uz tām piesūkušās, par to netīšam liecina fakts, ka radniecīgas *B. capreoli* sekvences tika identificētas starp attāliem Latvijas reģioniem, iepriekšējos pētījumos *Ixodes persulcatus* ērcēs no Madonas un Gulbenes (Capligina et al. 2016), un, mūsu *Ixodes* sp. ērcē no Pāvilostas. Jāpiemin arī to, ka Pāvilosta ģeogrāfiski ir ļoti tuvu Latvijas Papes nacionālajam rezervātam, kas Eiropā līmenī ir viena no lielākajām gājputnu atpūtas vietām migrācijas laikā.



9. attēls. *B. capreoli* filoģenētiskais koks. *Theileria annulata* ir izmantota kā ārējā grupa.

Melni trijstūri ir paraugu sekvences, kas tika identificētas šajā darbā.

Figure 9. Phylogenetic tree of *B. capreoli*. *Theileria annulata* was used as an outgroup. Filled triangle is our sample sequences identified in the present study.

## 4. Secinājumi

1. Lai arī iepriekš aprakstīts, ka Latvijā ir divas epidemioloģiski nozīmīgas *Ixodidae* ērcu sugas (Bormane 2007), kuras abas pieder *Ixodes* ģintij, *Dermacentor* ģints ērces ir nozīmīgs babēziju pārnēsātājs Latvijā.

2. *Babesia* sp. prevalence ērcēs tika noteikta ar divpakāpju PCR metodi, pavairojot *Babesia* sp. 18S rRNS gēnu un pozitīvos paraugus sekvenējot, lai noteiktu sugas piederību. 2011. gadā ievāktajās ērcēs no 243 pārbaudītajiem paraugiem babēzijas konstatēja sešās ērcēs, bet no 2016. gada ievāktajām 389 ērcēm – 21. Salīdzinot kopējo *Babesia* sp. infekcijas prevalenci ērcu paraugos starp 2011. un 2016. gadam, ir vērojama pieauguma tendence, attiecīgi no 2,5 līdz 5,4 %.

3. Latvijā cirkulē tie paši Eiropā biežāk sastopamie *B. canis canis* genotipi AG un GA, kas atbilst 610. un 611. nukleoīdu pozīcijai.

4. Iespējams, ka Latvijā notiek *B. canis canis* patogēna pārnese no *Dermacentor* sp. uz *Ixodes* sp. ērcēm, 2011. gadā tā bija tikai viena *Ixodes* sp. pozitīva ērce, bet 2016. gadā tās jau ir piecas pozitīvas *Ixodes* sp. ērces, tomēr nepieciešami turpmāki pētījumi.

## 5. Pateicības

Paldies:

darba vadītājai Maģ. biol. Valenīnai Čapliņai par bakalaura darba vadīšanu un ieguldījumu tā tapšanā, kā arī zināšanu un padomu sniegšanā,

Latvijas Biomedicīnas studiju un pētījumu centra molekulārās mikrobioloģijas laboratorijas grupas vadītājai Dr.biol. Renātei Rankai, par iespēju izstrādāt darbu, atbalstu un padomiem,

Latvijas Biomedicīnas studiju un pētījuma centra kolēģiem par atbalstu darba procesā.

sadarbības partneriem - veterinārārstiem, īpaši L.Dindonei un I.Bērziņai par kolēģu apzināšanu un paraugu ievākšanu.

Daļa bakalaura darba izstrādāta ES finansētā projekta 1.1.1.1/16/A/044 “Babezioze Latvijā: epidemioloģiskie un diagnostiskie pētījumi riska novērtēšanai” laikā.

## 6. Literatūras saraksts

Azmi K., Erequat S., Nasereddin A., Al-Jawabreh A., Baneth G., Abdeen Z. 2016. Molecular detection of *Theileria*, *Babesia*, and *Hepatozon spp.* in ixodid ticks from Palestine. – *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7: 734-741.

Beck R., Vojta L., Mrljak V., Marinculić A., Beck A., Zivcicjak T., Caccit S.M. 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. - *International Journal of Parasitology*, 39: 843–8.

Berzina I., Capligina V., Baumanis V., Ranka R., Cirule D., Matisē I. 2013. Autochthonous canine babesiosis caused by *Babesia canis canis* in Latvia. - *Veterinary Parasitology*, 196: 515-518.

Bērziņa I. 2013. Ērču pārnēsētās slimības Latvijā: anaplazmoze, borelioze, babezioze. Promocijas darba Kopsavilkums. Jelgava, Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, 91 lpp.

Birkenheuer A.J., Levy M.G., Breitschwerdt E.B. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. – *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (9): 4172-4177.

Blaschitz M., Nardoslavsky-Gfoller M., Kanzler M., Stanek G., Walochnik J. 2008. *Babesia* Species Occuring in Austrian *Ixodes ricinus* Ticks. – *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15), 4841-4846.

Bormane A. 2007. *Ixodes ricinus* L. un *Ixodes persulcatus* R,Sch. (Acari: *Ixodidae*) izplatība, to pārnēsēto infekcijas slimību nozīme un molekulārā epidemioloģija Latvijā. Promocijas darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 82 lpp.

Capligina V., Salmane I., Keišs O., Vilks K., Japina K., Baumanis V. 2014. Prevalence of tick-borne pathogens in ticks collected from migratory birds in Latvia. - *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5: 75-81.

Capligina V., Berzina I., Bormane A., Salmane I., Vilks K., Kazarina A., Bandere D., Baumanis V., Ranka R. 2016. Prevalence and phylogenetic analysis of *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks in Latvia. - *Experimental and Applied Acarology*, 68 (3): 325-336.

Chao L.L., Liao H.T., Ho T.Y., Shih C.M. 2017. First detection and molecular identification of *Babesia gibsoni* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks - *Acta Tropica*, 166: 356-362.

Chauvin A., Moreau E., Bonnet S., Plantard O., Malandrin L. 2009. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. - *Veterinary Research*, 40 (2) : 37-55.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. - *Evolution*, 39:783-791.

Földvári G., Šíroký P., Szekeres S., Majoros G., Sprong H. 2016. *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. – *Parasites & Vectors*, 9 (1): 314-343.

Herwaldt B.L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S.B., Piccaluga P., Martinelli G., Edelhofer R., Hollenstein U., Poletti G., Pampiglione S., Löschenberger K., Tura S., Pieniazek N.J. 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. – *Emerging Infectious Diseases*, 9 (8): 942-948.

Hillyard P.D. 1996. *Ticks of North-West Europe*. London: The Natural History Museum, 178 pp.

Homer M. J., Aguilar-Delfin I., Telford III S. R., Krause P. J., Persing D. H. 2000. Babesiosis. - *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (3): 451-469.

Ionita M., Mitrea I.L., Pfister K., Hamel D., Buzatu C.M., Silaghi C. 2012. Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: a molecular approach. - *Parasitology Research*, 110: 1659–64.

Irwin P. J. 2009. Canine Babesiosis: from molecular taxonomy to control. – *Parasites & Vectors*, 2 (1): 4-13.

Jukes T.H. and Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press, 21-132.

Krause P. J., Gewurz B. E., Hill D., Marty F. M., Vannier E., Foppa I. M., Furman R.R., Neuhaus E., Skowron G., Gupta S., McCalla C., Pesanti E.L., Young M., Heiman D., Hsue G., Gelfand J.A., Wormser G.P., Dickason J., Bia F.J., Hartman B., Telford III S.R., Christianson D., Dardick K., Coleman M., Girotto J.E., Spielman A. 2008. Persistent and Relapsing Babesiosis in Immunocompromised Patients.- *Clinical Infectious Diseases*, 46: 370-376.

Matijatko V., Torti M., Schetters T.P. 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? - *Trends in Parasitology*, 28 (3): 99-105.

Mierzejewska E.J., Pawelczyk A., Radkowski M., Welc-Falęciak R., Bajer A. 2015. Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. - *Parasites & Vectors*, 8: 490-506.

Mullen G.R., Durden L.A. 2009. Medical and Veterinary Entomology. Second Edition. San Diego: Academic Press, 637 pp.

Paulauskas A., Radzijeuskaja J., Karvelienė B., Grigonis A., Aleksandravičienė A., Zamokas G., Babickaitė L., Sabūnas V., Petkevičius S. 2014. Detection and molecular characterization of canine babesiosis causative agent *Babesia canis* in the naturally infected dog in Lithuania. - *Veterinary Parasitology*, 205 (3-4): 702-706.

Paulauskas A., Radzijeuskaja J., Mardosaitė-Busaitienė D., Aleksandravičienė A., Galdikas M., Krikštolaitis R. 2015. New localities of *Dermacentor reticulatus* ticks in the Baltic countries. - *Ticks Tick-Borne Diseases*, 6 (5): 630-635.

Pavulina, A. 2011. Molekulārā *Babesia* sp. detektēšana *Ixodes ricinus* un *Ixodes persulcatus* ērcu nimfu paraugos. Kurša darbs. Rīga, Latvijas Universitāte 30lpp

Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. - *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.

Tiškina V., Capligina V., Must K., Berzina I., Ranka R. Jokelainen P. 2016. Fatal *Babesia canis canis* infection in a splenectomized Estonian dog. - *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58: 7-13.

Uilenberg G., Franssen F.F.J., Perie N.M., Spanjer A.A.M. 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. - *Veterinary Quarterly* 11 (1): 33-40.

Uilenberg G. 2006. Babesia - A historical overview. - *Veterinary Parasitology*, 138 : 3-10.

Vannier E., Gewurz B.E., Krause P.J. 2008. Human Babesiosis. – *Infectious Disease Clinics of North America*, 22 (3): 469-488.

Vannier E., Krause P. J. 2009. Update on Babesiosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, Hondawi Publishing Corporation, 9 pp.

Zintl A., Mulcany G., Skerret H. E., Taylor S. M., Gray J. S. 2003. *Babesia divergens*, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. - *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (4): 622-636.

Zygner W., Baska P., Wisniewski M., Wedrychowicz H. 2010. The Molecular Evidence of *Babesia microti* in Hard Ticks Removed from Dogs in Warsaw (central Poland). - *Polish Journal of Microbiology*, 59 (2): 95-97.