



VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS

GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

BIOLOGIJOS KATEDRA

Gabija Griciūtė

**BARTONELLA SPP. IDENTIFIKAVIMAS UTĖLĖSE
PANAUDOJANT *RPOB* IR ITS REGIONO ANALIZĘ**

Bakalauro baigiamasis darbas

Biotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 612J70002
Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovė: prof. dr. Jana Radzijeuskaja _____
(Parašas) (Data)

Apginta: prof. dr. Saulius Mickevičius _____
(Fakulteto/studijų instituto dekanas/direktorius) (Parašas) (Data)

Kaunas, 2020

Darbas atliktas: 2019 – 2020 m. Vytauto Didžiojo Universitete, Biologijos katedroje

Recenzentė: Evelina Kaminskienė

Darbas ginamas: nuotoliniame bakalauro darbų gynimo komisijos posėdyje 2020 metų birželio 18 dieną Vytauto Didžiojo Universitete, Biologijos katedroje.

Adresas: Universiteto g. 10, Akademija 53361

Darbo vykdytojas: Gabija Griciūtė

(Parašas)

Mokslinis vadovas: prof. dr. Jana Radzijeuskaja

(Parašas)

Katedra, atsakinga už bakalauro darbo parengimą: Biologijos katedra

Biologijos katedra, vedėjas: prof. dr. (HP) Algimantas Paulauskas

(Parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	4
SUMMARY	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. <i>Bartonella</i> spp. taksonomija	7
1.2. <i>Bartonella</i> bakterijų biologija	7
1.3. <i>Bartonella</i> rūšys	8
1.4. <i>Bartonella</i> pernešėjai ir šeimininkai	8
1.5. <i>Bartonella</i> sukeltos ligos	11
2. MEDŽIAGA IR METODIKA	15
2.1. Tyrimo medžiaga	15
2.2. DNR išskyrimas iš utėlių	16
2.3. <i>Bartonella</i> spp. nustatymo molekuliniai tyrimo metodai	17
2.3.1. <i>Bartonella</i> spp. <i>rpoB</i> geno fragmento gausinimas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu	17
2.3.2. <i>Bartonella</i> spp. ITS regiono amplifikacija lizdinės polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu	18
2.4. Amplifikuotų DNR fragmentų vizualizacija elektroforezės metodu	21
2.5. Amplifikuotų DNR fragmentų paruošimas sekvenavimui	22
2.6. DNR sekų analizė	23
2.7. Filogenetinio medžio sudarymas	23
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	25
3.1. <i>Bartonella rpoB</i> geno fragmento analizė	25
3.2. <i>Bartonella</i> ITS regiono analizė	27
3.3. <i>Bartonella</i> rūšių paplitimas utėlėse	30
IŠVADOS	32
LITEARTŪRA	33

SANTRAUKA

Baigiamojo darbo autorius:	Gabija Griciūtė
Pilnas baigiamojo darbo pavadinimas:	<i>Bartonella</i> spp. identifikavimas utėlėse panaudojant <i>rpoB</i> ir ITS regiono sekų analizę
Baigiamojo darbo vadovė:	Prof. dr. Jana Radzijeuskaja
Baigiamojo darbo atlikimo vieta ir metai:	Vytauto Didžiojo universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Kaunas, 2020
Puslapių skaičius:	41
Lentelių skaičius:	16
Paveikslų skaičius:	9
Priedų skaičius:	0

Tyrimai atliekami su *Bartonella* bakterijomis yra svarbūs dėl šių patogenų paplitimo tarp graužikų ir kitų laukinių bei naminių gyvūnų ir jų ektoparazitų. *Bartonella* bakterijos gali sukelti įvairaus sunkumo ligas žmonėms, o komplikacijos gali išlikti visą gyvenimą. *Bartonella* patogenų identifikacija taip pat svarbi ištirti naujas rūšis bei jų plitimą anksčiau neužkrėstuose regionuose ar žemynuose. Šio darbo tikslas yra identifikuoti *Bartonella* bakterijų rūšis utėlėse, surinktose nuo smulkiųjų graužikų Slovakijoje, naudojantis molekuliniais tyrimo metodais. Rūšių identifikavime buvo tirtos 5 utėlių rūšys: *Huebneria affinis*, *Pyroteuthis serrata*, *Polyplax spinulosa*, *Hoplopleura* sp., *Hoplopleura acanthopus*, surinktos iš *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Microtus arvalis* ir *Myodes glareolus* graužikų. *Bartonella* rūšių identifikavimui buvo gausinami *rpoB* geno ir ITS regiono sekų fragmentai atliekant PGR. Amplifikuoti *rpoB* geno ir ITS regiono PGR produktai buvo išvalomi ir sekvenuojami. Gautos sekos buvo analizuojamos naudojant *Mega X* programą. Atliekant *rpoB* geno ir ITS regiono sekų analizę nustatytos 3 *Bartonella* rūšys: *Bartonella cooperplainsensis*, *Bartonella tribocorum* ir *Bartonella taylorii*. Užsikrėtimas *B. cooperplainsensis* nustatytas 7 *H. affinis* utėlių mėginiuose, *B. taylorii* nustatyta 1 *H. affinis* mėginyje ir *B. tribocorum* identifiukuota 2 *H. affinis* bei 1 *P. serrata* mėginyje.

SUMMARY

Author of diploma paper:	Gabija Griciūtė
Full title of diploma paper:	<i>Bartonella</i> spp. identification in louse by using <i>rpoB</i> and ITS regions sequence analysis
Diploma paper advisor:	Prof. dr. Jana Radzijeuskaja
Presented at:	Vytautas Magnus university, Faculty of Natural Sciences, Kaunas, 2020
Number of pages:	41
Number of tables:	16
Number of pictures:	9
Number of appendixes:	0

Studies done with *Bartonella* bacteria are important as these pathogens are very common between domestic and wild animals (including rodents) and their ectoparasites. *Bartonella* bacteria can cause serious diseases in humans and complications can last for the rest of the life. As well, identification of *Bartonella* pathogens is important to identify new species and its spreading to new regions or continents. The aim of this study was to identify *Bartonella* bacteria species by using molecular methods in lice. They were collected from small rodents in Slovenia. In identification of *Bartonella* species 5 lice species were investigated: *Huebneria affinis*, *Pyroteuthis serrata*, *Polyplax spinulosa*, *Hoplopleura* sp., *Hoplopleura acanthopus*. Lice were collected from rodents identified as *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Microtus arvalis* and *Myodes glareolus*. *Bartonella* species identification was based on amplification of partial *rpoB* gene and ITS region. Amplified *rpoB* gene and ITS region PCR products were purified and sequenced. Obtained sequences were analyzed by using *Mega X* software. Sequence analysis allowed to identify three *Bartonella* species: *Bartonella cooperplainsensis*, *Bartonella tribocorum* and *Bartonella taylorii*. *B. cooperplainsensis* infection was identified in 7 *H. affinis* lice samples, *B. taylorii* was identified in 1 *H. affinis* sample and *B. tribocorum* in 2 *H. affinis* as well as in 1 *P. serrata* samples.

IVADAS

Bartonella yra gramneigiamos bakterijos, kurios perduodamos žinduoliams per ektoparazitus – šių patogenų pernešėjus. Daugiausiai aprašyti šių bakterijų pernešėjai yra nariuotakojai: erkės, blusos, smėlio musės, briedmusės (Breitschwerdt ir Kordick, 2000).

Šiuo metu nustatytų *Bartonella* spp. skirtingų rūšių skaičius siekia 45 ir vis dar auga. 20 iš šių rūšių yra siejamos su graužikais, kurie yra vieni iš pagrindinių *Bartonella* spp. rezervuarinių šeimininkų. Keičiantis klimatui, skirtingose vietovėse atrandama toms vietovėms nebūdingų patogeninių bakterijų rūšių, kurios platinamos žinduolių ar paukščių, taip didėjant grėsmei plisti toms vietovėms nebūdingoms ligoms (Okaro ir kt., 2017; Goncalves ir kt., 2016).

Tyrimų, nagrinėjančių *Bartonella* spp. paplitimą graužikų erkėse ir blusose, yra aprašyta daug, tačiau atliktų tyrimų su graužikų utelėmis Europoje trūksta, nors jie yra labai svarbūs siekiant iširti šių bakterijų rūšių įvairovę jų pernešėjuose, kurių šeimininkai turi kontaktą su naminiams gyvūnais ar žmonėms. Taip pat utelių tyrimas Europoje yra svarbus stebėti *Bartonella* genties rūšių migraciją iš joms būdingų vietovių į naujas. Žinant ektoparazitų ir jų šeimininkų užsikrėtimą ir *Bartonella* rūšių įvairovę galima nustatyti bakterijų sukeltų ligų grėsmę naminiams gyvūnams ir žmonėms.

Darbo tikslas: Identifikuoti *Bartonella* spp. graužikus parazituojančiose utelėse.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti *Bartonella* spp. *rpoB* geno gausinimą ir sekų analizę;
2. Atlikti *Bartonella* spp. ITS regiono gausinimą ir sekų analizę;
3. Nustatyti kokiomis *Bartonella* spp. užsikrėtusios skirtingų rūšių utelės.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Bartonella* spp. taksonomija

Pagal 16S ribosominės RNR tyrimus *Bartonella* priklauso proteobakterijos alfa-2 subgrupei. Ši bakterija yra artima *Brucella* ir *Agrobacterium* gentims (Brenner ir kt., 1993).

Anksčiau *Bartonella* bakterijos šeima *Bartonellaceae* buvo priskiriama *Rickettsiales* būriui kartu su *Rickettsiaceae* ir *Anaplasmataceae* šeimomis. Taip buvo dėl tuo metu vienintelės nustatytos *Bartonella bacilliformis* rūšies charakteristikų panašumo į rikecijas, nors visame būryje vienintelė *Bartonella* turėjo žiuželius. 1990 metais atlikus *Bartonella* DNR tyrimus buvo nustatyta, jog bakterija yra labiau gimininga *Alphaproteobacteria* klasei ir *Rhizobiaceae* būriui, todėl *Bartonellaceae* šeima buvo perklasifikuota iš *Rickettsiaceae* šeimos į *Rhizobiaceae* šeimą kaip iki šiol ir yra žinoma (Minnick ir Anderson, 2014).

1.2. *Bartonella* bakterijų biologija

Bartonella yra mažo dydžio, pleomorfinė, mikroaerofiliška, neturinti kapsulės ir nesudaranti sporų, gramneigiama lazdelės formos bakterija (Diddi ir kt., 2013). Priklausomai nuo rūšies gali turėti žiuželius ar pilius, pavyzdžiui, *B. bacilliformis* ir *B. clarridgeiae* yra itin judrios ir turi peritrichinius žiuželius. (Dabkevičius, 2008; Minnick ir kt., 2014). Šios bakterijos yra žinduolių ląstelių vidiniai parazitai, žmonėms perduodami per nariuotakojus vektorius, gali gyventi šeimininko ląstelėje. Yra žinomos trys *Bartonella* rūšis, kurios gali daugintis vektorių virškinamajame trakte: *B. quintana* dauginasi žmoginėse utėlėse, *B. henselae* kačių erkėse, *B. bacilliformis* smėlio muselėse (Diddi ir kt., 2013).

Įkandus nariuotakojam vektoriui arba įbrėžus katei *Bartonella* bakterija patenka į kraują ir paplinta po limfinę ir kraujotakos sistemas. Bakterijos plitimas vyksta dėl kraujo tėkmės ir kai kuriais atvejais dėl bakterijos judrumo. Manoma, jog bakterijos tvirtinasi prie šeimininko ląstelių, kurios priklausomai nuo bakterijos rūšies, gali būti eritrocitai, endotelio ir epitelio ląstelės. Bakterija prikimba prie šeimininko ląstelės adheziniams koreliuojant su kolonijos fenotipu. Esant žiuželiams, šie taip pat gali veikti kaip adheziniai. Atlikti tyrimai parodė, jog *B. bacilliformis* auginama kartu su endotelio arba epitelio viensluoksnių kultūromis gali skatinti šeimininko ląsteles keisti citoskeletą taip skatinant bakterijų įsisavinimą, tačiau eritrocituose bakterijų įsisavinimas nebūna skatinamas, nes jie nevykdo endocitozės (Minnick ir Anderson., 2014).

1.3. *Bartonella* rūšys

B. bacilliformis

Bakterija pirmą kartą aprašyta 1885 metais Peru, o jos sukeliama Kariono liga buvo aprašoma jau nuo 1593 metų Ekvadore dėl sukkelto didelio mirčių skaičiaus. *B. bacilliformis* yra apgaubta pilių ir blakstienėlių, turi apvalų maždaug 16000 Kbp genomą, kuriame du lokusai susiję su eritrocitų invazija. Skirtingų bartoneliozės protrūkių metu Peru buvo nustatyta kelios genetiškai skirtingos *B. bacilliformis* formos. Tai paaiškina užkrėčiamų žmonių įvairovę ir mirtingumo skaičių (Huarcaya ir kt., 2004; Smitherman ir Minnick, 2005).

Bartonella taylorii

Ši rūšis atrasta pelėje, Jungtinėje Karalystėje 1995 metais (Birtles ir kt., 1995). Europoje *B. taylorii* yra itin paplitusi tarp graužikų ir nors *B. taylorii* yra mažai apibūdinta taksonomiškai, manoma, jog dėl didelio paplitimo galima rekombinacija ir graužikų bei vabzdžiaėdžių užkrėtimas (Gutierrez ir kt., 2015).

Bartonella tribocorum

Pirmą kartą atrasta žiurkėje Prancūzijoje 1998 metais (Heller ir kt., 1998). Ši *Bartonella* rūšis patekusi per odą į kraują ir eritrocitus sukelia bakteremiją, kuri yra pavojinga žmogui (Garcia-Quintanilla ir kt. 2019). Užsikrėtusio žmogaus imuninei sistemai susilpnėjus bakteremija gali komplikuotis ir pereiti į kraujotakos infekciją. Negydoma infekcija komplikuojasi ir gali pereiti į sisteminio uždegimo atsako sindromą (angl. *SIRS*), t.y. sepsį, septinį šoką. (Smith ir Nehring, 2019).

Bartonella coopersplainsensis

Ši bakterijos rūšis buvo atrasta Gundi ir kt. (2009) Australijoje, Kvynslende, Brisbano priemestyje sugautose žiurkėse. Tais pačiais metais aptikta ir Tailande (Saisongkorh ir kt. 2009). 2018 metais Vijayan Genitha Helan ir kt. (2018) pirmą kartą nustatė Naujojoje Zelandijoje sugautuose graužikuose. Europoje ši bakterija nustatyta tik Graikijoje 2011 metais (Papadogiannakis ir kt., 2017). Azijoje vykdyti tyrimai rodo, jog ši rūšis labiausiai paplitusi bandikotose (Australijoje gyvenančios pelinių graužikų šeima), tačiau nėra tolimesnių tyrimų atskleidžiančių kokias ligas sukelia ši bakterijos rūšis ir ar ji pavojinga žmonėms (Jiyipong ir kt., 2018).

1.4. *Bartonella* pernešėjai ir šeimininkai

Utėlės

Europoje nėra daug tyrimų apžvelgiančių utėlių platinamas *Bartonella* rūšis. Daugiausia tyrimų aprašo *Bartonella quintana*, kuri randama žmogaus kūno *P. h. humanus* ir galvos utėlėse *P. h. capitis*. Ši bakterija sukelia Tranšėjos karščiavimą (angl. *trench fever*) bei endokarditą ir bakteremiją (Bonilla ir kt., 2009; Drancourt ir kt., 1995; Spach ir kt., 1995). Žmogaus kūno utėlė yra mažas ir parazitiškas vabzdys gyvenantis ant žmogaus kūno, rūbų bei patalynės ir mintantis tik žmogaus krauju.

Dažniausiai nuo kūno utėlių kenčia žmonės, kurie neturi galimybių dažnai praustis ir nešioti švarių drabužių. Galvos utėlės taip pat maitinasi žmogaus krauju ir yra paplitusios tarp nepasiturinčių žmonių, tačiau didelis paplitimas pastebimas ir tarp mokyklinio amžiaus vaikų. Tyrimai atlikti Amerikoje ir Prancūzijoje atskleidė, kad 2-20% tirtų benamių asmenų turi antikūnius *B. quintana*, Japonijoje 57% benamių imunoglobulino Ig G titrai *B. quintana* buvo >128 (Bonilla ir kt., 2009). Maillard ir kt. (2004) išskyrė *Bartonella* bakteriją iš naminio jaučio *Bos taurus* Prancūzijoje, taip pat yra aprašytų bakterijos aptikimų juodauodegiame elnyje *Odocoileus hemionus* ir kituose laukiniuose bei naminiuose atrajotojose. Šie tyrimai parodė, kad galbūt galvijų utėlės gali būti nauji *Bartonella* nešiotojai (Chang ir kt., 2000; Promrangsee ir kt., 2019).

Blusos

Vieni populiariausių ir labiausiai paplitusių *Bartonella* vektorių yra blusos, kurios gyvena ir maitinasi ant žinduolių, tokių kaip katės, šunys, graužikai, vabzdžiaėdžiai ir triušiai (Mardosaitė-Busaitienė ir kt., 2019). Blusos laikomos vienomis pagrindinių *Bartonella* platintojų, nes jos nešioja daug skirtingų *Bartonella* rūšių ir efektingai platina jas tarp graužikų. Dėl didelės įvairovės platinamų bakterijų rūšių siūloma blusas laikyti ne tik pernešėjais, bet ir bakterijų šeimininkais (Gutierrez ir kt., 2015).

Erkės

Daugiausia aprašytų *Bartonella* tyrimų yra su erkėmis, nes šios yra vienos didžiausių *Bartonella* platintojų, perduodančių bakterijas tiesiogiai naminiams gyvūnams, laukiniams graužikams ar žmonėms. Bakteriją turinčiai erkei įkandus katinui ar šuniui, šie gali įdrėksti ar įkasti žmogui, taip šią bakteriją perduodant netiesiogiai iš pirminio šeimininko (Guptill, 2010). *Bartonella* buvo nustatytos labiausiai paplitusiose erkėse *Ixodes ricinus* Centrinėje Europoje (Silaghi ir kt., 2016). Dėl didelio erkių gausumo miesto parkuose ir kitose žaliose vietose, kuriose lankosi žmonės ir naminiai gyvūnai erkių platinamos ligos yra didelė problema visuomenei ir gyvūnų sveikatai viso pasaulio mastu (Rizzoli ir kt., 2014).

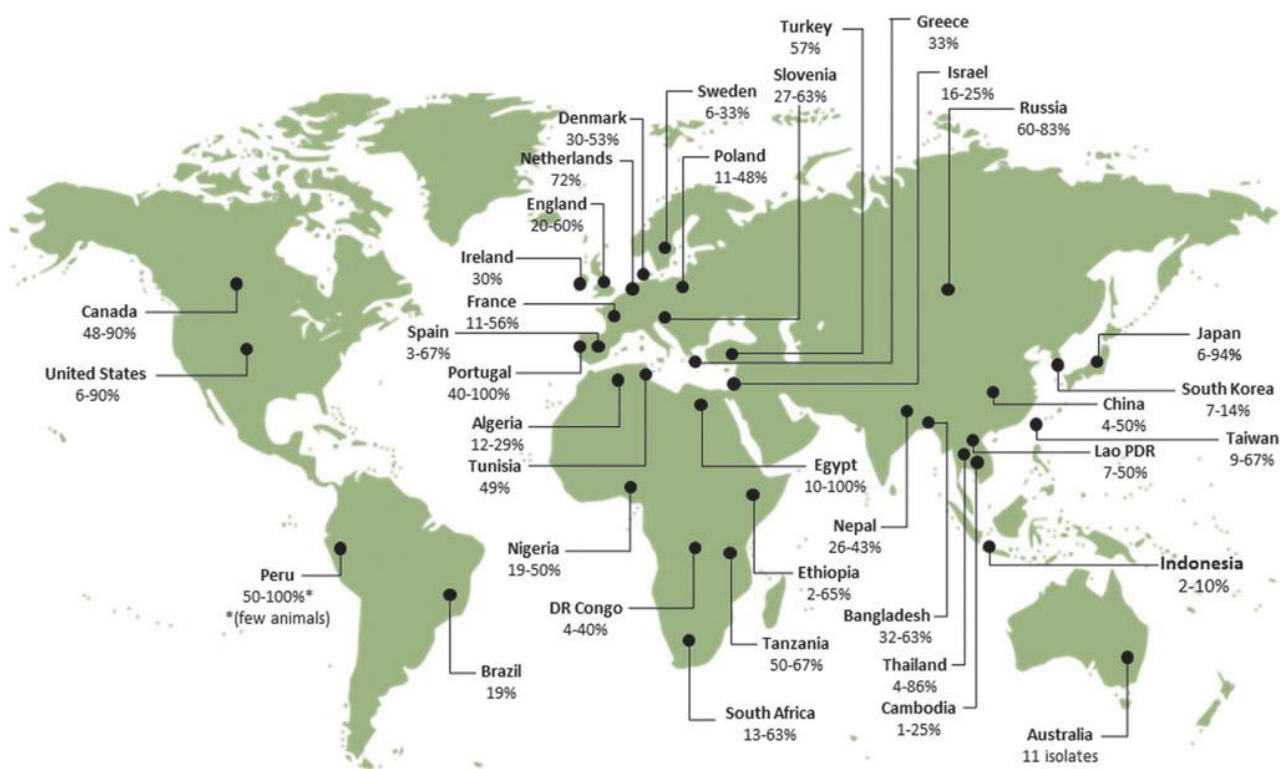
Smėlio muselės

Nuo 1764 metų buvo numanoma, kad smėlio muselės gali būti vektoriais bakterijų, sukeliančių bartoneliozę. Battistini atliktas eksperimentas surinkus *L. verrucarum* museles ir sukėlus bartoneliozę *Macacus rhesus* beždžionėje įrodė jų buvimą vektoriais (Harcaya ir kt., 2004). Smėlio muselės *Lutzomyia verrucarum* netoleruoja sausringo klimato žemame aukštyje ir šalčio dideliame aukštyje, todėl jų paplitimas stebimas vietovėse 500-3200 m virš jūros lygio ir slėniuose, kuriuose nėra vėjo. Muselės labiau mėgsta maitintis uždaroje patalpose ir prieblandoje. Vykstant El Nino reiškiniui, kai keičiasi atmosferos slėgių vyravimai tarp vakarinio ir centrinio Ramiojo vandenyno regionų, yra pastebėta, jog padidėja bartoneliozės atvejų endemiškose vietovėse. Todėl manoma, kad El Nino

reiškinio metu pasikeičiančios oro sąlygos yra palankios vektoriams ir gali juos suaktyvinti ir ne endeminėse vietovėse (Clemente ir kt., 2016; Lietuvos Hidrometeorologijos Tarnyba, 2020).

Graužikai

Graužikai ir kiti smulkieji žinduoliai nešioja erkes ir blusas, kurios žinomos kaip vieni didžiausių *Bartonella* platintojų, tačiau pelėse ir žiurkėse taip pat buvo atrasta *Bartonella* bakterijų, pavyzdžiui, 1999 metais rudojo pelėno (*M. glareolus*) kraujyje rasta *B. grahamii*, pievinio pelėno (*M. agrestis*) rasta *B. doshiae* bakterija (Birtles ir kt., 1995). Daugiau nei 20 *Bartonella* rūšių yra susijusios būtent su graužikais, todėl jie yra vieni svarbiausių rezervuarų, platinančių *Bartonella* visame pasaulyje (Mardosaitė-Busaitienė ir kt., 2019). Nors žinoma, jog graužikai yra išnešiotojai, tačiau nėra išsiaiškinta kaip graužikai gali perduoti bakteriją žmonėms. Pagal Gutierrez ir kt. (2015) sudarytą žemėlapi (1 pav.) remiantis 2014 metų duomenimis matoma, kad didžiausias *Bartonella* infekcijų paplitimas graužikuose stebimas Portugalijoje (40-100 %), Egipte (10-100 %), Japonijoje (6-94 %).



1 pav. *Bartonella* infekcijų graužikuose paplitimas visame pasaulyje procentais. 2014 m. duomenys iš PubMed (Gutierrez ir kt., 2015).

Kiti žinduoliai

1999 metais *Bartonella alsatica* buvo išskirta iš laukinio triušio *Oryctolagus cuniculus* kraujo. *B. alsatica* sukelia limfadenitą ir endokarditą žmonėse, taip pat yra užfiksuota šios bakterijos sukelta protezinių kraujagyslių transplantato infekcija. Sato ir kt. (2020) Amerikoje, Kolorade atlikto tyrimo metu buvo nustatyta, kad triušių blusos gali būti *Bartonella* platinimo vektoriais tarp triušių ir mėsėdžių, o tai padidina bakterijos platinimą tarp skirtingų mitybos grandinių.

Atlikti tyrimai parodė, kad Amerikoje 30-60 % naminių kačių yra užsikrėtusios *B. henselae*. Natūralios *B. henselae* infekcijos katėse nepasireiškia jokiais klinikinėmis komplikacijomis, tačiau žmonėms jos yra gana pavojingos ir sukelia sunkias komplikacijas limfiniuose organuose, odoje, kepenyse, širdies ir kraujagyslių bei nervų sistemose. (Alsmark ir kt., 2004).

Elninių šeimos narių kailiuose itin dideliais kiekiais randamos briedmūsės (*Lipoptena cervi*), kurios itin paplitusios tarp elninių šeimos narių Europoje, Azijoje ir Šiaurės Amerikoje. Jos yra kraują siurbiantys parazitai, priklausantys *Hippoboscidae* utėlių šeimai ir platinantys *Bartonella* bakterijas. Labiausiai paplitę briedmusių šeimininkai Europoje yra taurusis elnias (*Cervus elaphus*), europinė stirna (*Capreolus capreolus*), briedžiai (*Alces alces*) ir dėmėtasis elnias (*Cervus nippon*). Mūsės gali žiemoti ant šeimininko ir didžioji dalis gali išgyventi iki metų. Sparnuota suaugusi briedmūsė ieško didelio tamsaus judančio objekto, gali skristi trumpus atstumus ir dažnai puola atsitiktinius šeimininkus, tokius kaip šunys ar žmonės. Nors retai tokiu atveju įkanda žmonėms, tačiau literatūroje yra aprašytų įkandimų atvejų (Szewczyk ir kt., 2017).

Žmonės

Žmonėms *Bartonella* kelia didelę grėsmę dėl sukiamų infekcijų įvairovės ir mirtingumo procentų. Bakterija vektorių pernešta patenka į žmogaus organizmą, kuris tampa bakterijos rezervuaru ir dažniausiai prasideda besimtomiška infekcija. Žmonės gali būti ne tik galiniais rezervuarais, bet ir platinti *Bartonella* bakterijas tarp kitų žmonių krauju. Tokių atvejų jau yra registruotų, kai motina perdavė bakteriją vaikui (Gomes ir Ruiz, 2017).

1.5. *Bartonella* sukeltos ligos

Nors tik pastaruosius 3 dešimtmečius daugėja informacijos ir tyrimų apie *Bartonella* bakterijas, manoma, kad *Bartonella* infekcijos dar priešistoriniais laikais kėlė grėsmę žmonėms. *Bartonella quintana* sukeltos infekcijos buvo nustatytos prieš daugiau negu 4000 metų mirusio žmogaus danties pulpoje (Drancourt ir kt., 2005). *Bartonella* spp. tyrimų skaičius ypatingai padidėjo po Chomel ir kt. (2006) paskelbtų duomenų apie *B. bacilliformis*, *B. vinsonii*, *B. quintana* ir *B. henselae* rūšių bakterinės angiomatozės sukėlimą. Užsikrėtus *Bartonella* dažniausiai pasireiškia subklinicine infekcija ir ilgalaikė intraeritrocitine bakteremija (Minnick ir Anderson., 2014; Žukauskaitė-Šarapajevienė ir kt., 2015)

1 lentelė. Patvirtintos patogeniškos žmonėms *Bartonella* rūšys (Minnick ir Anderson, 2014)

Rūšis	Susijusios su žmonėmis ligos	Rezervuarai	Vektoriai
<i>B. alsatica</i>	Endokarditas, limfadenopatija	Triušis	Blusos
<i>B. bacilliformis</i>	Oroya karščiavimas, verruga peruana, Kariono liga	Žmonės	Smėlio muselės
<i>B. clarridgeiae</i>	Katės įdrėskimo liga	Katės	Kačių blusos
<i>B. elizabethae</i>	Endokarditas, karštinė, neuroretinitas	Žiurkės	Blusos, utėlės
<i>B. grahamii</i>	Neuroretinitas	Grauzikai	Blusos, utėlės
<i>B. henselae</i>	Bacilinė angiomatozė, bakteremija, bacilinė peliozė, Katės įdrėskimo liga, endokarditas	Katės	Kačių blusos
<i>B. koehlerae</i>	Bakteremija, endokarditas, neuropatija	Katės	Kačių blusos
<i>B. quintana</i>	Bacilinė angiomatozė, bakteremija, endokarditas, tranšėjos karštinė	Žmonės, beždžionės	Kūno utėlės, blusos
<i>B. rochalimae</i>	Bakteremija, karštligė, splenomegalija	Šuninių šeima, žiurkės, meškėnai	Blusos
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Bakteremija, endokarditas, karštinė	Baltakojai žiurkėnukai, šunys	Utėlė
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Artritas, endokarditas, nemiga, neuropatija	Šuninių šeima	Utėlė

Tranšėjos karštinė

Tranšėjos karštinė pirmą kartą aprašyta 1915 metais Pirmojo Pasaulinio karo metu Anglijos karių būstinėje ir vėliau gavusi Tranšėjos (angl. *trench*, liet. *apkasai*) pavadinimą dėl paplitimo karo lauko apkasuose (Wright, 1916; Anstead, 2016). Karštinės sukelėja yra *Bartonella quintana* bakterija perduodama kūno utėlių. Pastebima, kad karštinė vis atsinaujina tarp benamių ir nepasiturinčių žmonių, ypač piktnaudžiaujančių alkoholiu ar užsikrėtusiu žmogaus imunodeficito virusu ŽIV (Kim ir kt., 2017).

Infekcinis endokarditas

Bartonella bakterinės infekcijos sukeltas infekcinis endokarditas (BCNIE) manoma sudaro apie 3-4 % visų endokardito atvejų. *Bartonella quintana* ir *Bartonella henselae* yra daugiausiai sukeliančios endokarditą bakterijos. Dažniausiai infekcija paveikia natūralius širdies vožtuvus, tačiau

yra aprašytos dirbtinių širdies vožtuvų infekcijos, kurios yra agresyvesnės ir skatina širdies nepakankamumo vystymąsi (Okaro ir kt., 2017). Pastebima, jog *Bartonella* bakterijų sukeltas endokarditas dažniau pasireiškia vyrams. Nėra pakankamai duomenų literatūroje apie gydymą, todėl gydymo strategija priklauso nuo gydytojų nuožiūros (Abu Shtaya ir kt., 2019).

Bacilinė angiomatozė

Pirmą kartą liga aprašyta 1983m. kaip histologiškai netipiška poodinė infekcija besivystanti AIDS pacientams (Stoler ir kt., 1983m.). Tai reta liga, kuri pasireiškia neovaskuliarine proliferacija odoje arba vidiniuose organuose. Pagrindiniai bakterijos nešiotojai yra katės, vektoriais būna utėlės ir blusos. Bakterijos perduodamos katei įkandus ar įdrėskus žmogui. Užkrėtėjais būna *Bartonella henselae* ir *Bartonella quintana*. Abi bakterijos sukelia odos pažeidimus, *B. quintana* taip pat sukelia poodinius ir kaulų pažeidimus, o *B. henselae* kepenų ir blužnies hepatinę peliozę. Neovaskuliarinė proliferacija vidiniuose audiniuose dažniausiai pasireiškia inkstuose ar blužnyje ir yra žinoma kaip *Peliosis* (Akram ir Rawla, 2019; Brzewski ir kt., 2020). Liga vyrauja tarp turinčių susilpnėjusį imunitetą, ypač tarp nešiojančių žmogaus imunodeficitą virusą ŽIV (Markowicz, 2016), taip pat paveikia žmones po organų transplantacijos, naudojančius kortikosteroidus ir metotreksato gydymą, turėjusius onkologinių ligų. Bacilinės angiomatozės atvejis buvo aprašytas 65 m. vyrui 5 mėn. po inksto persodinimo, kai pacientui pasireiškė daugybė gumbelių formos odos pažeidimų (Brzewski ir kt., 2020).

Kariono liga

Šią ligą sukelia *Bartonella bacilliformis*, kurios vektoriais būna smėlio musytės (*Lutzomyia* spp.), taip pat užsikrėsti galima per kraujo perpylimą, motina gali perduoti vaikui. Nors bakterija yra jautri antibiotikams, tačiau šios ligos mirtingumas yra didelis (Gomes ir Ruiz, 2017). Liga paplitusi Pietų Amerikos Andų kalnuose, Ekvadoro Guajaso ir Manabi provincijų pakrantėse. Liga turi ūminę ir lėtinę fazes. Pirmiausia infekcija pasireiškia eritrocituose ir sukelia ūminę hemolizinę anemiją vadinama Oroya karštine, kurios metu nevarojant antibiotikų mirtingumas siekia iki 88%. Vėliau pasireiškia chroninė fazė vadinama „Verruga peruana“, kurios metu vystosi infekcija endotelio ląstelėse ir dėl kurios vyksta kraujagyslių ir endotelio ląstelių proliferacija (Garcia-Quintanilla ir kt., 2019). Kraujagyslės nekontroliuojamai auga odoje, blužnyje ir kepenyse. Šis nuo normos nukrypęs kraujagyslių augimas yra panašus į kraujagyslių formavimąsi augant navikams. *Bartonella bacilliformis* (*Bb*) sukelia infekciją kraujagyslių endotelio ląstelėse (VECs) ir skatina gaminti per daug epidermio augimo faktoriaus (EGF), dėl kurio ląstelės dalijasi greičiau negu turėtų. Taip pat endotelio ląstelės keliauja prie bakterijos ir formuoja į kapiliarus panašius vamzdelius (Hicks ir Minnick, 2020). Abi ligos fazės gali pasireikšti viena po kitos, tačiau yra atvejų, kai jos pasireiškia nepriklausomai (Pons ir kt., 2017).

Katės įdrėskimo liga

Liga pirmą kartą buvo aprašyta dvidešimto amžiaus ketvirtajame dešimtmetyje ir šeštajame dešimtmetyje buvo asocijuota su katėmis (Baranowski ir Huang, 2019). Dar žinoma, kaip katės įdrėskimo liga (angl. *cat scratch disease, CSD*). Dažniausiai pasireiškia kaip švelni limfadenopatijos forma. Ligą sukelia *B. henselae* patekusi į žmogaus organizmą po katės įdrėskimo ar įkandimo. Katės bakterijas nešioja kaip rezervuarai, o vektoriais būna kačių blusos ar utėlės, kurios taip pat gali užkrėsti žmones (Klotz ir kt., 2011). Nors suaugusieji gali užsikrėsti, tačiau labiau liga paplitusi tarp vaikų iki 18 metų, iš kurių 60 % priklauso vyriškai lyčiai (Baranowski ir Huang, 2019). Liga gydoma antibiotikais. Yra aprašyta atvejų, kai vienas pacientas iš dešimties pasveiko ir be gydymo (Shorbatli ir kt., 2018).

2. MEDŽIAGA IR METODIKA

2.1. Tyrimo medžiaga

Šiame darbe tiriami 37 mėginiai, kuriuose yra 134 utėlės (2 lentelė). Graužikai, iš kurių buvo surinktos tiriamos utėlės, buvo sugauti Slovakijoje. Tyrimo medžiagą rinko dr. Michal Stanko (Slovakijos Gamtos mokslų akademijos Parazitologijos institutas). Surinktos utėlės Parazitologijos institute buvo užfiksuotos 70 % etanolio tirpale ir perduotos Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto Molekulinės biologijos laboratorijai. Molekulinės biologijos laboratorijos darbuotojai ir studentai sugrupavo utėles pagal šeimnininką, rūšį ir vystymosi stadiją ir atliekant tikro laiko PGR nustatė *Bartonella* užsikrėtusius mėginius. 37 mėginiuose sugrupuotos 6 utėlių rūšys: *Huebneria affinis*, *Pyroteuthis serrata*, *Hoplopleura acanthopus*, *Polyplax spinulosa* ir *Hoplopleura sp.* Tiriamos utėlės buvo surinktos iš 4 graužikų: dirvinės pelės (*Apodemus agrarius*), rudojo pelėno (*Myodes glareolus*), geltonkaklės pelės (*Apodemus flavicollis*) ir paprastojo pelėno (*Microtus arvalis*) graužikų (3 lentelė).

2 lentelė. Utėlių skaičius TL-PGR teigiamuose mėginiuose pagal utėlių rūšį.

Utėlių rūšis	Teigiami mėginiai	Utėlių skaičius mėginiuose
<i>H.affinis</i>	26	111
<i>P.serrata</i>	8	18
<i>H.acanthopus</i>	1	3
<i>Hoplopleura sp.</i>	1	1
<i>P.spinulosa</i>	1	1
Iš viso	37	134

3 lentelė. *Bartonella* TL-PGR teigiami mėginiai pagal graužikų ir utėlių rūšis.

Graužikų rūšis	Utėlių rūšis	Teigiami mėginiai	Utėlių skaičius mėginiuose
<i>A. agrarius</i>	<i>H. affinis</i>	17	91
	<i>P. serrata</i>	7	16
<i>A. flavicollis</i>	<i>H. affinis</i>	6	16
	<i>P. serrata</i>	1	2
	<i>Hoplopleura sp.</i>	1	1
	<i>P. spinulosa</i>	1	1
<i>M. glareolus</i>	<i>H. affinis</i>	3	4
<i>M. arvalis</i>	<i>H. acanthopus</i>	1	3
Iš viso:		37	134

2.2. DNR išskyrimas iš utėlių

DNR išskyrimas iš utėlių buvo atliekamas naudojant 2,5 % amoniako tirpalą pagal Stanczak ir kt. (1999) protokolą:

1. Utėlės išimamos iš etanolio tirpalo, kuriame buvo laikomos ir paliekamos ant popierinės servetėlės kambario temperatūroje išdžiūti.
2. Grupuojant pagal lytį ir augimo stadiją nuo 1 iki 11, išdžiuvusios utėlės perkeliamos į 1,5 ml mėgintuvėlius.
3. Priklausomai nuo kiek utėlių ėminių yra viename mėgintuvėlyje mikrodozatoriumi įpilamas tam tikras amoniako kiekis kaip nurodyta 4 lentelėje.

4 lentelė. Amoniako kiekis, reikalingas DNR išskyrimui pagal utėlių skaičių.

Utėlių skaičius	Amoniako kiekis, μ l
1-2	40
3	50
4-5	60
6-7	80
8-9	90
10-11	100

4. Termostate mėgintuvėliai inkubuojami +99 °C temperatūroje 25 minutes.
5. Mėgintuvėliai su utėlėmis centrifuguojami 1 min. kambario temperatūroje 13000 aps/min greičiu.

6. Mėgintuvėliai atkempšami ir iki 15 min. inkubuojami termostate, kad išgaruotų amoniakas. Stebima, kad mėginys neperdžiūtų. Mėgintuvėliai uždaromi.
7. Mėgintuvėliai iš karto dedami į ledo vonią 2-3 minutėms.
8. Išėmus iš ledo vonios, mėgintuvėliai centrifuguojami kambario temperatūroje 1 min. 13000 aps/min greičiu.
9. Paruošti mėginiai laikomi -4°C temperatūroje šaldytuve. Laikant ilgiau negu savaitę mėginiai turi būti perkelti į -20°C temperatūrą.

2.3. *Bartonella* spp. nustatymo molekuliniai tyrimo metodai

2.3.1. *Bartonella* spp. *rpoB* geno fragmento gausinimas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu

Tiriant *Bartonella* spp. buvo atliekama *rpoB* geno fragmento amplifikacija naudojant polimerizacijos grandinės reakcijos (PGR) metodą, kuriame naudojome RpoB-F ir RpoB-R pradmenis (5 lentelė) (Renesto ir kt., 2001). *RpoB* genas, RNR beta polimerazės subgrupė, bakterijose dažniausiai turi tik vieną kopiją, todėl *rpoB* geno amplifikacija yra vienas iš efektyviausių būdų identifikuoti bakterijos rūšį (Vos ir kt., 2012).

5 lentelė. PGR reakcijoje *rpoB* genui amplifikuoti naudojami pradmenys ir jų sekos.

Pradmenys	Sekos
RpoB-F	5'- CGCATTGGYTTTRCTTCGTATG-3'
RpoB-R	5- GTRGAYTGATTRGAACGYTG-3'

PGR reakcijos mišinio pagaminimui kartu su pradmenimis naudojamas Green Master Mix, du kartus distiliuotas vanduo ir tiriamas DNR (6 lentelė). Reakcijos mišinio bendrasis tūris 25μl (23μl Mix + 2μl DNR). Neigiamuose kontroliniuose mėginiuose vietoje tiriamos DNR naudotas du kartus distiliuotas vanduo, teigiamose kontrolėse - žinomos *Bartonella* DNR. PGR reakcijos sąlygos nurodytos 7 lentelėje. Reakcijos atliekamos Eppendorf PGR sistemos *Mastercycler personal* amplifikatoriuje.

6 lentelė. PGR reakcijos *rpoB* geno amplifikavimui naudojami mišinio komponentai.

Reagentai	1 pvz. (μl)
ddH ₂ O	8,5
Green Master Mix (2x)	12,5
RpoB-F (10 pm/ μl)	1
RpoB-R (10 pm/ μl)	1
DNR	2
Viso:	25

7 lentelė. PGR *rpoB* geno amplifikavimo programa

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
96 °C	2 min	1
94 °C	50 s	45
55 °C	50 s	
72 °C	60 s	
72 °C	7 min	1
4 °C	hold	

Atlikus PGR reakcijas PGR produktų vizualizavimui ir analizei buvo atliekama elektroforezė agarozės gelyje.

2.3.2. *Bartonella* spp. ITS regiono amplifikacija lizdinės polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu

ITS regionas, tai 16S-23S intergeninis regionas, kuris yra unikalus visose bakterijų gentyse. Bakterijų rūšies identifikavimas pagal šį regioną yra itin efektyvus dėl sekų ilgių skirtumų (Jensen ir kt., 2000). *Bartonella* spp. ITS regiono amplifikacija atlikta pagal protokolą, sukurta pagal Kaewmongkol (2012) ir Jensen ir kt. (2000). Naudojome lizdinės PGR metodą, kuris susideda iš dviejų reakcijų su skirtingais pradmenimis (8 lentelė). Pirmoje lizdinėje PGR reakcijoje išoriniai WITS-F ir WITS-R pradmenys naudoti su SensiMix II, du kartus distiliuotu vandeniu ir tiriama DNR (9 lentelė), bendras mišinio tūris 25μl (23μl Mix + 2μl DNR). Antroje reakcijoje naudoti vidiniai pradmenys Bh311-332F ir Bh473-452R kartu su SensiMix II, du kartus distiliuotu vandeniu ir pirmosios reakcijos PGR produktu (10 lentelė). Antrosios reakcijos mišinio bendrasis tūris 25μl (24μl Mix + 1μl PGR produkto). Pirmoje ir antroje PGR reakcijose neigiamos kontrolės mėginiuose

naudojamas distiliuotas vanduo vietoje tiriamos DNR ar PGR produkto. Teigiamose kontrolėse naudojamas žinomos *Bartonella* DNR. Abiejų reakcijų amplifikavimo programos nurodytos 11 ir 12 lentelėse. Lizdinės PGR reakcijos buvo atliekamos Eppendorf PGR sistemos *Mastercycler personal* amplifikatoriuje.

8 lentelė. Lizdinėje PGR reakcijoje naudojami pradmenys ir jų sekos.

Pradmenys	Sekos
WITS-F	5- ACCTCCTTTCTAAGGATGAT -3'
WITS-R	5- CTCTTTCTTCAGATGATGATCC -3'
Bh311-332F	5'-CTCTTTCTTCAGATGATGATCC -3'
Bh473-452R	5'-AACCAACTGAGCTACAAGCCCT -3'
Inner ITS-R (ITS)	5-GCGGTTAAGCTTCCAATCATA-3'

9 lentelė. Pirmosios lizdinės PGR reakcijos mišinio komponentai.

Reagentai	Galutinės koncentracijos	1 pvz. (μl)
ddH ₂ O		15
SensiMix II	1x	6
WITS-F	0,4 pmol	1
WITS-R	0,4 pmol	1
DNR		2
Iš viso:		25

10 lentelė. Antrosios lizdinės PGR reakcijos reagentai.

Reagentai	Galutinės koncentracijos	1 pvz. (μl)
ddH ₂ O		16
SensiMix II	1x	6
Bh311-332F (10 pm/ μl)	0,4 pmol	1
ITS-R (10 pm/ μl)	0,4 pmol	1
PGR produktas		1
Iš viso:		25

11 lentelė. Pirmos lizdinės PGR amplifikavimo programa.

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
96 °C	2 min	1
94 °C	50 s	40
48 °C	60 s	
72 °C	90 s	
72 °C	6 min	1
4 °C	hold	

12 lentelė. Antrosios lizdinės PGR reakcijos amplifikavimo programa.

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
96 °C	2 min	1
94 °C	45 s	45
60 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	5 min	1
4 °C	hold	

Atlikus PGR reakcijas PGR produktų vizualizavimui ir analizei buvo atliekama elektroforezė agarozės gelyje, tačiau teigiamas rezultatas nebuvo gautas, todėl lizdinės PGR reakcijos buvo pakartotos panaudojus pakeistą PGR mišinio sudėtį. Abiejose lizdinės PGR reakcijose vietoje SensiMix II mišinio buvo naudotas 10x Dream Taq Green mišinys (13 ir 14 lentelės). Amplifikacijos programos rodmenys palikti tie patys (11 ir 12 lentelės). Pirmojoje reakcijoje padidintas DNR kiekis iki 4 µl, todėl bendrasis PGR mišinio tūris buvo 25 µl = 21 µl Mix + 4 µl DNR. Antroje reakcijoje PGR produkto kiekis padidintas iki 2 µl, bendrasis tūris 25 µl = 23 µl Mix + 2 µl PGR produkto.

13 lentelė. Pakartotos pirmosios lizdinės PGR reakcijos mišinio komponentai.

Reagentai	Galutinės koncentracijos	1 pvz. (μl)
Sterilus ddH ₂ O		15,5
10x Dream Taq Green buffer	1x	2,5
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	0,5
25 mM dNTPs	0,2 mM	0,2
WITS-F	0,4 pmol	1
WITS-R	0,4 pmol	1
Dream Taq DNR polimerazė (5 U/μl)	1,5 U	0,3
DNR		4
Iš viso:		25

14 lentelė. Pakartotos antrosios lizdinės PGR reakcijos mišinio komponentai.

Reagentai	Galutinės koncentracijos	1 pvz. (μl)
Sterilus ddH ₂ O		18
10x Dream Taq Green buffer	1x	2,5
25 mM dNTPs	0,2 mM	0,2
Bh311-332F (10 pm/ μl)	0,4 pmol	1
ITS-R (10 pm/ μl)	0,4 pmol	1
Dream Taq DNR polimerazė (5 U/μl)	1,5 U	0,3
PGR produktas		2
Iš viso:		25

Pakartojus PGR su nauju mišiniu, buvo atliekama elektroforezė agarozės gelyje.

2.4. Amplifikuotų DNR fragmentų vizualizacija elektroforezės metodu

Naudojant horizontaliosios elektroforezės metodą agarozės gelyje atlikome PGR produktų frakcionavimą pagal Ambrasienė, (2008):

1. 1x TBE buferis paruošiamas sumaišius 20 ml 50x TBE buferio su 980 ml dH₂O arba 100 ml 10x TBE buferio su 900 ml dH₂O.
2. Suskaičiuojami reikalingi 1x TBE ir agarozės miltelių (*Thermoscientific TopVision agarose*, Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva) kiekiai, norint pagaminti atitinkamą

kiekį 2 % agarozės gelio. Pavyzdžiui, *Hu 20* elektroforezės aparatas talpina 250 ml agarozės gelio, todėl maišoma 3,75 g agarozės miltelių su 250 ml 1x TBE buferio.

15 lentelė. Elektroforezės aparatai ir agarozės gelio talpa.

Elektroforezės aparatas	Agarozės gelio talpa, ml
<i>Hu 20</i>	250
<i>Hu 13</i>	150
<i>Hu 6</i>	40

3. Gautas mišinys tirpinamas mikrobangų krosnelėje kaitinant kol ima burbuliuoti, tada ištraukiamas ir pamaišomas. Šie veiksmai kartojami kelis kartus, kol agarozės milteliai ištirpsta.
4. Įpilamas atitinkamas kiekis etidžio bromido (100 ml gelio reikia 10 µl etidžio bromido) ir išmaišoma nusukus kolbos galvutę nuo savęs, stengiantis neįkvėpti etidžio bromido.
5. Visas mišinys išpilamas į paruoštą elektroforezės formą su šulinėlius formuojančiomis šukutėmis. Sustingus geliui išimamos šukutes.
6. Formą įstačius į elektroforezės aparatą, pripilama 1x TBE buferio iki kol visas gelis yra apsemiamas. Į šonus pripilama po 5 µl etidžio bromido.
7. PGR produktai (jeigu PGR reakcijos buferyje nebuvo dažo), sumaišyti su 2 µl 6x LoadingDye dažo, po 20 µl suleidžiami į šulinėlius naudojant mikrodozatorių. Į atitinkamus šulinėlius įpilamas 100 bp molekulinės masės žymuo *GeneRulerTM* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).
8. Sujungus elektrodus, nustatoma įtampa atstuma tarp elektrodų padauginus iš 5. Elektrolizė vyksta 1-1,5 val, priklausomai nuo atstumo. DNR nukeliavus pakankamą atstumą, jog fragmentai atsiskirtų, aparatas išjungiamas.
9. Gelis patalpinamas į UV transliuminatorių su kamera ir *E.A.S.Y Win 32* gelių analizavimo sistema.

DNR mėginių fragmentai, kurie buvo sėkmingai pagausinti, iškirpti iš gelio ir paruošti sekvenavimui.

2.5. Amplifikuotų DNR fragmentų paruošimas sekvenavimui

Iškirpti *Bartonella* spp. *rpoB* geno ir ITS regiono fragmentai buvo išvalomi iš agarozės gelio, pašalinant įvairias priemaišas ar inhibitorius, kad būtų galima sekvenuoti sekas. Fragmentų išvalymui naudojome *ISOLATE II PCR and Gel Kit* (Bioline, Didžioji Britanija) rinkinį pagal gamintojų protokolą.

Darbo eiga:

1. Pageidautini DNR fragmentai išpjaunami iš gelio naudojant peiliuką, gelis su fragmentais perkeliama į pasvertus 1,5 ml mėgintuvėlius, tada vėl pasveriami.
2. Pagal paskaičiuotą gelio svorį padaugintą iš gelio koncentracijos įpilamas surišimo buferis, mėgintuvėliai kaitinami 50 °C 10 minučių.
3. Gelio kolonėlė įdedama į surinkimo mėgintuvėlį, į kolonėlę įpilamas ištirpęs gelis su DNR fragmentais. Centrifuguojama 30 s 11000 xg. Turinys surinkimo mėgintuvėlyje išpilamas.
4. Valymo kolonėlė užpilama 700 µl valymo buferiu ir centrifuguojama tokiomis pačiomis sąlygomis. Turinys iš surinkimo mėgintuvėlio išpilamas.
5. Likęs turinys centrifuguojamas maksimaliu greičiu 2 min. Gelio kolonėlė perkeliama į 1,5 ml mikromėgintuvėlį.
6. Tiesiai ant silikagelio membranos pripilama 15-30 µl išplovimo buferio, inkubuojama 1 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama maksimaliu greičiu 2 min.
7. Gryninimo kolonėlę pašalinama ir gauta išgryninta DNR laikoma -20 °C iki sekvenavimo.

Išgryninta DNR buvo siunčiama į MacroGen Europe laboratoriją Nyderlanduose, kur buvo atliekama sekoskaita.

2.6. DNR sekų analizė

Atlikus sekoskaitą DNR sekos buvo tvarkomos naudojant *Mega X* programinio paketo 10.1.8 versiją. Naudojant *Trace editor* funkciją pašalinti nekokybiški sekos elementai. Visos nusekvenotos sekos sulygintos tarpusavyje ir palygintos su *NCBI* (angl. *National Center for Biotechnology Information*) Genų Banko (angl. *GenBank*) duomenų bazėje esančiomis sekomis. Palyginimui naudota *BLAST* (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*) paieškos funkcija. Pasirinkta *BLASTN* nukleotidų analizė, kuri ieško panašių nukleotidų sekų (Madden, 2013). Atlikus *BLAST* paiešką gaunamas sąrašas sekų, prie kurių nurodomi priėjimo numeris (angl. *Accession*), procentinis tapatumas (angl. *Percent Identity*), kuris nurodo kiek procentų rasta seka yra panaši į lyginamą seka, ir *E* vertė (angl. *Expect value*), kuri nurodo kokia yra atsitiktinio sutapimo tikimybė (McGinnis ir Madden, 2014).

2.7. Filogenetinio medžio sudarymas

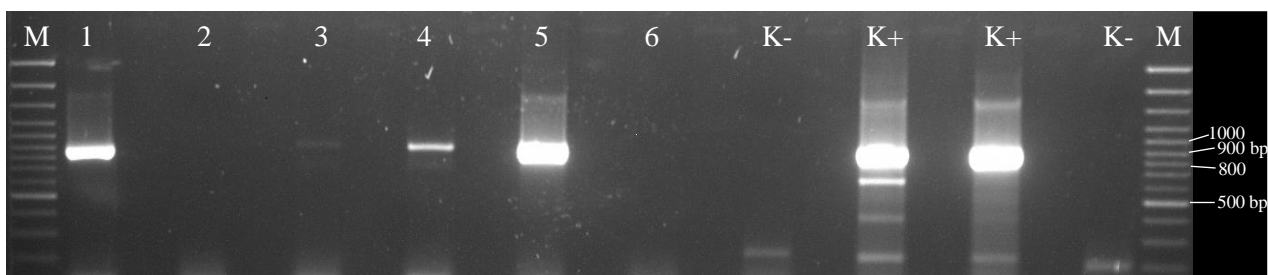
Filogenetinio medžio sudarymui buvo naudojama *Mega X* programinio paketo 10.1.8 versija. Su sutvarkytomis ir genų banke *GeneBank* rastomis į jas panašiausiomis sekomis buvo atlikta geriausio filogenetinio modelio analizė. Pasirinktas didžiausio tikėtimumo (angl. *Maximum*

likelihood) metodas su Tamura 3 parametrų modeliu. Atliktas filogenetikos testas *Bootstrap* metodu su 1000 įkėlų, parodantis sudaryto medžio tikrumo tikimybę (Newman ir kt., 2016).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. *Bartonella rpoB* geno fragmento analizė

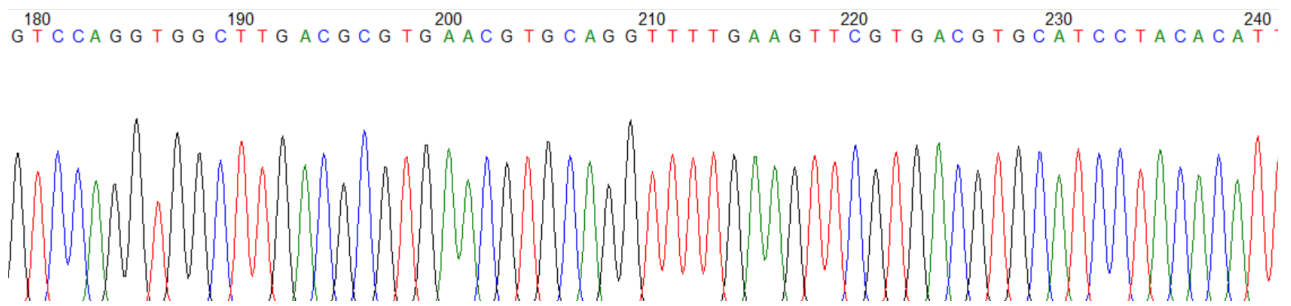
Bartonella spp. *rpoB* geno gausinimas buvo atliktas panaudojant 37 utėlių DNR mėginius, kuriuose po tikro laiko PGR buvo aptiktos *Bartonella* bakterijos. Po *rpoB* geno fragmento gausinimo buvo atliktas fragmentų vizualizavimas horizontalios elektroforezės metodu. Atliekant PGR buvo amplifikuoti *rpoB* geno 825 bp fragmentai (Renesto ir kt., 2001), todėl vertinant pagal 100 bp *GeneRuler*TM molekulinį masės žymenį, buvo ieškoma atsiskyrusių fragmentų, išsidėsčiusių tarp 800-900 bp. 2 paveikslėlyje pateikta agarozės gelio su amplifikuotais *rpoB* geno fragmentais nuotrauka po elektroforezės. 1, 4 ir 5 šulinėlių vietose, kuriose buvo *H. affinis* utėlių mėginių DNR, matomi fragmentai, išsidėstę tarp 800-900 bp. Iš viso buvo gauti 8 teigiami rezultatai – *rpoB* geno fragmento gausinimas buvo sėkmingas tik aštuoniuose iš 37 tirtų mėginių. Visi 8 mėginiai buvo *H. affinis* utėlių. Mažą amplifikavusių fragmentų skaičių paaiškina mažesnis vieno žingsnio PGR jautrumas palyginus su tikro laiko PGR jautrumu.



2 pav. Gelio nuotrauka po elektroforezės. M raidėmis pažymėti *GeneRuler*TM 100 bp molekulinės masės žymenys, 1-6 skaičiais pažymėti DNR mėginiai, K+ pažymėtos teigiamos kontrolės, K- neigiamos kontrolės. 1, 4, 5 – teigiami rezultatai.

Atlikus sekoskaitą buvo gautos DNR nukleotidų sekos iš visų 8 amplifikuotų *rpoB* geno fragmentų (3 pav.). Pašalinus triukšmą naudojant *Mega X* programos *Trace editor* funkciją, gautos sekos buvo palyginamos su *BLAST* programos duomenų bazėje rastomis nukleotidų sekomis. 7 *rpoB* geno fragmento nukleotidų sekų 100 % identiškumas duomenų bazėje nustatytas su *B. coopersplainsensis* (*GenBank* priėjimo numeris MH687373.1) iš *Apodemus agrarius* graužiko, sugauto Lietuvoje (4 pav.). Sekų E vertė gauta $4e^{-153}$, skaičius mažas, todėl vertinama, jog yra labai maža tikimybė, kad sekos sutapo atsitiktinai. 7 sekų sutapimą su ta pačia seka genų banke paaiškina tai, jog visi 7 mėginiai buvo gauti iš *H. affinis* utėlių, surinktų nuo 2 *A. agrarius* graužikų, rastų toje pačioje vietovėje. Likusi *rpoB* geno fragmento seka 100 % sutapo su dvejomis sekomis iš genų banko: *B. taylorii* nukleotidų seka (*GenBank* priėjimo numeris MH932636.1), kuri buvo gauta iš *A. flavicollis* graužiko kepenų Turkijoje ir *B. taylorii* seka (*GenBank* priėjimo numeris MH547319.1), kuri

priklauso *M. glareolus* graužikui iš Lietuvos. Šių sekų E vertė $4e^{-153}$, todėl laikoma, jog yra maža atsitiktinio sutapimo tikimybė.

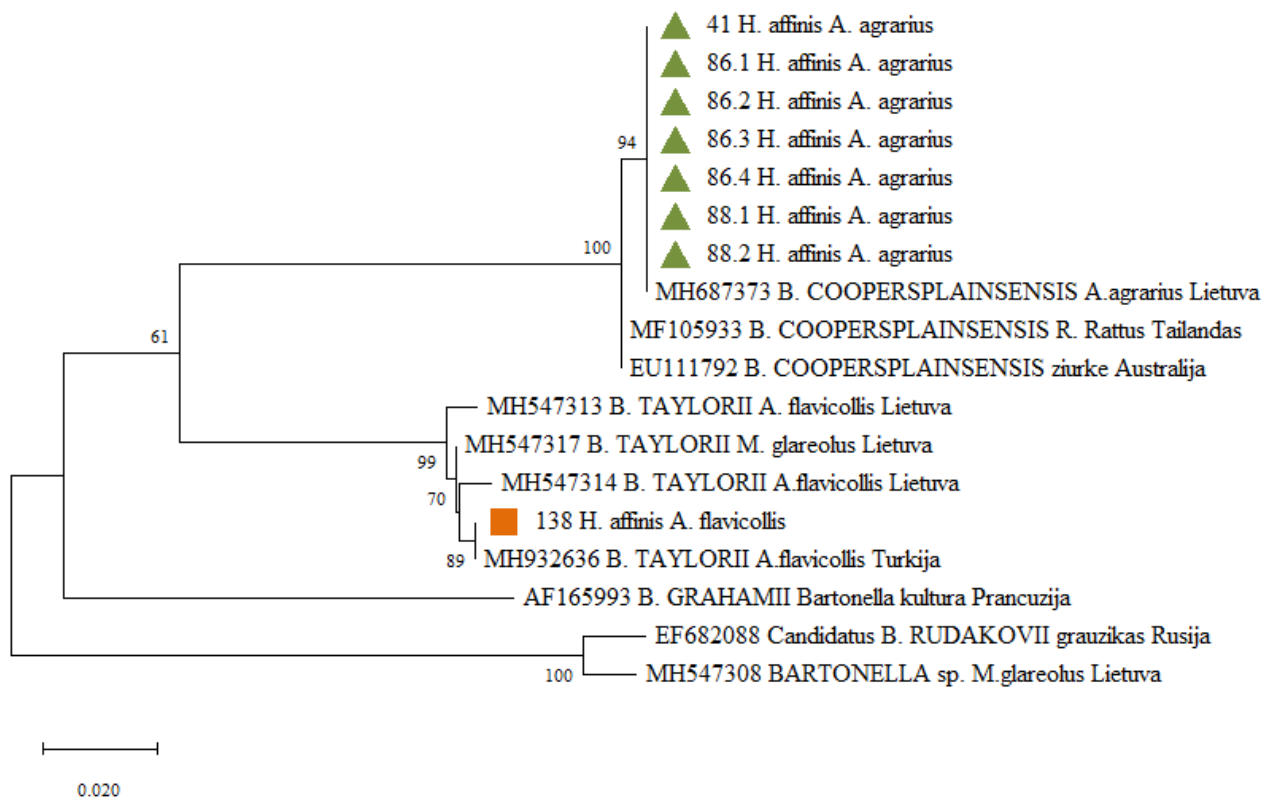


3 lentelė. Nusekvenuota *Bartonella rpoB* geno seka.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Bartonella cooperplainsensis strain 2015-387 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	552	552	100%	4e-153	100.00%	gii1551510839 MH687373.1
Bartonella sp. AA86HXZ RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	552	552	100%	4e-153	100.00%	gii597718692 KJ361725.1
Bartonella cooperplainsensis isolate THCBIR20 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	540	540	100%	1e-149	99.30%	gii1377046930 MF105933.1
Bartonella cooperplainsensis isolate THCBIR13 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	540	540	100%	1e-149	99.30%	gii1377046926 MF105931.1
Bartonella cooperplainsensis isolate THCTIR128 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	540	540	100%	1e-149	99.30%	gii1377046880 MF105908.1
Bartonella cooperplainsensis isolate THCTIR120 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	540	540	100%	1e-149	99.30%	gii1377046878 MF105907.1
Bartonella cooperplainsensis isolate THCTIR101 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	540	540	100%	1e-149	99.30%	gii1377046864 MF105900.1
Uncultured Bartonella sp. isolate RRB080N RNA polymerase beta-subunit (rpoB) gene, partial cds	540	540	100%	1e-149	99.30%	gii269930802 GU143439.1
Bartonella sp. Lao/Nh1 RpoB (rpoB) gene, partial cds	540	540	100%	1e-149	99.30%	gii194762021 EU714973.1
Bartonella cooperplainsensis strain AUST/NH20 RNA polymerase beta-subunit (rpoB) gene, partial cds	540	540	100%	1e-149	99.30%	gii159137660 EU111792.1

4 pav. *H. affinis* utėlės mėginio pagausintos *rpoB* geno nukleotidų sekos palyginimo rezultatai naudojant *BLAST* programą iš NCBI Genų Banko.

Palyginus nusekvenuotas *rpoB* geno sekas su *NCBI* Genų Banke esančiomis sekomis sudarytas filogenetinis medis (5 pav.). Medžiui sudaryti panaudotos 8 šiame tyrime nustatytos sekos ir 10 Genų Banke rastų sekų. Patikrinus tinkamiausią metodą medžio sudarymui pasirinktas *Hasegawa-Kishino-Yano* parametrų modelis su Gama paskirstymu atliktas didžiausio tikėtimumo metodu. Pavaizduotas *B. cooperplainsensis*, *B. taylorii*, *B. grahamii* ir *Candidatus B. rudakovii* filogenetinis giminiškumas su tyrimo metu nustatytomis sekomis.

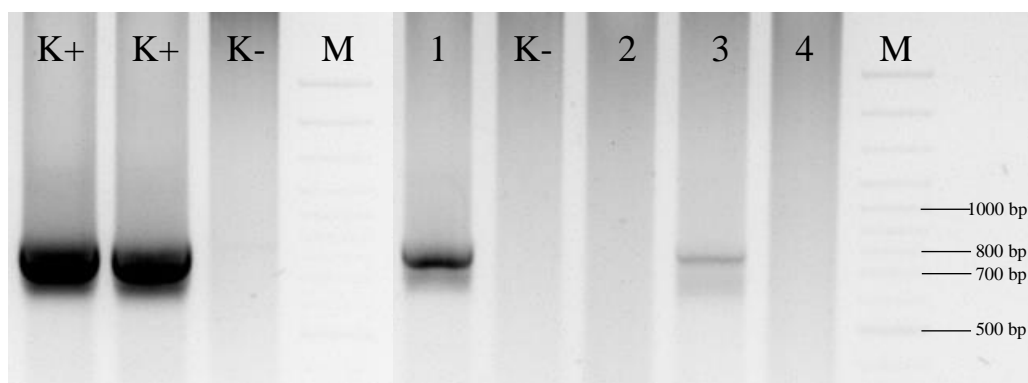


5 pav. *Bartonella* spp. *rpoB* geno sekų filogenetinis medis. Didžiausias tikėtinumo (angl. *Maximum composite likelihood*) metodas, *Hasegawa-Kishino-Yano* parametrų modelis su Gama paskirstymu.

Ant šakų skaičiais užrašytos bootstrap reikšmės, gautos naudojant 500 įkėlų. Skalė 0.20 nurodo genetinį atstumą. ▲ - *H. affinis* A. agrarius mėginiai, ■ - *H. affinis* A. flavicollis mėginiai.

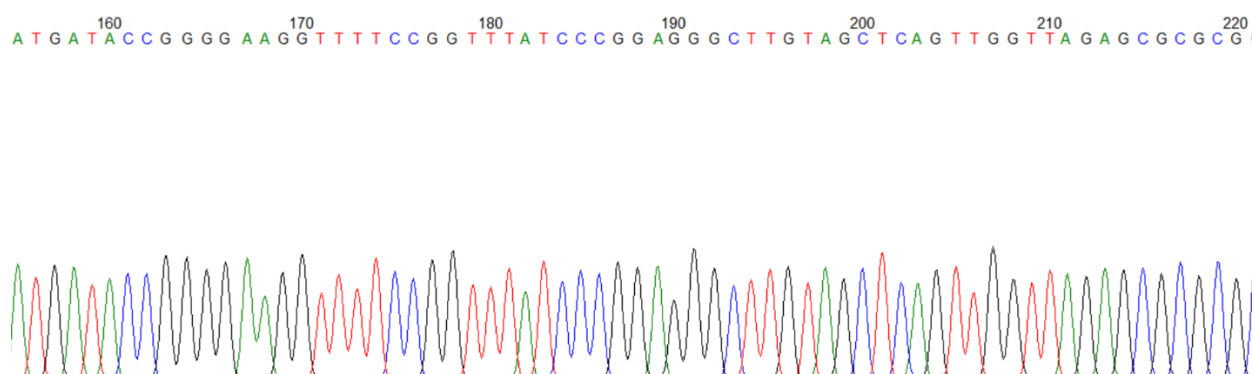
3.2. *Bartonella* ITS regiono analizė

Bartonella spp. ITS regiono sekų gausinimas buvo atliktas su 37 utėlių DNR mėginiais kaip ir *rpoB* geno fragmento gausinime. Po lizdinės PGR atliktas fragmentų vizualizavimas elektroforezės metodu parodytas 5 paveikslėlyje. Lyginant teigiamų kontrolių (K+) šviečiančius fragmentus su 1 ir 3 šulinėliais, matoma, jog šviečiantys fragmentai išsidėstę tame pačiame aukštyje. Pagal 100 bp molekulinį žymeklį šviečiantys fragmentai kartu su teigiamomis kontrolėmis yra išsidėstę ties 800 bp, todėl 2 paveikslo 1 ir 3 DNR mėginius vertinome kaip galimai teigiamus rezultatus, parodančius *Bartonella* ITS regiono pagausinimą. ITS regiono sekų ilgis skiriasi kiekvienoje rūšyje, todėl elektroforezės neužtenka, svarbu atlikti sekoskaitą (Kaewmongkol, 2012). Atlikus visų 37 mėginių fragmentų vizualizaciją po lizdinės PGR ITS regiono pagausinimo buvo gauti teigiami rezultatai tik 6 iš 37 tirtų mėginių. 5 mėginiai priklauso *H. affinis* utėlėms ir 1 mėginys *P. serrata* utėlėms. Dviejų žingsnių lizdinė PGR yra jautresnis metodas už vieno žingsnio ir tikro laiko PGR, todėl tai galėjo nulėmti, jog teigiamų rezultatų buvo gauta mažiau.



6 pav. Gelio nuotrauka po elektroforezės. M raidėmis pažymėti *GeneRuler*TM 100 bp molekulinės masės žymenys, 1-4 skaičiais pažymėti DNR mėginiai, K+ pažymėtos teigiamos kontrolės, 1 ir 3 – teigiami rezultatai.

Atlikus visų amplifikuotų ITS regiono fragmentų sekoskaitą gautos 6 sekos (6 pav.). Sutvarkius sekas, atlikta atitinkančių sekų paieška *NCBI* genų banke. 3 nusekvenuotos ITS regiono nukleotidų sekos 99,76 % identiškos duomenų bazėje rastai *B. tribocorum* rūšies sekai (*GenBank* priėjimo numeris MH687379.1) iš Lietuvoje sugauto *Apodemus agrarius* graužiko (7 pav.). E vertė yra 0, todėl žinoma, jog sekos negalėjo sutapti atsitiktinai. 2 iš palyginamų sekų buvo gautos iš *H. affinis* utėlių, 1 seka gauta iš *P. serrata* utėlių mėginių. Kitų 3 ITS geno fragmento nukleotidų sekų 98,37 % identiškumas duomenų bazėje nustatytas su *B. coopersplainsensis* (*GenBank* priėjimo numeris EU111770.1) iš Australijoje sugautos žiurkės. Sekų E vertė 0, todėl vertinama, kad yra labai maža tikimybė, jog sekos galėjo sutapti atsitiktinai. Visos 3 sekos gautos iš *H. affinis* utėlių mėginių, priklausančių 2 *A. agrarius* graužikams iš tos pačios vietovės.

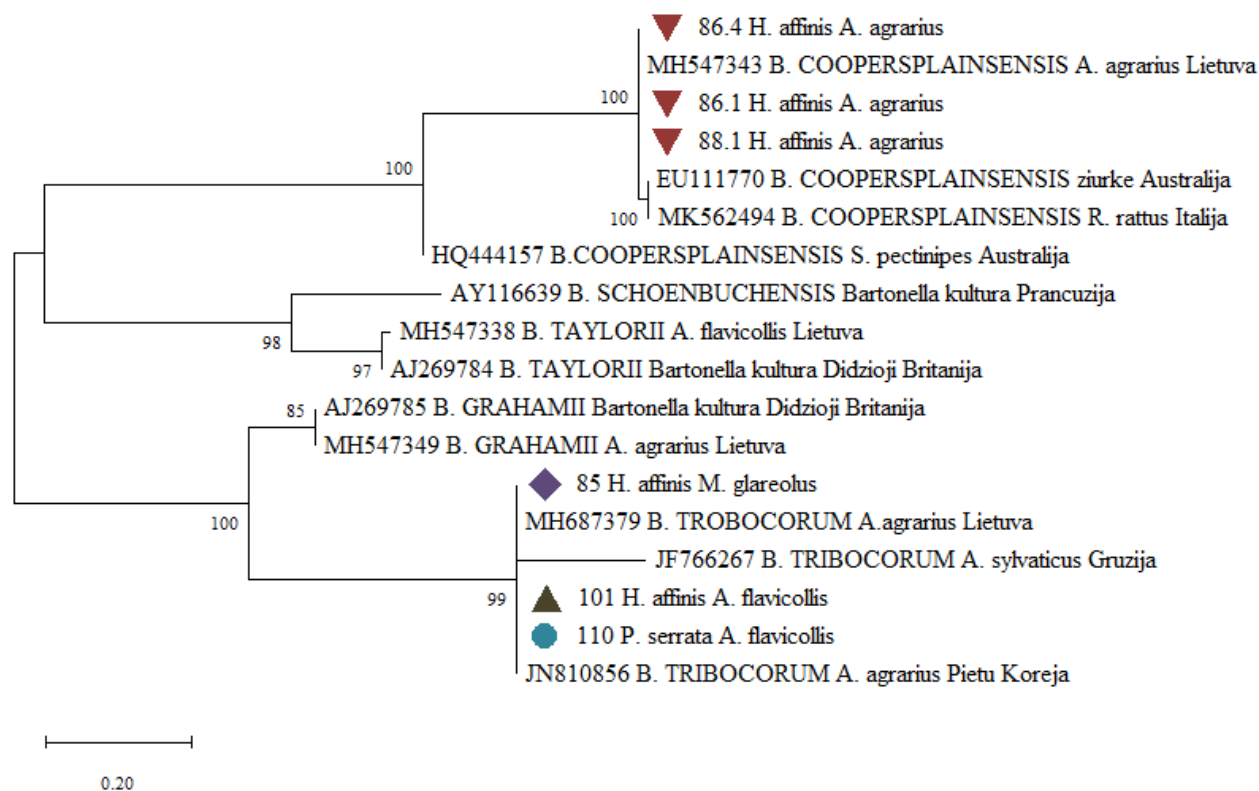


7 pav. Nusekvenuota *Bartonella* ITS regiono seka.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Bartonella tribocorum strain 2015-373 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	806	806	98%	0.0	99.76%	gii1551511296IMH687379.1
Bartonella tribocorum isolate KBGT9 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	490	490	59%	2e-134	100.00%	gii361072972JN810856.1
Candidatus Bartonella thailandensis clone 1 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	414	414	92%	3e-111	85.96%	gii238516706JFJ411484.1
Bartonella queenslandensis strain AUST/NH15 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	410	410	96%	4e-110	85.95%	gii159137636IEU111769.1
Uncultured Bartonella sp. clone ApoSilv-68 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	402	402	88%	8e-108	86.34%	gii345540833JN403039.1
Bartonella tribocorum strain ApoSilv-B29907 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	398	398	88%	1e-106	86.08%	gii345540777JF766267.1
Uncultured Bartonella sp. clone ApoSilv-67 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	396	396	88%	4e-106	86.08%	gii345540833JN403038.1
Uncultured Bartonella sp. clone ApoSilv-65 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	396	396	88%	4e-106	86.08%	gii345540831JN403037.1
Bartonella sp. SE-Bart-D 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	394	394	92%	2e-105	86.42%	gii73765413IDQ166944.1
Bartonella queenslandensis strain AUST/NH8 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	392	392	96%	6e-105	85.24%	gii159137636IEU111767.1

8 pav. *H. affinis* utėlės mėginio pagausintos ITS regiono nukleotidų sekos palyginimo rezultatai naudojant *BLAST* programą iš NCBI Genų Banko.

Filogenetiniam ryšiui pavaizduoti nusekvenuotos ITS regiono sekos ir *NCBI* Geno Banko sekos sulyginotos ir nupieštas filogenetinis medis (9 pav.). Medyje pavaizduotos 6 šiame tyrime nustatytos sekos ir 12 Genų Banke rastų sekų. Atlikus tinkamiausio metodo patikrą pasirinktas *Hasegawa-Kishino-Yano* parametrų modelis su Gama paskirstymu, kuris atliktas didžiausio tikėtimumo metodu. Pasirinkta pavaizduoti *B. coopersplainsensis*, *B. schoenbuchensis*, *B. taylorii*, *B. grahamii* ir *B. tribocorum* filogenetinis giminiškumas su tyrimo metu nustatytomis sekomis.



9 pav. *Bartonella* spp. ITS regiono sekų filogenetinis medis. Didžiausias tikėtimumo (angl. *Maximum composite likelihood*) metodas, *Hasegawa-Kishino-Yano* parametrų modelis su Gama paskirstymu. Ant šakų skaičiais užrašytos bootstrap reikšmės, gautos naudojant 500 įkėlų. Skalė 0.20 nurodo genetinį atstumą. ▼ - *H. affinis* *A. agrarius* mėginiai, ◆ - *H. affinis* *M. glareolus*, ▲ - *H. affinis* *A. flavicollis*, ● - *P. serrata* *A. flavicollis* mėginiai.

3.3. *Bartonella* rūšių paplitimas utelėse

Šio darbo tyrimo metu identifikuota 14 *Bartonella* sekų iš 11 utėlių mėginių, priklausančių *H. affinis* ir *P. serrata*. *RpoB* geno analizėje identifikuotos 8 sekos iš 8 utėlių mėginių, ITS regiono analizėje identifikuotos 6 sekos iš 6 mėginių. 3 *rpoB* geno analizėje ir 3 ITS regiono analizėje identifikuotos sekos gautos iš tų pačių 3 utėlių mėginių. Nustatyta, kad 2 utėlių rūšys užsikrėtusios 3 rūšių *Bartonella* bakterijomis. 10 *H. affinis* utėlių mėginių nustatytas užsikrėtimas *B. coopersplainsensis*, *B. taylorii* ir *B. tribocorum*. 1 *P. serrata* mėginyje nustatytas užsikrėtimas *B. tribocorum*. Rezultatai rodo, kad iš tirtų 6 rūšių utėlių, *B. tribocorum* paplitusi tarp 2, *H. affinis* ir *P. serrata*, utėlių rūšių, o *B. coopersplainsensis* ir *B. taylorii* tik 1 rūšies (*H. affinis*) utelėse (16 lentelė). Užsikrėtusios utelės surinktos iš *A. agrarius*, *A. flavicollis* ir *M. glareolus* graužikų.

16 lentelė. Identifikuotos *Bartonella* rūšys utėlėse.

Utėlių rūšis	Mėginių skaičius	Identifikuota <i>Bartonella</i> rūšis
<i>Huebneria affinis</i>	10	<i>B. cooperplainsensis</i> , <i>B. taylorii</i> , <i>B. tribocorum</i>
<i>Pyroteuthis serrata</i>	1	<i>B. tribocorum</i>

Literatūroje aprašytų *B. cooperplainsensis* užsikrėtimų utėlėse Europoje nėra, tačiau rastas 2015 metais atliktas tyrimas, kurio metu *B. cooperplainsensis* nustatyta *Polyplax* spp. ir *Hoplopleura* spp. utėlėse, surinktose Tailande (Klangthong, ir kt., 2015). Europoje *B. cooperplainsensis* pirmą kartą nustatyta graužikuose Graikijoje 2011 metais (Papadogiannakis ir kt., 2017). 2015-2016 metais atlikti tyrimai Lietuvoje su *A. agrarius* graužikais, pirmą kartą Lietuvos regione nustatė užsikrėtimą *B. cooperplainsensis* (Mardosaitė-Busaitienė, 2019). Atlikus mokslinės literatūros analizę nepavyko rasti aprašytų tyrimų, kurių metu Slovakijoje būtų nustatyta *B. cooperplainsensis* utėlėse arba kituose šeimininkuose, todėl manoma, kad tai pirmasis kartas, kai ši rūšis identifikuota Slovakijoje. Šiame darbe nustatytas *H. affinis* utėlių užsikrėtimas *B. cooperplainsensis*, tačiau mokslinėje literatūroje nebuvo rasta atitinkančių kitų tyrimų rezultatų.

Utėlių užsikrėtimas *B. tribocorum* aprašytas Reeves ir kt. (2006), kurie *B. tribocorum* identifikavo 2003 metais Egipte surinktose *P. spinulosa* utėlėse. 2010 metais paskelbtuose tyrimuose taip pat *Polyplax* rūšies utėlėse nustatytas užsikrėtimas *B. tribocorum* Taivane (Tsai ir kt., 2010). Šiame darbe nustatytų *H. affinis* ir *P. serrata* užsikrėtimų *B. tribocorum* nėra aprašytų literatūroje.

Eva Špitalská ir kt. (2017) atlikti tyrimai su mažais žinduoliais surinktais Pietinėje Slovakijos dalyje nustatė *B. taylorii* *M. arvalis* graužikų bluznių mėginiuose. 2010-2011 metais atlikti tyrimai parodė užsikrėtimą *B. taylorii* mažuose žinduoliuose, erkėse ir blusose, surinktuose Vokietijoje (Silaghi ir kt., 2016). Aprašytas utėlių užsikrėtimas *B. taylorii* literatūroje nebuvo rastas.

Gauti tyrimo rezultatai ir literatūroje rasti aprašyti tyrimų rezultatai leidžia teigti, kad *B. cooperplainsensis*, *B. taylorii* ir *B. tribocorum* rūšys yra paplitusios tarp *H. affinis*, *P. serrata*, *P. spinulosa*, *Polyplax* spp. ir *Hoplopleura* spp. utėlių, tačiau aprašytų tyrimų skaičius visame pasaulyje, ypač Europoje, yra labai mažas.

IŠVADOS

1. Atlikus vieno žingsnio polimerazės grandininę reakciją su 37 utėlių mėginiais pagausintos 8 *Bartonella rpoB* geno sekos. Atlikus sekų analizę nustatytos *B. coopersplainsensis* ir *B. taylorii* rūšys.
2. Atlikus lizdinę polimerazės grandininę reakciją su 37 utėlių mėginiais pagausintos 6 *Bartonella* ITS regiono sekos. Atlikus sekų analizę nustatytos *B. coopersplainsensis* ir *B. tribocorum* rūšys.
3. *H. affinis* utėlėse nustatytas užsikrėtimas *B. coopersplainsensis*, *B. tribocorum* ir *B. taylorii*. *P. serrata* utėlėse nustatytas užsikrėtimas *B. tribocorum*. Užsikrėtusios utėlės surinktos iš *A. agrarius*, *A. flavicollis* ir *M. glareolus* graužikų.

LITEARTŪRA

1. Abu Shtaya A., Perek S., Kibari A., Cohen, S. *Bartonella henselae* endocarditis: a usual presentation of an unusual disease. *European Journal of Case Reports In Internal Medicine*, 6(3). 2019. http://doi.org/10.12890/2019_001038
2. Akram S. M., Rawla P. *Bacillary Angiomatosis*. (2019). Florida: StatPearls Publishing. [žiūrėta 2019-05-06] Prieiga per internetą <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448092/>
3. Alsmark C. M., Frank A. C., Karlberg E. O., Legault B.-A., Ardell D. H., Canbäck B., Eriksson A.-S., Näslund A. K., Handley S. A., Huvet M., La Scola B., Holmberg M., Andersson S. G. E. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26). 2004, p. 9716-9721. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305659101>
4. Ambrasienė D. *Molekulinės biologijos praktikumas: mokymo priemonė*. Kaunas: Vytauto Didžiojo universitetas, 2008. ISBN- 9789955123859
5. Anstead G. M. The centenary of the discovery of trench fever, an emerging infectious disease of World War 1. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(8). 2016. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30003-2](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30003-2)
6. Baranowski K., Huang B. *Cat Scratch Disease*. (2019). Florida: StatPearls Publishing. [žiūrėta 2020-05-06]. Prieiga per internetą <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482139/>
7. Birtles R.J., Harrison T.G., Saunders N.A., Molyneux D.H. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1). 1995, p. 1-8. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-1>

8. Bonilla D. L., Kabeya H., Henn J., Kramer V. L., Kosoy M. Y. *Bartonella quintana* in Body Lice and Head Lice from Homeless Persons, San Francisco, California, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 15(6). 2009. <http://doi.org/10.3201/eid1506.090054>
9. Breitschwerdt E. B., Kordick D. L. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3). 2000, p. 428-38. <http://doi.org/10.1128/cmr.13.3.428-438.2000>
10. Brenner D.J., O'Connor S.P., Winkler H.H., Steigerwalt A.G. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(4). 1993, p. 777. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-4-777>
11. Brzewski P., Kwiecińska M., Sułowicz J., Podolec K., Obtulowicz A., Dyduch G., Wojas-Pelc A. Bacillary Angiomatosis in Renal Transplant Recipient: A Case Report. *Transplantation Proceedings*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2020.02.092>
12. Chang C.C., Chomel B.B., Kasten R.W., Heller R.M., Ueno H., Yamamoto K., Bleich V.C., Pierce B.M., Gonzales B.J., Swift P.K., Boyce W. M., Jang S. S., Boulouis H.-J., Piémont Y. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerging Infectious Diseases*, 6(3). 2000, p. 306–311. https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/6/3/00-0313_article
13. Chomel B. B., Boulouis H. J., Maruyama S., Breitschwerdt E. B. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerging Infectious Diseases*, 12(3). 2006, p. 389-394. <http://doi.org/10.3201/eid1203.050931>
14. Clemente N. S., Ugarte-Gil C., Solorzano N., Maguiña C., Moore D. An Outbreak of *Bartonella bacilliformis* in an Endemic Andean Community. *PLOS ONE*, 11(3). 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150525>

15. Dabkevičius Z. *Mikrobiologijos ir bakteriologijos pagrindai*. Šiauliai: Šiaulių universiteto leidykla, 2008. p. 69–72. ISBN 9789986389330
16. Diddi K., Chaudhry R., Sharma N., Dhawan B. Strategy for identification & characterization of *Bartonella henselae* with conventional & molecular methods. *Indian Journal of Medical Research*, 137(2). 2013, p. 380-387. PMID: 23563383
17. Drancourt M., Mainardi J. L., Brouqui P., Vandenesch F., Carta A., Lehnert F., Etienne J., Goldstein F., Acar J., Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* Endocarditis in Three Homeless Men. *The New England Journal of Medicine*, 332. 1995, p. 419-423.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199502163320702>
18. Drancourt M., Tran-Hung L., Courtin J., Lumley H.D., Raoult D. *Bartonella quintana* in a 4000-year-old human tooth. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(4). 2005, p. 607-611.
<https://doi.org/10.1086/427041>
19. Garcia-Quintanilla M., Dichter A. A., Guerra H., Kempf V. A. J. Carrion's disease: more than a neglected disease. *Parasites Vectors*, 12. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3390-2>
20. Gomes C., Ruiz J. Carrion's Disease: the Sound of Silence. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1). 2017. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-17>
21. Goncalves L. R., Rodrigues de Mendonça Favacho A., Rodrigues Roque A. L., Mendes N. S., Luiz Fidelis Junior O., Benevenuto J. L., Herrera H. M., D'Andrea P. S., Sampaio de Lemos E. R., Machado R. Z., André M. R. Association of *Bartonella* species with wild and synanthropic rodents in different Brazilian biomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24). 2016, p. 7154–7164. <http://doi.org/10.1128/AEM.02447-16>
22. Gundi V. A., Taylor C., Raoult D., La Scola B. *Bartonella rattaaustraliansi* sp. nov., *Bartonella queenslandensis* sp. nov. and *Bartonella coopersplainsensis* sp. nov., identified in Australian rats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(12). 2009, p. 2956-2961. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002865-0>

23. Guptill L. Bartonellosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4). 2010, p. 347–359.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.011>
24. Gutierrez R., Krasnov B., Morick D., Gottlieb Y., Khokhlova I. S., Harrus S. *Bartonella* infection in rodents and their flea ectoparasites: an overview. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 15. 2015, p. 27–39. <http://doi.org/10.1089/vbz.2014.1606>
25. Heller R., Riegel P., Hansmann Y., Delacour G., Bermond D., Dehio C., Lamarque F., Monteil H., Chomel B., Piémont Y. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(4). 1998, p. 1333-1339. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1333>
26. Hicks L. D., Minnick M. F. Human vascular endothelial cells express epithelial growth factor in response to infection by *Bartonella bacilliformis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(4). 2020, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008236>
27. Huarcaya E., Maguiña C., Torres R., Rupay J., Fuentes L. *Bartonellosis* (Carrion's Disease) in the pediatric population of Peru: an overview and update. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(5). 2004, p. 331-339. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702004000500001>
28. Jensen W.A., Fall M.Z., Rooney J., Kordick D.L., Breitschwerdt E.B. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5). 2000, p. 1717–1722.
29. Jiyipong T., Jittapalapong S., Morand S., Rolain J-M. *Bartonella* species in small mammals and their potential vectors in Asia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(10). 2014, p. 757-767. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C742>
30. Kaewmongkol G. Detection and characterization of *Bartonella* species in Western Australia. PhD thesis. School of Veterinary and Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, Murdoch University, Perth, Western Australia. 2012.
31. Kim J.H., Previte D.J., Yoon K.S., Murenzi E., Koehler J.E., Pittendrigh B.R., Lee S.H., Clark J.M. Comparison of the Proliferation and Excretion of *Bartonella quintana* between Body and

- Head Lice Following Oral Challenge. *Insect Molecular Biology*, 26(3). 2017, p. 266-276.
<https://doi.org/10.1111/imb.12292>
32. Klangthong K., Promstaporn S., Leepitakrat S., Schuster A. L., McCardle P. W., Kosoy M., Takhampunya R. The Distribution and Diversity of *Bartonella* Species in Rodents and Their Ectoparasites across Thailand. *PloS one*, 10(10). 2015.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140856>
33. Klotz S. A., Ianas V., Elliott S. P. Cat-scratch Disease. *American Family Physician*, 83(2). 2011, p. 152-155. PMID: 21243990
34. Lietuvos hidrometeorologijos tarnyba. El Nino-La Nina. [žiūrėta 2020-05-07]. Prieiga per internetą <http://www.meteo.lt/ivairenybes/el-nino-la-nina>
35. Madden T. *The BLAST Sequence Analysis Tool*. In: *The NCBI Handbook [Internet]*. 2nd edition. 2013. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). [žiūrėta 2020-06-3] Prieiga per internetą: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153387/#_NBK153387_pubdet
36. Maillard R., Riegel P., Barrat F., Bouillin C., Thibault D., Gandoin Ch., Halos L., Demanche Ch., Alliot A., Guillot J., Piémont Y., Boulouis H.-J., Vayssier-Taussat M. *Bartonella chomelii* sp. nov., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1). 2004, p. 215–220.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02770-0>
37. Mardosaitė-Busaitienė D., Radzijeuskaja J., Balčiauskas L., Bratchikov M., Jurgelevičius V., Paulauskas A. Prevalence and diversity of *Bartonella species* in small rodents from coastal and continental areas. *Scientific Reports* 9. 2019, 12349. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48715-y>
38. Markowicz M., Käser S., Müller A., Lang G., Lang S., Mayerhöfer M., Stanek G., Rieger A. Bacillary angiomatosis presenting with facial tumor and multiple abscesses. *Medicine*, 95(28). 2016. <http://doi.org/10.1097/MD.0000000000004155>

39. McGinnis S., Madden T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 32(2). 2004, p. 20–25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
40. Minnick M. F., Anderson B. E. Bartonella. Chapter 105. In: Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, J. Schwartzman, editors. *Molecular Medical Microbiology, Second Edition*. London: Academic Press; 2014. pp. 1911–1939. doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00105-0
41. Newman L., Duffus A.L. J., Lee C.. Using the Free Program MEGA to Build Phylogenetic Trees from Molecular Data. *The American Biology Teacher*, 78(7). 2016, p. 608–612. doi: <https://doi.org/10.1525/abt.2016.78.7.608>
42. Okaro U., Addisu A., Casanas B., Anderson B. *Bartonella* species, an emerging cause of blood-culture-negative endocarditis. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3). 2017, p. 709–746. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-17>
43. Papadogiannakis E., Spanakos G., Kontou I., Kontos V., Velonakis E., Sklivas D., Koutis C. First identification of *Bartonella coopersplainsensis* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 62(3). 2017, p. 212-215. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14851>
44. Pons M. J., Lovato P., Silva J., Urteaga N., Mendoza J. del Valle, Ruiz J.. Carrion's disease after blood transfusion. *Blood Transfusion*, 14(6). 2016, p. 527-530. <https://doi.org/10.2450/2015.0036-15>
45. Promrangsee C., Khositharattanakool P., Somwang P., Sunantaraporn S., Phumee A., Preativatanyou K., Tawatsin A., Brownell N., Siriyasatien P. The Prevalence of *Bartonella* Bacteria in Cattle Lice Collected from Three Provinces of Thailand. *MDPI Insects*, 10(6). 2019, 152; <https://doi.org/10.3390/insects10060152>
46. Reeves W. K., Szumlas D. E., Moriarity J. R., Loftis A. D., Abbassy M. M., Helmy I. M., Dasch G. A. Louse-borne bacterial pathogens in lice (*Phthiraptera*) of rodents and cattle from

- Egypt. *The Journal of parasitology*, 92(2). 2006, p. 313–318. <https://doi.org/10.1645/GE-717R.1>
47. Renesto P., Gouvernet J., Drancourt M., Roux V., Raoult D. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2). 2001, 430–437.
48. Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubálek Z., Földvári G., Plantard O., Vayssier-Taussat M., Bonnet S., Špitalská E., Kazimírová M. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Frontiers in Public Health*, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251>
49. Saisongkorh W., Wootta W., Sawanpanyalert P., Raoult D., Rolain J.-M.. "*Candidatus Bartonella thailandensis*": A new genotype of *Bartonella* identified from rodents. *Veterinary microbiology*, 139(1-2). 2009, p. 197-201. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.05.011>
50. Sato S., Brinkerhoff R. J., Hollis E., Funada S., Shannon A. B., Maruyama S. Detection of Zoonotic *Bartonella* Pathogens in Rabbit Fleas, Colorado, USA. *Emerging infectious diseases*, 26(4). 2020, p. 778–781. <https://doi.org/10.3201/eid2604.191161>
51. Shorbatli L. A., Koranyi K. I., Nahata M. C. Effectiveness of antibiotic therapy in pediatric patients with cat scratch disease. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 40. 2018, p. 1458–1461. <http://doi.org/10.1007/s11096-018-0746-1>
52. Silaghi C., Pfeffer M., Kiefer D., Kiefer M., Obiegala A.. *Bartonella*, Rodents, Fleas and Ticks: a Molecular Field Study on Host-Vector-Pathogen Associations in Saxony, Eastern Germany. *Microbial Ecology*, 72. 2016, p. 965–974. <http://doi.org/10.1007/s00248-016-0787-8>
53. Szewczyk T., Werszko J., Steiner-Bogdaszewska Ż., Jeżewski W., Laskowski Z., Karbowski G. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. *Parasites and Vectors*, 10(1). 2017. <doi:10.1186/s13071-017-2413-0>

54. Smith D. A., Nehring S. M. *Bacteremia*. (2019). Florida: StatPearls Publishing. [žiūrėta 2020-05-03]. Prieiga per internetą https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441979/#_NBK441979_pubdet
55. Smitherman L. S., Minnick M. F. *Bartonella bacilliformis* GroEL: effect on growth of human vascular endothelial cells in infected cocultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063. 2005, p. 286-298. <https://doi.org/10.1196/annals.1355.046>
56. Spach D. H., Kanter A. S., Dougherty M. J., Larson A. M., Coyle M. B., Brenner D. J., Swaminathan B., Matar G. M., Welch D. F., Root R. K., Stamm W. E. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* Bacteremia in Inner-City Patients with Chronic Alcoholism. *The New England Journal of Medicine*, 332. 1995, p. 424-428. <http://doi.org/10.1056/NEJM199502163320703>
57. Stanczak J., Racewicz M., Kubica-Biernat B., Kruminis-Lozowska W., Dabrowski J., Adamczyk A., Markowska M. Prevalence of *Borrelia Burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in different Polish woodlands. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.*, 6(2). 1999, p. 127-132.
58. Stoler M. H., Bonfiglio T. A., Steigbigel R. T., Pereira M. An Atypical Subcutaneous Infection Associated with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *American Journal of Clinical Pathology*, 80(5). 1983, p. 714–718. <https://doi.org/10.1093/ajcp/80.5.714>
59. Tsai Y. L., Chuang S. T., Chang C. C., Kass P. H., Chomel B. B. *Bartonella* species in small mammals and their ectoparasites in Taiwan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(4). 2010, p. 917-923. <doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0083>
60. Vijayan Genitha Helan J.N., Grinberg A., Gedye K., Potter M.A., Harrus S. Molecular detection of *Bartonella coopersplainsensis* and *B. henselae* in rats from New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 66(5). 2018, p. 257-260. <http://doi.org/10.1080/00480169.2018.1483781>

61. Vos M., Quince C., Pijl A. S., de Hollander M., Kowalchuk G. A. A comparison of *rpoB* and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PloS one*, 7(2). 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030600>
62. Wright T. S. Some notes on Trench fever. *British Medical Journal*, 2(2900). 1916, p. 136-138. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.3420.176-a>
63. Žukauskaitė-Šarapajevienė S., Čaplinskas S., Zagrebnevienė G. (2015). *Utėlių platinamų ligų profilaktika. Metodinės rekomendacijos*. Vilnius: Užkrečiamųjų Ligų ir AIDS Centras. ISSN 2029-8617. [žūrėta 2020-05-01]. Prieiga per internetą http://www.ulac.lt/uploads/downloads/leidiniai_2016/uteliu_mr_2017.pdf