

## Erkinio encefalito virusų potipių identifikavimas Iksodinėse erkėse Lietuvoje

Marina Sidorenko, Jana Radzijeuskaja, Algimantas Paulauskas

Vytauto Didžiojo Universitetas

Pagal užkrečiamųjų ligų ir AIDS centro duomenis Lietuvoje erkinio encefalito (EE) registruotų atvejų didėja kiekvienais metais. EE atvejų aptinkama visose Lietuvos apskrityse. Viena iš pagrindinių EE sergamumo didėjimo priežasčių yra globalinis klimato atšilimas, dėl ko pailgėjo erkių aktyvumo periodas bei jų išplitimas į naujus arealus. Yra dvi pagrindinės erkių rūšys EE viruso nešiotojos: *Ixodes persulcatus* ir *Ixodes ricinus*. Žinoma, kad Lietuvoje paplitusi *I. ricinus* erkių rūšis ir aptiktas europietiškas (Vakarų) viruso potipis. *I. persulcatus* yra sibirietiškojo ir Tolimųjų Rytų viruso potipių nešiotojos ir jos nėra būdingos mūsų regionui.

Kadangi *I. persulcatus* rūšies erkės yra paplitusios šalyse, besiribojančiose su Lietuva (Latvija, Lenkija, Baltarusija, Rusija), manoma, kad šios rūšies erkių atsirado ir Lietuvoje. Šio tyrimo tikslas yra ištirti dabartinio EE viruso paplitimo *Ixodidae* erkėse Lietuvoje, nustatyti surinktų erkių rūšis ir nustatyti viruso potipius.

2017 metų kovo - rugsėjo mėnesiais buvo surinktos 1884 erkės iš aštuonių Lietuvos apskričių, 18 rajonų. RNR buvo išskirta iš erkių suspensijų, naudojant RNR išskyrimo rinkinį Isolate II RNA Mini Kit (Bioline, Hilden, Germany). Visi mėginiai buvo tiriami siekiant nustatyti EE virusą ir tikrinami tikro laiko atvirkštinės transkriptazės polimerazinę grandininę reakciją (TL-AT-PGR).

Surinktos erkės buvo identifikuotos kaip *I. ricinus* ir *Dermacentor reticulatus*. EE virusas buvo nustatytas Akmenės rajone. NS3 geno sekų genetinis apibūdinimas parodė, kad štamai priklauso europetiskam potipiui.

*Erkinis encefalitas, Ixodes ricinus, Ixodes persulcatus, sergamumas, erkinio encefalito virusas*

### Įvadas

Erkinis encefalitas (EE) yra erkių platinama virusinė židininė liga. Tai viena iš labiausiai pavojingų žmogaus infekcijų. Erkinio encefalito virusas (EEV) veikia centrinę nervų sistemą, pagrindiniai pilkąją smegenų ir (arba) nugaros smegenų dalį ir gali pasireikšti visų amžiaus grupių žmonėms. EEV priklauso Flavivirus rūšiai, Flaviviridae šeimai (Radvilavičienė et al., 2011) ir apima tris pogrupius: Europos (EEV-Eur), Sibiro (EEV-Sib) ir Tolimųjų Rytų (EEV-FE). EE epidemiologija glaudžiai susijusi su iksodinių erkių ekologija ir biologija. Pagrindiniai EEV vektoriai Europoje yra *Ixodidae* šeimos erkės (Dugės 1834), daugiausia *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) ir *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) (Suss, 2011, Pettersson, 2014). EEV-Eur dažniausiai perduoda erkės *I. ricinus* rūšies o EEV-Sib ir EEV-FE potipius erkės *I. persulcatus* rūšies (Jääskeläinen et al., 2011). Nustatyta, kad *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) taip pat dalyvauja EEV cirkuliacijoje (Wójcik-Fatla, 2011).

Pastaraisiais metais EEV pasiskirstymo diapazonas plečiasi, EE ligos atvejų ir toliau didėja (Amicizia et al., 2013). Šiandien EE yra endemiškas 27 Europos šalyse, Tolimuosiuose Rytuose ir kitose Azijos šalyse ir tapo tarptautine visuomenės sveikatos problema. Lietuva yra endeminė EE šalis, kurioje užregistruota daugiausiai EE atvejų Europoje. EE paplitęs visose Lietuvos apskrityse. Privaloma šios ligos registracija šalyje pradėta 1968 m., tačiau EE ypač aktualia visuomenės sveikatos problema Lietuvoje tapo nuo 1993 metų (Žygutienė, 1999). Remiantis Lietuvos užkrečiamųjų ligų ir AIDS centro duomenimis, neįprastai padidėjo EE atvejų skaičius 2016 m. Buvo pranešta apie 632 hospitalizuotus atvejus, palyginimui - 2015 m. užregistruoti 336 hospitalizuoti atvejai. Tai reiškia, kad sergamumas padidėjo daugiau nei 95%. Tokio didelio erkių encefalito atvejų skaičiaus Lietuvoje nebuvo nuo 2003 m., kai buvo užregistruota 21,96 atvejo 100 000 gyventojų, o 2006 m. EE paplitimas buvo užregistruotas 21,91 atvejo 100000 gyventojų, tuo

tarpu EE vidutinis paplitimas yra 5 atvejai 100 000 gyventojų.

Viena iš pagrindinių EE paplitimo priežasčių - globalinis atšilimas, dėl ko pailgėjo erkių aktyvumo periodas ir padidėjo jų išplitimo diapazonas į naujus arealus. Lietuvoje daugiausia egzistuoja dviejų rūšių erkės - *I. ricinus* ir *D. reticulatus*. *I. persulcatus* nėra būdingas, bet šios rūšies erkių paplitimas didėja ir Lietuvoje.

### Metodika

**Erkių rinkimas.** 2017 metų kovo - rugsėjo mėnesiais buvo surinkta 1884 erkės iš aštuonių Lietuvos apskričių, 18 vietovių (Pav. 1). Erkės buvo surinktos iš įvairių buveinių, įskaitant lapuočių, pušies, mišrių miško lapinių pakratų ir žolių, naudojant baltą 80X80 cm medvilninį flanelinį audinį. Iki atvežimo į laboratoriją gyvos erkės buvo laikomos mėgintuvėliuose ne ilgiau kaip 2 dienas, šaldymo krepšyje 4-6 °C temperatūroje išlaikant pakankamą drėgmę. Laboratorijoje erkės buvo suskirstytos į grupes pagal mėginių ėmimo vietą ir rūšį, klasifikuojamos pagal jų išsivystymo stadiją (lervos, nimfos, suaugusios erkės) ir lytį, naudojant mikroskopą. Erkės buvo suskirstytos į 267 grupes. 676 erkės (110 grupių) buvo identifikuotos kaip *I. ricinus*, 533 (108) kaip *D. reticulatus*, 454 (39) nimfos ir 221 (10) lervos (Lentelė 1). *D. reticulatus* buvo suskirstytos į grupes po 5 pateles arba patinus, *I. ricinus* 5-10 suaugusiųjų patelių arba patinų, 10-20 nimfų ir 30 lervų. Raktai (Fillipova, 1977; Hillyard, 1996) buvo naudojami jų morfologinių savybių nustatymui. *I. ricinus* taksonominiam identifikavimui buvo panaudotas PGR metodas su specifiniais Ixri F ir Ixri R pradmenimis, sukurtais A. Jenkins (A/S Telelab, Skien, Norvegija), remiantis sekomis iš Geno Banko (Fukunaga et al, 2000). Šis metodas pagrįstas būdingo *I. ricinus* erkių rūšiai 150 bp segmento 5.8S rRNR geno amplifikacija. Po identifikavimo ir suskirstymo į grupes, mėginiai buvo užšaldyti -80 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.



1 pav. Vietovės Lietuvoje kur buvo renkamos erkės 2017 m. kovo – rugsėjo mėn.  
Fig. 1. Locations of Lithuania where ticks were collected during March - September in 2017.

**RNR išskyrimas.** Laboratorijoje užšaldytos erkės buvo homogenizuojamos rankiniu būdu naudojant grūstuvę su grūstuvėliu ir skystą azotą. Erkės buvo sutrintos iki miltelių pavidalo. RNR ekstrakcija iš erkių grupių buvo atlikta naudojant RNR išskyrimo rinkinį Isolate II RNA Mini Kit (Bioline, London, UK) pagal gamintojo instrukcijas. RNR praskiedžiama 40 µL vandens be RNazės ir laikoma -20 °C temperatūroje, kol bus naudojama.

**EEV nustatymas.** EEV nustatymui buvo naudojama kiekybinė tikro laiko atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija (AT-PGR) su F-TBE1 ir R-TBE1 pradžienimis ir TBE-WT zondų, pagal Schwaiger ir Cassinotti protokolą (2003).

Tikro laiko AT PGR, kaip ir lizdinė PGR, buvo vykdomos ciklais pagal Katarginos ir kt. išdirbtą metodiką (Katargina et al., 2013). Tikro laiko AT-PGR reakcijos amplifikacijos buvo vykdoma 20 µl reakcijos tūryje, kuriame yra 5 µl kiekvieno mėginio RNR, 10 µl 2X reakcijos mišinio (Invitrogen, Anglija), reversinio ir forvardinio pradmenų po 0,5µl (2.5 pmol/µl), 1 µl (2 pmol/µl) TBE – WT zondo, distiliuoto H<sub>2</sub>O, 0.4µl RNR inhibitorius, 0.2µl atvirkštinės transkriptazės. PGR pradmenys buvo gausinami pagal protokolą ir vyko skirtingais ciklais: komplimentarinės DNR (cDNR) sintezė 47°C - 30 min., 2 ciklas denatūracija 94°C - 2 min., 3 ciklas – PGR produktų sintezė kartojama 45 kartus: 95°C-15 sec., 57°C-1 min. ir 47°C -30 sec. 7500 Fast Real Time PGR sistema (Applied Biosystems) buvo naudojama PGR reakcijai ir vizualizavimui.

Tikro laiko AT-PGR teigiami mėginiai buvo naudojami EEV NS3 geno fragmento (631 bp) pagausinimui. Lizdinė PGR reakcija buvo atlikta su išoriniais pradmenimis NS3 F1 ir NS3 R1 ir vidiniais pradmenimis NS3 F2 ir NS3 R2. AT – PGR reakcijai buvo paruoštas reakcijos mišinys, kurio apimtis 25 µl vienam

mėginiui. Reakcijos mišinys susideda iš 2X reakcijos mišinio (Invitrogen, Anglija), RNR inhibitoriaus 1 µl, atvirkštinės transkriptazės 0,5 µl, pradmenų po 0,2 µM, dd H<sub>2</sub>O ir RNR 5 µl. PGR reakcija buvo vykdoma ciklais: 1 ciklas - sintezė 50°C–30 min., denatūravimas 94°C–2 min., 3 ciklas – PRG produktų sintezė kartojama 40 kartų: 94°C–20 sec, 55°C–1 min., 68°C–1 min.; 4 ciklas prailginimas 68°C–5 min.

Lizdinė PGR amplifikacijai naudojome 50 µl bendro tūrio mišinį į kurį įeina 5x PGR buferis, Taq Mix 1 µl, pradmenys po 0,5 mM, dd H<sub>2</sub>O ir 5 µl DNR iš pirmos PGR reakcijos. PGR ciklai: denatūravimas 95°C–2 min., 30 kartų kartojamas hibridizacijos ciklas: 95°C-1 min., 55 °C–1 min., 72°C–1 min. ir pailginimas 72°C–10 min. Lizdinės reakcijos PGR produktai buvo paruošti sekoskaitai su Gene Jet Gel Extraction rinkiniu (Thermo scientific, Lithuania) pagal gamintojų instrukciją ir išsiųsti sekos nustatymui.

Gautos sekos buvo sulyginamos su genų sekomis, užregistruotomis Geno banko duomenų bazėje, naudojant MEGA 6 programą, naudojant BLAST server.

**Statistinė analizė.** EEV paplitimas erkėse buvo apskaičiuotas kaip minimalus infekcijos dažnis (*minimum infection rate (MIR)*). MIR skirtas apskaičiuoti užkrėstų individų dalį iš visų mėginių. Jis apskaičiuojamas kaip teigiamų grupių skaičiaus santykis su bendru patikrintų erkių skaičiumi. Pagrindinė MIR prielaida yra tai, kad teigiamoje grupėje yra nors viena užkrėsta erkė (Weidong et al., 2003).

$$MIR = (x/(mk)) 100\%,$$

kur k yra grupės dydis, m - bandymų skaičius, x - teigiamų grupių kiekis.

**1 lentelė.** Apskritys ir surinktų erkių skaičiai Lietuvoje 2017 m. kovo-rugsėjo mėnesiais  
**1 Table.** Counties and number of ticks collected in Lithuania during March - September in 2017

Apskritys	<i>Ixodes ricinus</i>			<i>Dermacentor reticulatus</i>	Viso
	Suaugusios erkės/pulai/teigiami pulai	Nimfos/pulai /teigiami pulai	Lervos/pulai /teigiami pulai	Suaugusios erkės/pulai/teigiami pulai	
Alytus	17/4/0			23/5/0	40/9/0
Kaunas	200/32/0	206/16/0	14/1/0	373/75/0	793/124/0
Klaipėda	17/3/0			9/2/0	26/5/0
Panevėžys	28/6/0	96/10/0	120/4/0	65/12/0	309/32/0
<b>Šiauliai</b>	<b>321/48/6</b>	<b>109/9/0</b>	<b>58/3/0</b>	<b>36/8/2</b>	<b>524/68/8</b>
Tauragė	27/5/0	43/4/0	29/2/0	9/3/0	108/14/0
Utena	28/5/0				28/5/0
Vilnius	38/7/0			18/3/0	56/10/0
Viso	676/110/6	454/39/0	221/10/0	533/108/2	1884/267/8

## Rezultatai

Šio tyrimo tikslas buvo ištirti dabartinio EEV paplitimo Ixodidae erkėse Lietuvoje, nustatyti surinktų erkių rūšis ir nustatyti viruso potipius. Tam 2017 metais buvo surinktos 1884 erkės, jos buvo suskirstytos į 267 pulus (1 lentelė). *I.persulcatus* rūšies erkių nebuvo aptikta. Pagal tikro laiko AT-PGR, EEV RNR buvo aptikta 8 mėginuose. 6 mėginiai su *I.ricinus* erkėmis (4 mėginiai su patelėmis ir 2 su patiniais) ir 2 mėginiai su *D.reticulatus* (1 mėginys su trimis patelėmis ir 1 mėginys su trimis patiniais). Visi teigiami mėginiai yra surinkti Šiaulių apskrityje, Akmenės rajone, Kivylių kaime. Iš viso 8 iš 68 šios apskrities grupių buvo užkrėsti ir minimalus EEV infekcijos dažnis tirtuose erkėse yra 1,52% (8/524) (*I.86% I.ricinus* ir *5,6% D.reticulatus*). Atlikus lizdinę PGR gausinami NS3 geną pavyko amplifikuoti tik 6 mėginius su *I.ricinus* erkėmis. NS3 geno sekų genetinė analizė parodė, kad štamai priklauso europiniam potipiui.

## Aptarimas ir Išvados

Europoje didžiausias sergamumo EEV rodiklis registruojamas Baltijos šalyse, Slovėnijoje ir Čekijos Respublikoje. Slovėnijoje registruojama apie 250 – 500 atvejų, EEV paplitimas buvo 0.54% - 2005 m. ir 0.43% - 2006 (Bogovoc et al., 2015), Čekijos Respublikoje kasmet pranešama apie 500-1000 atvejų (Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries, 2012). Lietuvoje kiekvienais metais užregistruojama 300–650 ligos atvejų.

Šiame tyrime buvo įvertintas EEV paplitimas erkėse, surinktuose iš aštuonių Lietuvos apskričių. Bendras užfiksuotas EEV infekcijos lygis Lietuvoje yra 0,42%, iš jų 0,32% sudarė *I.ricinus*. Panašūs rodmenys (0,30%) buvo užregistruoti 2009 m. kitų mokslininkų atliktuose tyrimuose (Katargina et al., 2013). EEV infekcijos lygis *I.ricinus* erkėse užregistruotas Latvijoje yra 1,07%, Estijoje - 1,55%. Kituose kaimyninėse šalyse bendras praneštas paplitimo dažnis Lenkijoje yra 0,21% (Katargina et al.,

2013), o šiaurinėse Europos šalyse bendras paplitimo dažnis svyruoja nuo 0,1% iki 1% Suomijoje (Jääskeläinen et al., 2011), 0.11% -1.22% Norvegijoje (Andreassen et al., 2015).

Vienas iš šiuo tyrimo tikslų buvo nustatyti viruso potipius. Žinoma, kad Baltijos šalyse, Švedijoje, Norvegijoje, Danijoje, Suomijoje, Rusijoje ir Rytų, Vakarų ir Pietų Europos šalyse yra nemažai europinio potipio židinių (Suss, 2011). Sibiro potipis rastas Sibire, Rytų Europoje (Ecker et al., 1999), Vakarų Rusijoje (Kovalev et al., 2009) ir Suomijoje (Jääskeläinen et al., 2006). Tačiau jis sutinkamas populiacijoje *I. persulcatus* erkėse Baltijos regione, Estijoje (Katargina et al., 2013). Šitame darbe *I. persulcatus* nebuvo aptiktas, o *I.ricinus* NS3 geno sekų genetinė analizė parodė, kad štamai priklauso Europiniam potipiui.

Šio tyrimo rezultatai įrodė EEV buvimą Lietuvoje ir būtinybę atidžiai stebėti EEV paplitimo tendenciją šalyje, plėsti dabartines žinias apie erkių encefalito sklaidą. Sistemingas erkių tyrimas padės geriau suvokti vyraujančią epidemiologinę situaciją. Nors vakcinacija yra efektyvi bei saugi šios ligos profilaktikos priemonė, kol kas Lietuvoje ši infekcija nepakankamai nevaldoma.

## Literatūra

1. AMICIZIA D, DOMNICH A, PANATTO D, LUIGI LAI P, CRISTINA M.L, AVIO U AND GASPARINIR, (2013), Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. Human vaccines and Immunotherapeutics, 2013 May 1; 9(5): 1163–1171.
2. ANDREASSEN A, JORE S, CUBER P, DUDMAN S, TENG S, ISAKSEN K, HYGEN HO, VILJUGREIN H, ÅNESTAD G, OTTESEN P AND VAINIO K. Prevalence of tick borne encephalitis virus in tick nymphs in relation to climatic factors on the southern coast of Norway. Parasites and Vectors, 2012 5:177.
3. БАЛАШОВ Ю., ГРИГОРЬЕВА Л., ОЛИВЕР ДЖ., Репродуктивная изоляция и межвидовая гибридизация иксодовых клещей группы *Ixodes ricinus* - *i. persulcatus* (acarina, ixodidae). (1998). Энтомологическое обозрение, том: 77номер: 3 год: страницы: 713-721
4. BOGOVIC P., STRLE F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. World Journal Clinical Cases. 2015 May 16; 3(5): 430–441.

5. Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries. European Centre for Disease Prevention and Control, 2012, Stockholm
6. ECKER M, ALLISON SL, MEIXNER T, HEINZ FX: Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol* 1999, 80(Pt 1):179–185
7. FILLIPOVA N. Ixodic ticks of the subfamily Ixodinae. Fauna in the USSR. Arachnidea Vol 4. Leningrad: Nauka, 1977.
8. FILIPPOVA, N. (ed.) 1985. Taiga Tick *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae). Leningrad: Nauka (in Russian).
9. FUKUNAGA M, YABUKI M, HAMASE A et al. *J Parasitol* 2000; 86(1): 38–43.
10. HILLYARD P. D. 1996. In: Barns R. S. K. and Crothers H. J. H., (ed.). Ticks of North-West Europe. Field Studies Council, Shrewsburg.
11. JÄÄSKELÄINEN AE, TIKKAKOSKI T, UZCATEGUI NY, ALEKSEEV A, VAHERI A, VAPALAHTI O: Siberian subtype tick-borne encephalitis virus, Finland. *Emerg Infect. Dis* 2006, 12:1568–1571
12. JÄÄSKELÄINEN A.E., TONTERI E., SIRONEN T., PAKARINEN L., VAHERI A., AND VAPALAHTI O (2011). European subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2): 323–325.
13. JÄÄSKELÄINEN A., KORHONEN, KUUSI M., VAPALAHTI O., Tick-Borne Encephalitis In Finland, *Epinorth* 2011; 12: 40-3
14. KATARGINA O, RUSSAKOVA S, GELLER J, KONDRUSIK M, ZAJKOWSKA J, ZYGUTIENE M, BORMANE A, TROFIMOVA J AND GOLOVLJOVA I. Detection and Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in Baltic Countries and Eastern Poland. *PLoS One*. 2013; 8(5)
15. KOVALEV S, CHERNYKH D, KOKOREV V, SNITKOVSKAYA T, ROMANENKO V: Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. *J Gen Virol* 2009, 90(Pt 12):2884–2892.
16. KOVALEV S., GOLOVLJOVA I., MUKHACHEVA T., Natural hybridization between *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks evidenced by molecular genetics methods. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Volume 7, Issue 1, February 2016, Pages 113-118
17. RADVILAVIČIENĖ J., MICKIENĖ A., PAKALNIENĖ J., VĖLYVYTĖ D., PETKEVIČIUS S., PAULAUSKAS A. Erkinio encefalito etiologija ir epidemiologija. literatūros apžvalga Veterinarija ir zootechnika. T. 56 (78). 2011.
18. SCHWAIGER M, CASSINOTTI P (2003) Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology* 27: 136–145
19. SUSS J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2011 Mar;2(1):2-15.
20. ŽYGUTIENĖ M. Regularities of distribution of blood-sucking dipterous insects (Insecta, Diptera) and ticks (Acarina) in Lithuania and their epidemiological significance [thesis; in Lithuanian]. Vilnius, Lithuania: Institute of Ecology, 1999.
21. WEIDONG GU, LAMPMAN R., NOVAK R.J. Problems in Estimating Mosquito Infection Rates Using Minimum Infection Rate. *Journal of Medical Entomology*, Volume 40, Issue 5, 2003, Pages 595–596
22. WÓJCIK-FATLA ANGELINA, CISAK EWA, ZAJĄC VIOLETTA, ZWOLIŃSKI JACEK, DUTKIEWICZ JACEK. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland). *Ticks and Tick-borne Diseases* Volume 2, Issue 1, March 2011, Pages 16-19
23. <http://www.ulac.lt/ataskaitos>.

Marina Sidorenko, Jana Radziewskaja, Algimantas Paulauskas

#### Identification of tick-borne encephalitis viruses in *Ixodes* ticks in Lithuania

##### Summary

According to the data of the Communicable Diseases and AIDS Center in Lithuania, cases of tick-borne encephalitis (TBE) are increasing every year. TBE detected in all Lithuanian counties. One of the main causes of the incidence of TBE is global warming, which had increased the period of ticks' activity and their spread to new habitats. There are two main species of ticks, TBE virus (TBEV) carriers: *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus*. It is known that *I. ricinus* species is widespread in Lithuania and have European (Western) virus subtype. *I. persulcatus* is carrier of Syberian and Far East strains and they are not typical for our region. Ticks of *I. persulcatus* are prevalent in countries bordering with Lithuania (Latvia, Poland, Belarus, Russia), so it is believed that this species also appeared in Lithuania.

The aim of this study is to investigate the current prevalence of EEV in Ixodidae ticks in Lithuania, to determine the species of collected ticks and to identify the subtypes of the virus.

In March-September 2017, 1884 ticks were collected from eight Lithuanian counties, 18 regions. RNR was isolated from tick suspension with Isolate II RNA Mini Kit (Bioline, Hilden, Germany).

All samples were tested for TBEV using RT-PCR. Gathered tick were identified as *I. ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, all TBEV-positive samples were from Šiauliai county, Akmeniai region, Kivyčiai village. The genetic characterization of NS3 gene sequences has shown that strains belong to the European subtype.

*Tick-borne encephalitis (TBE), Ixodes ricinus, Ixodes persulcatus, sickness rate, tick-borne encephalitis viruses*

Gauta 2018 m. kovo mėn., atiduota spaudai 2018 m. balandžio mėn.

---

**Marina SIDORENKO.** Vytauto Didžiojo universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biologijos katedra, doktorantė. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas. Tel.(8 37) 327 905 , el. paštas: [marina.sidorenko@vdu.lt](mailto:marina.sidorenko@vdu.lt)

**Marina SIDORENKO.** Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, PhD student. Address: Vileikos 8, LT-44404 Kaunas,. Tel.(8 37) 327 905 , e-mail: [marina.sidorenko@vdu.lt](mailto:marina.sidorenko@vdu.lt)

**Jana RADZIEVSKAJA.** Vytauto Didžiojo universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biologijos katedra, profesorė. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas, Tel. Tel.(8 37) 327 905 El. paštas: [jana.radziewskaja@vdu.lt](mailto:jana.radziewskaja@vdu.lt)

**Jana RADZIEVSKAJA.** Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, professor: Address: Vileikos 8, LT-44404 Kaunas,. Tel.(8 37) 327 905, e-mail: [jana.radziewskaja@vdu.lt](mailto:jana.radziewskaja@vdu.lt)

**Algimantas PAULAUSKAS.** Vytauto Didžiojo universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biologijos katedra, profesorius. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas, Tel.(8 37) 327 905, el. paštas: [algimantas.paulauskas@vdu.lt](mailto:algimantas.paulauskas@vdu.lt)

**Algimantas PAULAUSKAS.** Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, professor. Address: Vileikos 8, LT-44404 Kaunas,. Tel.(8 37) 327 905, e-mail: [algimantas.paulauskas@vdu.lt](mailto:algimantas.paulauskas@vdu.lt)