

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tinkara PIRC MAROLT

ZNOTRAJCELIČNA OKUŽBA Z BAKTERIJO
Rhabdochlamydia porcellionis V TKIVIH RAKA
Porcellio scaber

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tinkara PIRC MAROLT

ZNOTRAJCELIČNA OKUŽBA Z BAKTERIJO *Rhabdochlamydia porcellionis* V TKIVIH RAKA *Porcellio scaber*

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2. stopnja)

**INTRACELLULAR INFECTION WITH *Rhabdochlamydia porcellionis*
IN TISSUES OF ISOPOD *Porcellio scaber***

M. SC. THESIS
(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Delo je bilo opravljeno v prostorih Katedre za zoologijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je 6. 2. 2014 odobrila naslov magistrskega dela ter za mentorja imenovala prof. dr. Roka Kostanjška in za recenzentko doc. dr. Nado Žnidaršič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Damjana DROBNE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Tinkara Pirc Marolt

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 59:595.384.2(043.2)=163.6
KG *Rhabdochlamydia porcellionis*/Porcellio scaber/znotrajcelična okužba/širjenje okužbe/melanizacija/nodulacija/avtofluorescenca
AV PIRC MAROLT, Tinkara, dipl. biol. (UNI)
SA KOSTANJŠEK, Rok (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2014
IN ZNOTRAJCELIČNA OKUŽBA Z BAKTERIJO *Rhabdochlamydia porcellionis* V TKIVIH RAKA *Porcellio scaber*
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Strukturna in funkcionalna biologija)
OP VIII, 56 str., 15 sl., 123 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Znotrajcelična bakterija *Rhabdochlamydia porcellionis* je bila opisana kot patogen v prebavnih žlezah enakonožnega raka *Porcellio scaber*. Njeno širjenje v druga tkiva, vpliv na fiziologijo gostitelja in odziv gostitelja na okužbo so slabo poznani, kar je bil glavni povod za raziskavo. Vrzeli v poteku patogeneze v tkivih gostitelja smo skušali pojasniti s svetlobno kot tudi s transmissijsko in vrstično elektronsko mikroskopijo ter s hibridizacijo *in situ*. Prebavne žleze so primarno in osrednje mesto okužbe, od koder se *R. porcellionis* preko apikalne membrane sprošča v lumen organa in okuži sosednje celice prebavnih žlez oziroma preko prebavne cevi zapusti telo gostitelja. Poleg tega se *R. porcellionis* verjetno občasno sprošča tudi preko bazalne membrane okuženih žleznic celic v hemocel, od koder se okužba lahko razširi na črevesne celice, hemocite in hemopoetska tkiva. Kljub prisotnosti *R. porcellionis* na površini spolnih organov in trebušnjače, pa okužbe v njih nismo opazili. V stiku s hemolimfnimi hemociti so ti sposobni fagocitoze rabdoklamidij, medtem ko večji skupki sproščenih rabdoklamidij v hemocelu izzovejo zbiranje hemocitov in nastanek večplastnih melaniziranih nodulov, ki izražajo avtofluorescenca, zlasti pri vzbujanju z modro svetlobo. Asimetrični noduli se pojavljajo predvsem na močno okuženem črevesu in redkeje na prebavnih žlezah. Na površini spolnih organov in trebušnjače so občasno opazni le simetrični noduli, v katere se najverjetneje ujamejo rabdoklamidije, ki se sprostijo iz celic prebavnih žlez in črevesa. Okužba z *R. porcellionis* lahko prizadene tudi do 27 % osebkov v populaciji *P. scaber* in vodi v smrt gostitelja. Živali z izraženimi simptomi so v prehranjevalnem poskusu zaužile manj hrane in proizvedle manj iztrebkov v primerjavi z živalmi brez simptomov, kljub temu pa okužba nima očitnega vpliva na gibanje, agilnost in levitev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 59:595.384.2(043.2)=163.6
CX *Rhabdochlamydia porcellionis*/*Porcellio scaber*/intracellular
infection/dissemination of infection/melanization/nodulation/autofluorescence
AU PIRC MAROLT, Tinkara, dipl. biol. (UNI)
AA KOSTANJŠEK, Rok (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2014
TI INTRACELLULAR INFECTION WITH *Rhabdochlamydia porcellionis* IN
TISSUES OF ISOPOD *Porcellio scaber*
DT M. sc. Thesis (Master Study Programmes – Structural and functional biology)
NO VIII, 56 p., 15 fig., 123 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Rhabdochlamydia porcellionis* is known as intracellular pathogen in digestive glands of its primary host isopod *Porcellio scaber*. To describe pathogenesis, tissue distribution and host response to *R. porcellionis*, we conducted light, scanning electron and transmission electron microscopic observations, as well as fluorescent *in situ* hybridization. Digestive glands are confirmed as primary and the main site of infection. From there *R. porcellionis* spread to the lumen of digestive tract by release through apical membrane of digestive gland cells or presumably into hemocoel through basal membrane. Once in hemocoel, *R. porcellionis* is in a position to infect the hindgut cells, the hemocytes and the hemopoetic tissues, while the ventral nerve cord and the gonads seem to be devoid of infection, despite the presence of bacteria on their surface. Host response to *R. porcellionis* is mediated by phagocytosis and aggregation of hemocytes, forming multilayered melanized nodules and exhibiting strong autofluorescence especially under excitation with blue light. Asymmetric nodules are found on infected gut and occasionally on infected digestive glands. On the other hand nodules on ventral nerve cord and gonads appear symmetric and most likely serve to entrap bacteria released from digestive gland and gut cells. The study revealed high incidence of infection, which may affect up to 27 % of isopod populations and its detrimental effect during symptomatic phase, leading eventually to death of heavily infected animals. The feeding experiment demonstrated significant decrease in food consumption and feces production of symptomatic animals, without influence to movement, agility or molting cycle.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO SLIK	VII
	SLOVARČEK	VIII
1	UVOD	1
1.1	HIPOTEZE	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	KOPENSKI ENAKONOŽNI RAKI ONISCIDEA	2
2.1.1	Navadni prašiček <i>Porcellio scaber</i>	2
2.1.1.1	Zunanja anatomija	2
2.1.1.2	Integument	3
2.1.1.3	Prebavilo	4
2.1.1.4	Živčevje	5
2.1.1.5	Spolni organi	5
2.1.1.6	Imunski sistem	6
2.1.1.6.1	Hemociti	6
2.1.1.6.2	Fagocitoza, nodulacija in enkapsulacija	7
2.1.1.6.3	Profenol oksidazni sistem	7
2.2	KLAMIDIJE	7
2.2.1	Razvojni krog klamidij	8
2.2.2	Pestrost klamidij	10
2.2.3	Rabdoklamidije	11
2.2.3.1	<i>Rhabdochlamydia porcellionis</i>	12
2.2.3.2	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i>	12
2.2.3.3	Pestrost in razširjenost rabdoklamidij	13
3	METODE	14
3.1	IZVOR IN VZDRŽEVANJE ŽIVALI	14

3.2	PREPOZNAVANJE OKUŽBE	14
3.3	SEKCIJA ŽIVALI IN IZOLACIJA ORGANOV OZ. TKIV	14
3.4	PREPOZNAVANJE NODULOV	15
3.5	TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)	15
3.6	VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)	16
3.7	HIBRIDIZACIJA <i>in situ</i> (FISH)	16
3.8	PREHRANJEVALNI POSKUS	17
3.8.1	Statistika in grafični prikaz	18
4	REZULTATI	19
4.1	DELEŽ OKUŽENIH ŽIVALI	19
4.2	OKUŽBA HEPATOPANKREASA	19
4.3	OKUŽBA ČREVEESA	22
4.4	OKUŽBA HEMOCITOV	24
4.5	NODULACIJA	25
4.6	OKUŽBA OSTALIH ORGANOV	30
4.7	PREHRANJEVALNI POSKUS	32
5	RAZPRAVA	34
5.1	POTEK OKUŽBE V TELESU GOSTITELJA	34
5.1.1	Vstop <i>R. porcellionis</i> v gostitelja	35
5.1.2	Širjenje <i>R. porcellionis</i> iz hepatopankreasa	36
5.1.3	Okužba črevesa	36
5.1.4	Sproščanje <i>R. porcellionis</i> iz gostiteljske celice	36
5.1.5	Prisotnost <i>R. porcellionis</i> v hemocitih	37
5.1.6	Nodulacija	38
5.1.7	<i>R. porcellionis</i> in ostali organi	40
5.2	PREHRANJEVALNI POSKUS IN DRUGA OPAŽANJA	41
6	SKLEPI	43
7	POVZETEK	44
8	VIRI	46
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Anatomija enakonožnega raka	3
Sl. 2:	Shema razvojnega kroga klamidij	9
Sl. 3:	Simptomatska faza okužbe z <i>R. porcellionis</i>	19
Sl. 4:	Znotrajcelična okužba hepatopankreasa	20
Sl. 5:	Sproščanje rabdoklamidij iz celic hepatopankreasa	21
Sl. 6:	Znotrajcelična okužba zadnjega črevesa	23
Sl. 7:	Rabdoklamidije v telesnih votlinah	24
Sl. 8:	Okužba hemocitov	25
Sl. 9:	Avtofluorescenca nodularnih struktur na organih okuženih živali	26
Sl. 10:	Noduli na površini trebušnjače.	27
Sl. 11:	Nodularne strukture prebavnega sistema	28
Sl. 12:	Hemociti na periferiji črevesnih nodulov	30
Sl. 13:	Rabdoklamidijska okužba na površini trebušnjače	31
Sl. 14:	Prehranjevalni poskus	32
Sl. 15:	Predvideni potek okužbe z <i>R. porcellionis</i> v telesu gostitelja <i>P. scaber</i>	34

SLOVARČEK

ATP	adenozin trifosfat
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina
FISH	fluorescentna hibridizacija <i>in situ</i>
GA	glutaraldehyd
HMDS	1,1,1,3,3,3-heksametildisilazan
OsO₄	osmijev tetraoksid
PFA	paraformaldehid
SDS	natrijev dodecil sulfat
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol

1 UVOD

Pri kopenskih enakonožnih rakah *Porcellio scaber* opisana vrsta klamidij *Rhabdochlamydia porcellionis* (Kostanjšek in sod., 2004) skupaj z vrsto *R. crassificans*, opisano v celicah ščurkov (Corsaro in sod., 2007), tvori samostojno družino Rhabdochlamydiaceae. Medtem ko je bila okužba z *R. crassificans* opisana v različnih tkivih ščurkov, pa so bili prvotni opisi okužbe z *R. porcellionis* omejeni na prebavne žleze *P. scaber*, kjer bakterija povzroča znotrajcelično okužbo, ki vodi v patološke spremembe tkiva (Drobne in sod., 1999). Kasnejše raziskave so pokazale verjetnost širjenja okužbe v druga tkiva raka enakonožca, v katerih so bili rabdoklamidijski geni posredno potrjeni z molekulskimi pristopi (Gjureč, 2009), sočasno pa so bile pri okuženih živalih opažene nodularne tvorbe na površini različnih organov, ki bi lahko bile povezane z obrambnim odzivom gostitelja na *R. porcellionis*.

Namen naloge je bila neposredna potrditev širjenja okužbe z *R. porcellionis* iz celic prebavnih žlez na druga tkiva gostitelja na podlagi mikroskopskih opazovanj, ultrastrukturni opis obrambnega odziva gostitelja na okužbo ter ovrednotenje vpliva okužbe na prehranjevanje in smrtnost živali.

1.1 HIPOTEZE

- Znotrajcelična okužba z *R. porcellionis* se iz prebavnih žlez razširja tudi na druga tkiva v telesu enakonožnega raka *P. scaber*.
- Prisotnost *R. porcellionis* v telesu gostitelja sproži obrambne odzive v obliki nodularnih struktur, s katerimi gostitelj omeji širjenje okužbe v telesu.
- Okužba v simptomatski fazi negativno vpliva na prehranjevanje in poveča smrtnost živali.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KOPENSKI ENAKONOŽNI RAKI ONISCIDEA

Enakonožce (Isopoda) uvrščamo v skupino rakov valilničarjev Peracarida, ki je del obsežnega razreda višjih rakov (Crustacea, Malacostraca). Enakonožci so ena izmed ekološko najbolj raznolikih skupin rakov, saj so zastopani v skoraj vseh življenjskih okoljih (Brusca in Brusca, 2003). Mednje sodijo tudi najbolj uspešni kopenski raki Oniscidea, ki poseljujejo številne kopenske habitate, vse od litorala do suhih celinskih predelov ter od nivoja morske gladine do visokogorja in celo jam. Kljub nekaterim amfibijskim ali sekundarno vodnim vrstam večinoma zasedajo vlažne kopenske mikrohabitate npr. pod kamni, hlodi ali v listni stelji (Hornung, 2011). Kopenski enakonožci se pretežno hranijo z odmrlimi organskimi delci, zato so pomembni dekompozitorji, ki vplivajo na dinamiko tal ter prispevajo h kroženju snovi in energije v ekosistemih (Hassall in sod., 1987; Zimmer, 2002). Uspešno kolonizacijo kopnega so jim omogočile številne strukturne, fiziološke in vedenjske prilagoditve, zato so zanimiv model preučevanja prehoda iz vodnega okolja na kopno (Hornung, 2011). Poleg tega so se kopenski enakonožci uveljavili kot dobri testni organizmi v različnih fizioloških in ekotoksikoloških raziskavah. K temu so prispevali široka razširjenost, dobro poznavanje njihove biologije, precejšnja toleranca za različne polutante in relativno preprosto vzdrževanje v laboratorijski kulturi (Drobne, 1997; Drobne in sod., 1999).

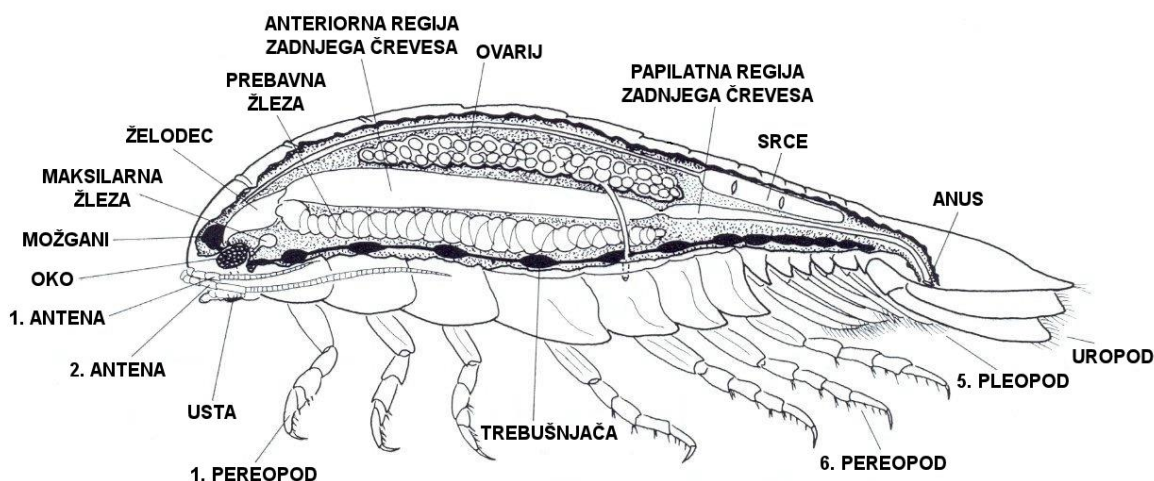
2.1.1 Navadni prašiček *Porcellio scaber*

Navadni prašiček sodi v skupino Porcellionidae, ki je del skupine Chrinocheta, največje skupine znotraj kopenskih enakonožcev Oniscidea (Schmidt, 2008). Uvršča se med geografsko najbolj razširjene vrste kopenskih enakonožcev. Pojavlja se predvsem v antropogenih habitatih, čeprav lahko v nekaterih evropskih predelih doseže večje gostote tudi v naravnem okolju (Harding in Sutton, 1985; Vilisics in sod., 2007; Magura in sod., 2008). Vrsta je tudi ena izmed najbolj preučevanih med kopenskimi enakonožci (Schmalfuss in Wolf-Schwenninger, 2002) in zato prevladujoča izbira v mnogih raziskavah (Drobne, 1997; Wolff, 2009).

2.1.1.1 Zunanja anatomija

Navadni prašiček doseže srednje do večje velikosti (do 18 mm) in se ne zvija v kroglico (Harding in Sutton, 1985; Stichmann-Marny in Kretzschmar, 2009). Ima dorziventralno sploščeno telo, ki ga gradijo glavoprsje, pereon in pleon. Glava je zlita s prvim torakalnim segmentom v glavoprsje. Na glavoprsju imajo par sedečih sestavljenih oči (Brusca in Wilson, 1991) in obustni aparat, ki ga tvorijo mandibule, dva para maksil in en par maksilipedijev (Brusca, 1997). Prvi par anten je reduciran, medtem ko je drugi par daljši in dobro razvit (Schmalfuss, 1998). Na vsakem od sedmih ločenih segmentov pereona je po

en par enovejnatih hodilnih okončin (pereopodov). Pleon je sestavljen iz petih ločenih segmentov in enega segmenta, ki je s telzonom združen v pleotelzon (Brusca, 1997). Na pleonu so dvovejnat pleopodi z listastimi eksopoditi in suličasto oblikovani uropodi. Eksopoditi prvih dveh parov pleopodov imajo razvit sistem zračnih vreč ali psevdotrahej in služijo kot dihala, imenovana tudi trahealna pljuča (Harding in Sutton, 1985; Brusca in Brusca, 2003). Telesna površina je hrapava in pri samcih navadno obarvana temno sivo, medtem ko so samice in juvenilni osebki večinoma svetlejši in lisasti (Harding in Sutton, 1985; Hornung, 2011).



Slika 1: Anatomija enakonožnega raka (Wägele, 1992).

2.1.1.2 Integument

Telo pokriva štirislojna hitinska kutikula, ki jo izločajo spodaj ležeče epidermalne celice. Hitinske molekule skupaj s proteini tvorijo hierarhično organiziran organski matriks, mineraliziran s kalcitom, amorfnim kalcijevim karbonatom in amorfnim kalcijevim fosfatom. Najbolj notranja nemineralizirana plast, bazalna membrana, predstavlja vez med epidermalnimi celicami in preostalo kutikulo. Proti zunanosti so razvrščene mineralizirani endo- in eksokutikula ter nemineralizirana epikutikula. Kutikula nudi oporo ter zaščito pred plenilci, mikroorganizmi in drugimi okoljskimi dejavniki. Služi tudi kot narastišče za mišice in ima pomembno čutilno vlogo (Seidl in Ziegler, 2012). Levitev kutikule omogoča rast živali in je pri kopenskih enakonožcih relativno pogosta (Hornung, 2011). Levitveni cikel *P. scaber* traja približno 33 dni (Zidar in sod., 1998). Levitev je dvofazna, saj levitvi posteriornega dela kutikule sledi anteriorni del (Ziegler, 1997; Hornug, 2011). Značilnost levitvenega cikla kopenskih enakonožcev je tudi resorpcija kalcija v predlevitveni fazi, katere posledica je pojav značilno oblikovanih belih kalcijevih depozitov ventralno pod sterniti (Ziegler, 1997).

2.1.1.3 Prebavilo

Prebavno cev večine kopenskih enakonožcev tvorita sprednje in zadnje črevo ektodermalnega izvora, medtem ko je endodermalno srednje črevo reducirano in omejeno le na prebavne žleze, imenovane tudi hepatopankreas. Lumen prebavne cevi je posledično prekrit s kutikulo, ki jo izloča enoslojni črevesni epitel in se levi skupaj s kutikulo na telesni površini (Bettica in sod., 1987; Storch, 1987; Hames in Hopkin, 1989).

Kratko sprednje črevo sestavljata požiralnik in proventrikel (želodec). Požiralnik je preprosta mišična cev, ki služi prehajanju hrane iz ust v proventrikel (Lane, 1988). Kompleksna zgradba proventrikla omogoča sortiranje, žvečenje in filtriranje hrane. Pri tem so ključni mišično delovanje, primarni in sekundarni filter z značilnimi kutikularnimi izrastki ter druge strukture z diferencirano kutikulo in epitelom (Storch, 1987; Hames in Hopkin, 1989).

V bližini stika z zadnjim črevesom je atrij proventrikla povezan s hepatopankreasom prek dveh lateralnih vodov, ki usmerjajo filtrat v lumen hepatopankreasa. Hepatopankreas sestoji večinoma iz dveh parnih spiralno zavrtih, slepo zaprtih in distalno zoženih cevok (Bettica in sod., 1987; Hames in Hopkin, 1989). Cevke ležijo tik ob ventralni in lateralnih stenah zadnjega črevesa in se raztezajo čez večino pereona (Lane, 1988; Hames in Hopkin, 1989). Steno hepatopankreasa, ki jo obdaja omrežje mišičnih celic, tvori enoslojni epitel iz celic B in celic S. Večje, kupolasto oblikovane celice B z mikrovilarno apikalno površino molijo v lumen hepatopankreasa. Njihova glavna funkcija je sekrecija prebavnih encimov in absorpcija hranil. V nasprotju s celicami S, celice B navadno vsebujejo veliko lipidnih kapelj, glikogena, mitohondrijev in obsežen zrnati endoplazmatski retikulum (Hryniewiecka-Szyfer, 1972; Hopkin in Martin, 1982; Bettica in sod., 1987; Millaku in sod., 2010). Celice S so piramidasto oblikovane in lahko kopičijo večje količine bakra in drugih kovin (Hopkin in Martin, 1982; Bettica in sod., 1987).

Sprednje črevo se nadaljuje v zadnje črevo, ki ga tvorijo anteriorna in papilatna regija ter z močnim mišičastim sfinktrom ločen rektum z anusom. Za anteriorno regijo je značilna dorzalna guba, imenovana tiflosol, medtem ko je papilatna regija prepoznavna po bazalnih delih celic, ki so izbočene v hemocel (Hassall in Jennings, 1975; Hames in Hopkin, 1982). V anteriorni regiji se vrši encimska razgradnja hrane z encimi, ki izvirajo iz hepatopankreasa (Hassall in Jennings, 1975). Papilatna regija predstavlja pomembno mesto absorpcije vode in ionov (Palackal in sod., 1984). V rektumu se zaključi oblikovanje neprebavljenih ostankov hrane v dorziventralno sploščene, skoraj pravokotne iztrebke (Hames in Hopkin, 1989). Vzdlž kutikule zadnjega črevesa je glede na regijo izoblikovan značilen vzorec kutikularnih trnov (Palackal in sod., 1984). V lumnu so pogosti mikroorganizmi, ki v črevo zaidejo najpogosteje skupaj s hrano in lahko služijo kot dodaten vir hranilnih snovi in encimske aktivnosti (Kostanjšek in sod., 2006). Celotno zadnje črevo obdaja omrežje krožnih in vzdolžnih mišic z izjemo območja tiflosola, kjer so le krožne mišice (Hames in Hopkin, 1989). Mišice omogočajo peristaltično gibanje

(Zimmer, 2002) in imajo pomembno vlogo pri vračanju prebavnih produktov nazaj v hepatopankreas. Krčenje mišic namreč ustvarja sile, tako da se tekočina s finimi delci usmeri v parna tiflosolna kanala, ki se odpirata v predelu stika anteriorne in papilatne regije. Po kanalih se tekoča vsebina vrne v proventrikel. Tu se filtrira in prehaja v hepatopankreas, kjer se vrši nadaljnja prebava in absorpcija (Hames in Hopkin, 1989).

2.1.1.4 Živčevje

Trebušnjača se nahaja v ventralnem delu telesa in se razteza čez večji del telesne dolžine. V najbolj anteriornem delu glavoprsja leži supraezofagealni ganglij (možgani), ki sodeluje v procesiranju vidnih, olfaktornih in drugih dražljajev v predelu glavoprsja. Supraezofagealni ganglij se preko cirkumezofagealnih komisur povezuje s subezofagealnim ganglijem, katerega živci vodijo v obustni aparat in druge dele glavoprsja. Subezofagealni ganglij se nadaljuje v ventralno živčno vrvico iz sedmih ganglijev pereona, ki so povezani s parnimi longitudinalnimi in enojnimi medianimi konektivi. Zadnji ganglij pereona se direktno veže s šestimi združenimi parnimi gangliji pleona. Iz ganglijev ventralne živčne vrvice lateralno izhajajo živci, ki se razvejijo in oživčujejo dele pereona in pleona (Kumari in sod., 1987; Schmitz, 1989).

Telesa živčnih celic se združujejo na površini trebušnjače v eni ali nekaj plasteh v določenih predelih ganglijev. Celotno centralno živčevje je obdano z elastičnim ovojem, ki ga tvorijo ploščate podolgovate celice (Schmitz, 1989).

2.1.1.5 Spolni organi

Parni spolni organi ležijo v pereonu dorzolateralno od črevesa (Becker in Mann, 1938; Longo in sod., 1998). Samci imajo parne testise, ki jih tvorijo trije lobuli ali folikli. Ti so nameščeni posamezno vzdolž razširjenega dela semenovoda. Znotraj lobulov se odvija spermatogeneza, ki med lobuli ni sinhronizirana (Becker in Mann, 1938). Zreli spermiji so nemobilni in imajo filamentozno glavo z izredno dolgim izrastkom (Becker in Mann, 1938; Wilson, 1991). Izrastki več spermijev se med sabo ovijajo in tvorijo podolgovate snope. Spermiji se s pomočjo mišičnega delovanja izločijo iz lobulov v razširjen del semenovoda in nadaljujejo pot v terminalni del semenovoda, ki je od prvega ločen z izrazitim zoženjem. Terminalna dela se v posteriornem delu pereona združita v mediani vod z odprtino na vrhu penisa, ki ga obdajajo stileti prvega segmenta pleona. Stileti so tudi na drugem segmentu pleona in so delno prekriti s stileti prvega segmenta (Becker in Mann, 1938).

Gonade samic sestavljajo parna ovarija in jajcevoda. Ovariji so podolgovati in dorzoventralno sploščeni. V njih dozorevajo jajčne celice (Longo in sod., 1998). Jajcevodi izhajajo iz sredinskega dela ovarijev in se odpirajo na lateralnih delih petega sternita (Suzuki in Ziegler, 2005). V stičišču ovarija in jajcevoda je izoblikovan specializiran predel za shranjevanje sperme, kjer lahko spermiji ostanejo viabilni več mesecev (Longo in

sod., 1998). Oplojene jajčne celice se sprostijo v vrečasto oblikovan marzupij, napolnjen z marzupielno tekočino, ki oskrbuje zarodke s hranili. Marzupij se razvije na ventralni strani telesa med posebno t. i. parturielno levitvijo (Hornung, 2011). Oblikuje ga pet parov prekrivajočih se oostegitov, ki se razvijejo na koksah prvih petih parov pereopodov (Patane, 1940, cit. po Appel in sod., 2011). Marzupij je ena najpomembnejših prilagoditev kopenskih enakonožcev, saj omogoča od zunanjega okolja neodvisen razvoj embrijev (Hornung, 2011). Razvoj kopenskih enakonožcev je neposreden. Preko več embrionalnih stadijev se razvijejo juvenilni osebk s šestimi pari hodilnih okončin, imenovani manke, ki zapustijo marzupij in se z nadaljnjimi levitvami razvijejo v spolno zrele odrasle živali (Araujo in sod., 2004; Wolff, 2009; Milatovič in sod., 2010).

2.1.1.6 Imunski sistem

Imunski sistem nevretenčarjev zajema le prirojene (nespecifične) obrambne mehanizme, medtem ko pridobljene imunosti, kakršna je poznana pri vretenčarjih, ni. Imunski sistem nevretenčarjev vključuje humoralno in celično obrambo, ki ju je pri nevretenčarjih pogosto težko ločevati zaradi tesne medsebojne povezanosti (Jiravanichpaisal in sod., 2006). Humoralna obramba se nanaša na sintezo topnih efektorskih molekul (Rowley in Powell, 2007), kot so antimikrobni peptidi, reaktivni kisikovi in dušikovi intermedijati ter produkti aktiviranega profenol oksidaznega sistema (Jiravanichpaisal in sod., 2006). Pomemben vir mnogih humoralnih molekul so krvne celice nevretenčarjev ali hemociti, ki so hkrati tudi nosilci celične imunosti. Celična obramba obsega fagocitozo, nodulacijo, enkapsulacijo in citotoksično aktivnost (Jiravanichpaisal in sod., 2006).

2.1.1.6.1 Hemociti

Hemociti kopenskih enakonožcev nastajajo v treh parnih hemopoetskih organih, ki so oblikovani kot skupki dozorevajočih hemocitov med vezivnim tkivom vzdolž dorzalne žile (srca) v predelu pleona (Coutant, 1977, cit. po Chevalier in sod., 2011). Zreli hemociti se sprostijo v odprt krvožilni sistem, za katerega je značilno razlivanje hemolimfe med organi in vračanje hemolimfe po arterijskem omrežju žil s srcem (Wilkens, 1999).

Hemociti se glede na morfologijo in funkcijo delijo v tri celične tipe. Hialine celice so majhne celice z velikim jedrom, povezane predvsem s fagocitno funkcijo. Semigranularne celice vsebujejo majhne granule. Sodelujejo pri nodulaciji in enkapsulaciji, so citotoksične, sproščajo elemente profenol oksidaznega sistema ter so lahko fagocitno aktivne. Granularne celice imajo velike granule. Izražajo citotoksično aktivnost in so pomembne zlasti pri aktivaciji profenol oksidaznega sistema (Battistella in sod., 1996; Johansson in sod., 2000; Jiravanichpaisal in sod., 2006).

2.1.1.6.2 Fagocitoza, nodulacija in enkapsulacija

Fagocitoza je najbolj razširjena oblika celičnih obrambnih reakcij, ki skupaj s humoralnimi komponentami predstavlja prvo linijo obrambe po vdoru tujkov preko mehansko-kemijske bariere kutikule (Söderhäll in Cerenius, 1992, cit. po Battistella in sod., 1996). Fagocitozo sproži prepoznavna tujka preko neposredne vezave tujka z receptorji hemocita ali preko označevanja tujkov z opsonini, ki imajo funkcijo pospeševanja fagocitoze. Fagocitozo omejuje velikost in številnost mikroorganizmov ter drugih tujkov, saj prevelikih ali preštevilnih tujkov ena sama celica ne more uničiti. Takrat nastopi nodulacija, pri kateri se izoblikuje struktura, imenovana nodul. Gradi ga večslojni ovoj iz hemocitov, ki obdaja mikroorganizme, ujete v ekstracelularni material. Pri rakih je izoblikovan nodul navadno melaniziran. Mikrobi v nodulu pogosto odmrejo zaradi toksičnih substanc in pomanjkanja kisika v notranjosti nodula ali pa sta njihova rast in širjenje po telesu zgolj omejena. Večje, nodulom podobne strukture nastanejo tudi v procesu enkapsulacije, le da gre v tem primeru za odziv na večje tujke, kot so nematodi in parazitoidi (Battistella in sod., 1996; Jiravanichpaisal in sod., 2006).

2.1.1.6.3 Profenol oksidazni sistem

Profenol oksidazni sistem zajema množico proteinaz in proteinaznih inhibitorjev, ki delujejo kot regulatorji encimske kaskade. Za aktivacijo profenol oksidaznega sistema so potrebne molekule, ki vežejo mikrobne komponente in tako sprožijo niz proteolitičnih reakcij. Pri tem je ključna pretvorba neaktivne profenol oksidaze v aktivno fenol oksidazo, ki prek raznih stranskih produktov in prekurzorjev vodi v nastanek rumeno-rjavega pigmenta, melanina. Tako melanin kot tudi nekateri stranski produkti (fenoli in kinoni) delujejo protimikrobno (Söderhäll in Cerenius, 1998). Profenol oksidazni sistem ni pomemben le v procesu melanizacije, temveč sodeluje tudi pri koagulaciji hemolimfe, sklerotizaciji, sprostitvi stresnih proteinov in opsoninov ter spodbuja citotoksične reakcije, fagocitozo in enkapsulacijo (Cerenius in Söderhäll, 2004; Jiravanichpaisal in sod., 2006).

2.2 KLAMIDIJE

Klamidije so obligatni znotrajcelični organizmi v vakuolah evkariontskih celic. Gre za majhne negibljive pleomorfne bakterije. Običajno se barvajo po Gramu negativno. Imajo trislojno celično steno, ki jo tvorijo lipopolisaharidi in je po strukturi kot tudi po sestavi analogna celični steni po Gramu negativnih bakterij, vendar ne vsebuje zaznavne količine muraminske kisline in posledično peptidoglikanov (Horn, 2010a; Kuo in sod., 2010a).

Zadnji skupni prednik današnjih klamidij se je pojavil verjetno pred 0,7 do 1,6 milijarde leti in naj bi bil že dobro prilagojen na življenje znotraj celic ter vsaj do neke mere odvisen od gostitelja (Subtil in sod., 2014). Tekom evolucije so klamidije postale izjemno uspešni obligatni znotrajcelični patogeni, kar je vodilo v izgubo genov. Genom klamidij obsega le 1 – 2,4 Mbp (Horn, 2010a) v primerjavi z genomom najbolj preučevane bakterije

Escherichia coli, ki vsebuje okoli 4,6 Mbp (Blattner in sod, 1997). Največji znan genom klamidij pripada predstavnikom iz družine Parachlamydiaceae. Večji genom se je domnevno ohranil zaradi bolj spremenljivih okoljskih razmer, ki vladajo znotraj njihovih enoceličnih gostiteljev, ameb (Horn in sod., 2004).

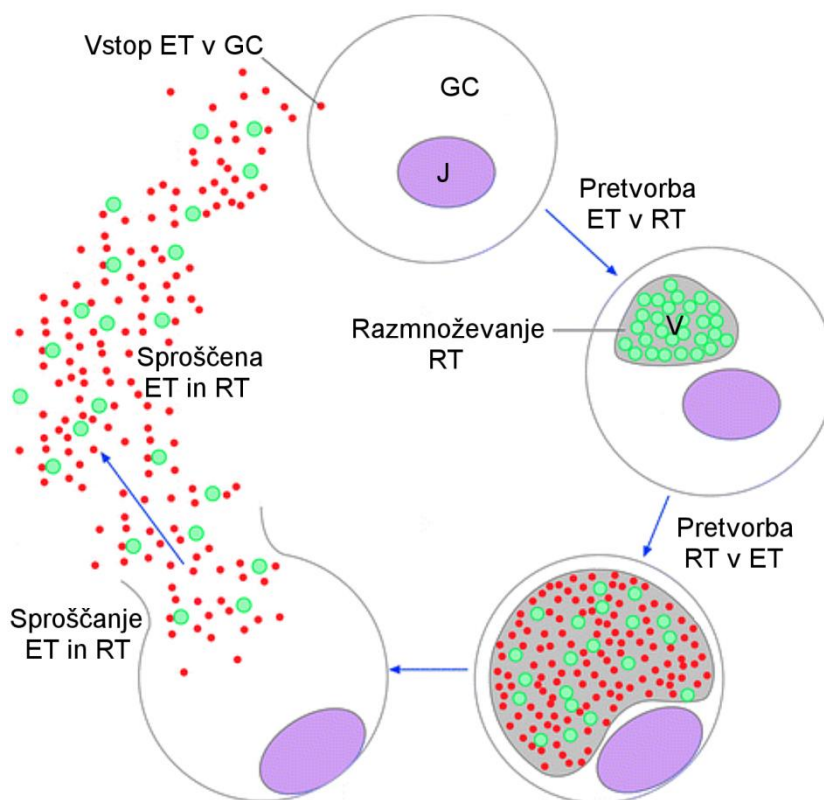
Zaradi redukcije genoma so pri klamidijah mnogi metabolni procesi odsotni ali močno okrnjeni. Klamidije so razvile mehanizme, ki jim omogočajo izkoriščanje gostitelja. Tako si zagotovijo stalen dotok esencialnih molekul, med katere sodi večina aminokislin in nukleotidov, vključno z energijsko bogatimi molekulami (npr. ATP) (Horn in sod., 2004). Kljub temu lahko klamidije sintetizirajo nekatere lipide, glikogen in proteine (Kuo in sod., 2010b). Poznane so tudi specifične insercije in delecije v nekaterih proteinih ter preko 50 klamidijsko-specifičnih proteinov (Griffiths in sod., 2006; Gupta in Griffiths, 2006).

Vakuole različnih evkariontskih celic, znotraj katerih poteka razvoj klamidij, so si v osnovi precej podobne in predstavljajo relativno stabilno okolje, zato ni bilo priložnosti ali potrebe po razvoju povsem novih lastnosti (Kuo in sod., 2010b). Tako so se pri znanih klamidijah ohranile osnovne značilnosti razvojnega kroga kljub nekaterim fenotipskim in ekološkim razlikam med skupinami (Everett in sod., 1999).

Za klamidije je značilen dvofazni razvojni krog s pretvorbami med elementarnimi in retikularnimi telesi (Slika 2). Elementarno telo je infektivna, a metabolno neaktivna oblika, medtem ko so retikularna telesa neinfektivna, metabolno aktivna in sposobna binarne cepitve. Elementarna telesa so navadno manjša in imajo zgoščen dedni material, kar jim daje elektronsko gost videz (Kuo in sod., 2010b). Večinoma so okrogla, čeprav so znane tudi druge oblike npr. zvezdaste, hruškaste ali paličaste (Kostanjšek in sod., 2004; Thomas in sod., 2006; Kuo in sod., 2010b). V nasprotju z retikularnimi telesi so elementarna precej stabilna tudi v ekstracelularnem okolju, saj imajo v zunanji membrani sistem zamreženih proteinov (Newhall in Jones, 1983). Retikularna telesa so bolj ali manj sferična, pogosto tudi pleomorfna. Imajo več ribosomov in fibrilaren, manj elektronsko gost dedni material ter tipično granularno citoplazmo (Kuo in sod., 2010b).

2.2.1 Razvojni krog klamidij

Za začetek okužbe je pomemben vstop elementarnega telesa v gostiteljsko celico z inducirano endocitozo. Ključen je stik elementarnega telesa s površino gostiteljske celice, pri čemer naj bi se tvorile povezave prek različnih ligandov in receptorjev. Sledi aktivacija določenih signalnih poti in reorganizacija aktina. Natančen potek še ni povsem znan, vendar mnogi predvidevajo, da pri tem sodelujejo tudi klamidijske efektorske molekule (Carabeo in sod., 2004; Dautry-Varsat in sod., 2004; Clifton in sod., 2005; Cocchiario in Valdivia, 2009).



Slika 2: Shema razvojnega kroga klamidij. ET – elementarna telesa (●), RT – retikularna telesa (●), GC – gostiteljska celica, J – jedro gostiteljske celice, V – vakuola s klamidijami (Ward, 2004).

Elementarno telo se med vstopanjem v celico začne preoblikovati v retikularnega. Disulfidne vezi med proteini zunanje membrane elementarnega telesa se pričnejo rahljati (Hackstadt in sod., 1985; Peeling in sod., 1989), celična stena postaja tanjša, bolj fleksibilna in šibkejša (Kuo in sod., 2010b). Poleg tega pride do dekondenzacije nukleoida, ki omogoči bakterijsko transkripcijo ter s tem ekspresijo in sintezo proteinov (Plaunt in Hatch, 1988; Belland in sod., 2003). Popolnoma izoblikovano retikularno telo se deli z binarno cepitvijo. Močno namnožena retikularna telesa začnejo prehajati v elementarna telesa prek vmesnih intermediarnih teles z elektronsko gostim centralnim ali polmesečastim robnim delom, ki je posledica zgoščevanja dednega materiala v sredini oziroma na robu celice (Wagar in Stephens, 1988; Hackstadt in sod., 1991; Radek, 2000; Kuo in sod., 2010b). Proces je asinhron, zato so znotraj vakuole lahko hkrati opazne različne oblike klamidij (Kuo in sod., 2010b).

Celoten potek okužbe se odvija znotraj citoplazmatskih inkluzij oziroma vakuol, ki jih obdaja inkluzijska membrana. Na začetku okužbe vstopajočo klamidijo obdaja fagosom, omejen s plazemsko membrano gostiteljske celice (Kuo in sod., 2010b). Kasneje se membrana modificira. Vanjo se vključujejo različni klamidijski proteini in razni gostiteljski lipidi (Rockey in Rosquist, 1994; Scidmore in sod., 2003; Dautry-Varsat in sod., 2004; Cocchiario in Valdivia, 2009; Kuo in sod., 2010b). Znotraj gostiteljske celice se

lahko pojavi ena ali več vakuol. Tekom okužbe se vakuole z razmnoževanjem klamidij povečujejo in lahko zasedejo večino gostiteljske celice (Dautry-Varsat in sod., 2004).

Za obstoj klamidij znotraj celic so ključni mehanizmi, ki preprečujejo zlitje vakuole z lizosomom in s tem razgradnjo njene vsebine (Kuo in sod., 2010b). Čeprav so mehanizmi še nejasni, pri tem verjetno sodelujejo klamidijški efektorji v inkluzijski membrani (Wyrick, 2000; Mehrlitz in Rudel, 2013). Pomembno je tudi vzdrževanje preživetja gostiteljske celice, ki ga klamidije dosežejo preko blokiranja apoptoznih procesov (Byrne in Ojcius, 2004; Ying in sod., 2008). Poleg tega klamidije verjetno s svojimi efektorji vplivajo vsaj na nekatere poti gostiteljevega imunskega sistema (Cocchiario in Valdivia, 2004).

Razvojni krog klamidij je zaključen s sprostitvijo klamidij iz gostiteljske celice, kar omogoča širjenje elementarnih teles in ponovno okužbo sosednjih celic. Predpostavljena sta dva neodvisna mehanizma sproščanja. Lahko pride do lize vakuole, ki ji sledi liza gostiteljske celice ali pa se iz celice izloči celotna vakuola (Hybiske in Stephens, 2007). Poleg tega je predviden še tretji način, pri katerem se klamidije sprostijo iz celice po zlitju vakuolne in plazemske membrane (Everett in sod., 1999).

2.2.2 Pestrost klamidij

Nedavne raziskave kažejo precej večjo raznolikost klamidij od sprva domnevane. Razvoj novih metod v mikrobiologiji je močno olajšal odkrivanje obligatnih znotrajceličnih bakterij. Klamidij namreč zaradi vezanosti na gostiteljske celice ni mogoče gojiti v klasičnih mikrobioloških gojiščih brez gostiteljskih celic (Horn in sod., 2004). Za uvrstitev med klamidije nista dovolj le klamidijam podobna ultrastruktura in dvofazni razvojni krog, temveč so ključne tudi podobnosti s klamidijškimi sekvencami 16S rRNA in/ali 23S rRNA (Everett in sod., 1999).

Na podlagi trenutne klasifikacije, ki temelji na filogenetskih analizah sekvenc 16S rRNA, vsebuje deblo Chlamydiae le razred Chlamydia, znotraj katerega se nahaja red Chlamydiales. Red trenutno obsega osem družin, in sicer Chlamydiaceae, Clavichlamydiaceae, Criblamydiaceae, Parachlamydiaceae, Piscichlamydiaceae, Rhabdochlamydiaceae, Simkaniaceae in Waddliaceae (Horn in sod., 2010b; Kuo in sod., 2010a).

Družina Chlamydiaceae je dolgo veljala za edino klamidijško družino. Njeni predstavniki so bili poznani predvsem kot povzročitelji bolezni pri ljudeh in drugih sesalcih ter ptičih, čeprav so jih potrdili tudi pri nekaterih poikilotermnih vretenčarjih. Prenašajo se aerosolno ali z neposrednim stikom z okuženim osebkom. Potencialen prenos preko vektorjev, kot so členonožci in amebe, je predviden le redko (Everett in sod., 1999; Corsaro in Venditti, 2004). Med medicinsko pomembnejšimi klamidijami je prav gotovo *Chlamydia trachomatis*, ki je pogost vzrok spolno prenosljivih bolezni in najpogostejši vzrok slepote,

povzročene z okužbo. Dobro znani sta tudi povzročiteljici različnih respiratornih boleznih *C. pneumoniae* in *C. psittaci*. Slednja je sicer pogost parazit pri pticah, a lahko pri človeku povzroča hudo obliko pljučnice (Kuo in sod., 2010b).

Nabor gostiteljev je pri ostalih klamidijah precej manj poznan. Glede na trenutno znanje je le družina Wadliaceae primarno vezana na celice toplokrvnih vretenčarjev (Rurangirwa in sod., 1999). Klamidije iz družin Clavichlamydiaceae (Horn, 2010c) in Piscichlamydia (Horn, 2010d) so patogeni rib, družina Rhabdochlamydiaceae (Horn, 2010e) in nekateri predstavniki iz družine Simkaniaceae so bili odkriti v celicah členonožcev (Everett in sod., 2005), medtem ko so amebe naravni gostitelji družine Parachlamydiaceae (Everett in sod., 1999).

Dejanska pestrost klamidij in njihov nabor gostiteljev sta verjetno še precej večja, saj mnogo klamidijam podobnih in/ali sorodnih organizmov iz literature še ni veljavno opisanih, hkrati pa se že kopičijo novi dokazi o njihovi razširjenosti. Njihovo prisotnost so potrdili tako v okoljskih vzorcih kot tudi različnih organizmih, vse od praživali in raznih nevretenčarjev pa do vretenčarjev, vključno z ljudmi, zato jih pogosto označujejo kot porajajoče se patogene. Čedalje več raziskav kaže na njihov potencialno patogen učinek pri ljudeh, čeprav sprva klamidije iz novo opisanih družin in njim sorodni organizmi niso veljali nevarni ljudem (Corsaro in sod., 2003; Corsaro in Venditti, 2004; Corsaro in Greub, 2006).

2.2.3 Rabdoklamidije

Rabdoklamidije so ene izmed redkih klamidij, ki so jih odkrili v celicah členonožcev. Poznana sta le dva predstavnika iz rodu *Rhabdochlamydia*. Gre za edini rod znotraj družine Rhabdochlamydiaceae (Horn, 2010e). Rabdoklamidije so sestrške družini Simkaniaceae, kamor uvrščamo tudi preostali znani klamidiji z artropodskimi gostitelji, in sicer '*Candidatus Fritschea bemisiae*' in '*Candidatus Fritschea eriococci*' (Horn, 2010f).

Rabdoklamidije se barvajo po Gramu negativno in nimajo opaznega peptidoglikanskega sloja. Imajo za klamidije značilen razvojni krog z morfološko razpoznavnimi oblikami, ki se pojavljajo znotraj vakuol v gostiteljskih celicah. Rabdoklamidije so, tako kot ostale klamidije, nemobilne in obligatne znotrajcelične bakterije, zato jih ni možno gojiti v gojišču brez gostiteljskih celic, tako da so sta bila oba predstavnika sprva opisana kot kandidatni vrsti (Kostanjšek in sod., 2004; Corsaro in sod., 2007).

Posebnost rabdoklamidij so njihova paličasto oblikovana elektronsko gosta elementarna telesa, po katerih so tudi poimenovane. Beseda *rhabdos* je namreč grški izraz za palico (Kostanjšek in sod., 2004). Elementarna telesa imajo petslojno celično steno in pogosto vsebujejo 1 do največ 2 podolgovati elektronsko prosojni strukturi. Retikularna telesa so ultrastrukturno podobna kot pri drugih klamidijah. So okrogla in imajo trislojno celično steno ter elektronsko manj gosto citoplazmo, ki vsebuje filamente in granularni material v

kortikalnem delu pa tudi raztresen v skupini v preostalih delih citoplazme. Intermediarna telesa so prav tako okrogla z osrednjim ali robnim elektronsko gostim delom (Drobne in sod., 1999; Radek, 2000).

2.2.3.1 *Rhabdochlamydia porcellionis*

Vrsto so sprva označevali z imenom *Chlamydia isopodii* (Shay in sod., 1985). Kasneje so jo uvrstili v polifiletsko skupino organizmov podobnih bakterijam iz rodu *Rickettsiella* (Drobne in sod., 1999), njihova dokončna sorodnost s klamidijami pa je bila potrjena šele s pomočjo sekvenc 16S rRNA, ko je bila vrsta opisana kot *Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis* (Kostanjšek in sod., 2004).

Za *R. porcellionis* so značilna manjša retikularna telesa s premerom do 1 µm in večja s premerom od 1 do 4 µm. Intermediarna telesa dosežejo od 350 do 650 nm. Premer elementarnih teles se giblje med 100 in 150 µm, dolžina pa med 250 in 700 µm (Kostanjšek in sod., 2004).

Domnevno je okužba omejena na prebavne žleze enakonožnih rakov vrste *P. scaber*, kjer se izraža v obliki citoplazemskih vakuol opaznih kot izrazite bele pike vzdolž celotnega organa. Okužene žleze so pogosto mehkejše in bolj blede barve v primerjavi z žlezami neokuženih živali. Vakuole z rabdoklamidijami znotraj celic se pojavljajo posamezno (premer do 30 µm) ali v agregatih (50 do 150 µm). Sproščajo se v lumen prebavnih žlez z razpadom apikalnih delov gostiteljskih celic ali kot celi agregati. Bakterije se lahko znotraj celic močno namnožijo in po vsej verjetnosti vplivajo na normalno funkcijo prebavnih žlez. Vpliva na stopnjo prehranjevanja okuženih živalih kljub temu niso uspeli potrditi (Drobne in sod., 1999).

Prvotni podatki kažejo, da okužba z *R. porcellionis* prizadene do 10 % osebkov v populaciji *P. scaber* (Drobne in sod., 1999). Enakonožec se smatra kot naravni rezervoar teh bakterij (Kostanjšek in sod., 2004), čeprav bi se lahko okužba potencialno pojavila tudi v drugih vrstah členonožcev, saj so nedavno *R. porcellionis* uspeli vzgojiti v celičnih kulturah žuželk, ne pa tudi v amebah (Sixt in sod., 2013).

2.2.3.2 *Rhabdochlamydia crassificans*

Vrsta je bila najprej znana kot *Rickettsiella crassificans* (Radek, 2000), vendar so jo na podlagi 16S rRNA in morfološke podobnosti z *R. porcellionis* preimenovali v *Candidatus Rhabdochlamydia crassificans* (Corsaro in sod., 2006).

Elementarna telesa dosežejo dolžino 260 do 330 nm in širino 135 do 155 nm, medtem ko retikularna telesa merijo največ 900 nm. Za razliko od *R. porcellionis* so v razvojnem krogu *R. crassificans* prepoznali dve intermediarni obliki, in sicer ploščata telesa ter zgoščujoča kroglasta telesa. Prva spominjajo na elementarna telesa, le da so nekoliko večja, sploščena in se pogosto pojavljajo v skupini, kjer so vzporedno naložena. Kroglasta

telesa so bolj podobna retikularnim telesom. Elektronsko zgoščeni deli se pojavijo v sredi celice ali na njenem robu v obliki polmeseca (Radek, 2000).

Okužbo z *R. crassificans* so odkrili pri ščurkih *Blata orientalis*. Najobsežnejša je v maščobnem telesu zadka, kjer vakuole dosega premer od 7 do 100 μm . Vakuole se pojavljajo tudi v črevesju, ovariolih, Malpighijevih cevkah in hemocitih. Okuženi osebki imajo izrazito otečen zadek, ki v zadnjih fazah okužbe celo otežuje gibanje živali. Okužba je v tem primeru smrtna in se pojavi le v posameznih primerkih, čeprav so lahko rabdoklamidijske sekvence zaznane tudi v navidezno povsem zdravih živalih (Radek, 2000; Corsaro in sod., 2006).

V nasprotju z *R. porcellionis* lahko *R. crassificans* uspešno gojijo v celicah ameb (Cason in sod., 2007).

2.2.3.3 Pestrost in razširjenost rabdoklamidij

Družina Rhabdochlamydiaceae je kljub le dvema opisanima predstavnikoma zelo verjetno veliko bolj pestra. Recentne genetske raziskave namreč kažejo, da gre za najbolj raznoliko in vrstno bogato družino znotraj reda Chlamydiae (Lagkouvardos in sod., 2014). V prid temu govori tudi naraščajoče število dokazov o rabdoklamidijskih in njim podobnih sekvencah v različnih bioloških vzorcih. Takšne sekvence so potrdili v nekaterih vodnih vzorcih (Corsaro in sod., 2009; Corsaro in Venditti, 2009), pri govedu in celo pri človeku. Vpliv rabdoklamidij na človeka in druge vretenčarje je še precej neraziskan, vendar jih nekateri že označujejo kot porajajoče se patogene mikroorganizme (Corsaro in Venditti, 2004; Lamoth in sod., 2011; Wheelhouse in Longbottom, 2012). Rabdoklamidijske sekvence 16S rDNA so potrdili v nekaterih splavljenih govejih zarodkih (Wheelhouse in sod., 2010). Rabdoklamidijam sorodne sekvence so zasledili tudi pri dveh pacientih z uveitisom (Meijer in Ossewaarde, 2002, cit. po Corsaro in Venditti, 2004) in pri nekaterih nedonošenčkih z zdravstvenimi težavami (Lamoth in sod., 2009). Poleg tega se zdijo precej pogoste pri bolnikih z respiratornimi boleznimi. Dokazali so jih namreč v mnogih respiratornih izločkih bolnih otrok in odraslih (Haider in sod., 2008; Lamoth in sod., 2011; Niemi in sod., 2011).

3 METODE

3.1 IZVOR IN VZDRŽEVANJE ŽIVALI

Za izdelavo naloge smo izbrali navadne prašičke *Porcellio scaber* iz treh naravnih in dveh laboratorijskih populacij. Iz naravnih populacij so izhajale živali v prehranjevalnem poskusu in del živali, ki smo jih žrtvovali za odvzem okuženih organov. Živali smo odvzeli iz naravnega okolja v kompostu, pod večjimi kamni in glinenimi strešniki na območju Ljubljane (Zadobrova). Ostale živali smo pridobili iz laboratorijske populacije dr. Primoža Zidarja in populacije Barbare Drašler.

Živali smo vzdrževali pri 16-urnem dnevnem in 8-urnem nočnem ritmu v steklenih ali plastičnih terarijih z visoko vlažnostjo na temperaturi okoli 20°C. Terarije smo napolnili z nekaj zemlje in jo prekrili s suhim, pretežno leskovim listjem, ki je služilo tudi kot hrana za živali.

3.2 PREPOZNAVANJE OKUŽBE

Živali v simptomatski fazi okužbe z *R. porcellionis* smo prepoznali po belih pikah na hepatopankreasu. Te so bile navadno dobro vidne prek prosojnih sternitov, ko smo žival pridržali pod stereomikroskopom. V primeru živali z manj prosojnimi sterniti ali s kalcijevimi depoziti, značilnimi za predlevitvene faze (Zidar in sod., 1998), smo žival po potrebi nekoliko raztegnili, da smo lahko žleze opazovali prek intersegmentalne membrane med sosednjimi sterniti. Kljub temu je z omenjeno metodo pogosto nemogoče z gotovostjo določiti, ali je okužba prisotna pri gravidnih samicah in pri nekaterih osebkih s kalcijevimi depoziti, zato smo takšne osebkke izločili iz poskusov ali počakali na fazo med levitvama.

3.3 SEKCIJA ŽIVALI IN IZOLACIJA ORGANOV OZ. TKIV

Sekcije živali smo izvajali pod stereomikroskopom v plastični petrijevki. Secirali smo v kaplji fiziološke raztopine za rake (0,75 % NaCl) ali v ustreznem fiksativu glede na mikroskopsko tehniko (podrobneje v nadaljevanju). Z etrom narkotizirano žival smo pridržali med prsti in ji s pinceto odstranili glavoprsje skupaj s hepatopankreasom. Še posebno previdni smo bili pri močno okuženih živalih, saj je bil pri teh hepatopankreas precej bolj mehak in se je posledično hitreje poškodoval. S pinceto smo odstranili okončine ter s škarjicami porezali epimere, da smo lažje odmaknili sternite ter s tem omogočili dostop do notranjih organov. Zanimali so nas predvsem hepatopankreas, črevo, trebušnjača, ovarijski testisi in hemopoetski organi, ki smo jih izolirali skupaj s srcem. Vsak organ smo s pomočjo pincete izolirali iz telesa v novo kapljo fiziološke raztopine ali fiksativa. Preverili smo prisotnost nodulov in drugih patoloških sprememb, ki bi lahko bile povezane z okužbo. Potencialno okužene organe in tkiva smo shranili v ustreznem fiksativu do nadaljnje obdelave.

Nekaj živali namenjenih za SEM smo predhodno omamili z etrom. Sekcijo smo pričeli z odstranjevanjem okončin ter nadaljevali s sterniti in tergiti, s čimer smo izolirali glavoprsje s črevesom, hepatopankreasom in trebušnjačo. Nekaterim smo odstranili tudi večji del glavine kapsule, ter tako izpostavili stik med sprednjim črevesom in hepatopankreasom.

Za TEM in FISH smo pripravili tudi vzorce hemocitov, ki smo jih pridobili iz hemolimfe več okuženih živali. Žival smo položili na kazalec ter jo s sredincem in palcem nežno pridržali. S tanko injekcijsko iglo smo jo zabodli med 5. in 6. tergitom toliko, da se je pojavila kapljica hemolimfe. Hemolimfo smo z avtomatsko pipeto prenesli v ustrezen fiksativ.

3.4 PREPOZNAVANJE NODULOV

Nodule smo prepoznali na površini organov kot kroglaste ali grozdaste strukture, ki so bile pogosto melanizirane. Takšne strukture so izražale intenzivno avtofluorescenco, ki je bila najizrazitejša ob vzbujujanju z modro svetlobo. Pri tem smo uporabljali fluorescenčni stereomikroskop MZ FLIII (Leica) z naborom filtrov: GFP (425/480 nm), UV (360/420 nm) in zelenim filtrom (546/590 nm). Nekatero organe z noduli smo pregledali s fluorescenčnim mikroskopom AxioImager Z1 (Carl Zeiss) z naborom filtrov: 01 (365/397 nm), 09 (450-490/515 nm) in 15 (546/590 nm).

3.5 TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)

Za TEM smo izolirane organe oz. tkiva fiksirali v 1,5 mL Eppendorfovih epruveh s 3,5 % glutaralhidom (GA) v 0,1M Na-fosfatnem pufru (pH 7,2), v katerem smo jih fiksirali najmanj 2 uri pri 4°C. Pred nadaljnjim obdelovanjem vzorca smo po navodilih proizvajalca zmešali sestavine za srednje trdo smolo (Agar 100 resin, Agar Scientific).

Fiksirano hemolimfo smo pred vklapljanjem v smolo centrifugirali (4 minute, 5000 obratov/min, MiniSpin plus, Eppendorf), zavrgli supernatant in pelet vklopili v 3 % agarozo (Sigma). Strjeno agarozo z vklopljenimi hemociti smo narezali na koščke, ki smo jih fiksirali kot je opisano zgoraj.

Fiksativ smo spirali v 0,1M fosfatnem pufru (pH 7,4) 3-krat po 5 minut. Sledila je enourna postfiksacija v 1 % vodni raztopini OsO₄, ki smo ga spirali z vodo 15 minut. Vzorce smo nato po 5 minut dehidrirali v naraščajočih koncentracijah etanola (50 %, 70 %, dvakrat 90 % in 96 %) ter dvakrat po 5 minut v 100 % acetonu. V naslednjem koraku smo vzorce pustili 1 uro na mešalu v 100 % acetonu, ki smo mu dodali pripravljeno smolo v razmerju 1:1. Nato smo povečali količino smole v razmerju 2:1 in zopet za 1 uro dali na mešalo. Vzorce smo nato prenesli v čisto smolo in jih pustili na mešalu preko noči. Naslednji dan smo vzorce prestavili v sveže pripravljeno smolo in jih pustili še 3 ure na mešalu. Tako pripravljene vzorce smo previdno prenesli v smolo v modelčkih in jih najmanj 48 ur polimerizirali pri temperaturi 60°C.

Vklopljene vzorce smo rezali na ultramikrotomu UltracutS (Leica). Za izdelavo poltankih rezin (350 do 400 nm) smo uporabljali steklen nož, ultratanke rezine (50 do 100 nm) pa smo rezali z diamantnim nožem (Diatome). Poltanke rezine smo prenesli v kapljico destilirane vode na objektnem steklu. Po sušenju pri 80°C smo na steklo pritrjene rezine za nekaj minut barvali z barvilom Richardson (Azur II-metilen modro), ki smo ga sprali z destilirano vodo. Poltanke rezine smo sproti pregledovali s svetlobnim mikroskopom.

Ultratanke rezine smo prenesli na bakrene mrežice (SPI) in posušene pozitivno kontrastirali 5-7 minut v kapljici 4 % vodne raztopine uranil acetata, ki smo jo nanegli na parafilm v petrijevki. Uranil acetat smo spirali v petih zaporednih čašah z destilirano vodo, tako da smo v pinceto vpeto mrežico z nežnimi vertikalnimi gibi namakali v posamezni čaši vsaj 10 sekund. Podobno smo vzorce kontrastirali še v nasičeni raztopini svinčevega citrata v 0,1 M NaOH, le da smo za spiranje uporabili padajoče koncentracije NaOH, ki so si sledile v naslednjem vrstnem redu: 0,1 M NaOH, 0,05 M NaOH, 0,05 M NaOH, 0,025 M NaOH in destilirana voda.

Kontrastirane ultratanke rezine smo pregledali s transmisijskim elektronskim mikroskopom CM100 (Philips). Slike smo zajeli s kamerama 792 BioScan in Orius 200 (Gatan).

3.6 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)

Vzorce za SEM smo fiksirali z 1 % GA in 0,5 % PFA v 0,1 M fosfatnem pufru (pH 7,4) v Eppendorfovih epruveh ali steklenih posodah, kjer smo jih shranili do nadaljnjega obdelovanja. Spirali smo jih dvakrat po 5 minut v 0,1 M fosfatnem pufru (pH 7,4). Nato smo jih prekrili s kapljico 1 % OsO₄ za 1 uro. Sledilo je spiranje v destilirani vodi dvakrat po 5 minut in dehidracija v etanolu z naraščajočo koncentracijo (30 %, 50 %, 70 %, 90 % in dvakrat 96 %, v vsakem 5 minut). Etanol smo zamenjali s 100 % acetonom (dvakrat po 5 minut) in dodali HMDS v razmerju 1:1. Po 5-ih minutah smo mešanico nadomestili s čistim HMDS. Vzorce smo pustili preko noči v digestoriju, da so se povsem posušili. Posušene vzorce smo prilepili s srebrovo pasto (SPI) na kovinske nosilce in jih v napraševalcu SCD050 (BAL-TEC) naprašili s tanko plastjo platine. Tako pripravljene preparate smo pregledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom JSM-7500F s hladnim virom elektronov na poljsko emisijo (JEOL). Po potrebi smo vzorce dodatno lomili in jih ponovno napraševali.

3.7 HIBRIDIZACIJA *in situ* (FISH)

Prisotnost rabdoklamidij v hemocitih smo dokazovali tudi z metodo hibridizacije *in situ*. Kapljice hemolimfe posameznih okuženih ali neokuženih živali smo kanili na poli-L-lizinska objektna stekla in jih pustili 30 minut v vlažni komori, da so se hemociti dobro pritrčili nanje. Odvečno hemolimfo smo po potrebi odstranili s filtrirnim papirjem. Vsak vzorec hemocitov smo 5 minut fiksirali v kaplji 4 % PFA, ki smo ga sprali z destilirano vodo (3-krat po 5 minut). Stekelca z vzorci smo dehidrirali v raztopinah etanola

naraščajoče koncentracije (50 %, 80 %, 96 %, v vsakem 5 minut). Stekelce smo nato osušili in obkročili vzorce z vodoodpornim flomastrom (Liquid Blocker – Super PAP Pen). Na vsak vzorec smo nanесли 20 μ l hibridizacijskega pufra (0,02 M Tris (pH 7,4), 0,9 M NaCl, 25 % formamid, 0,01 % SDS), ki je vseboval 100 ng oligonukleotidne sonde Rha 998 (Kostanjšek in sod., 2004), označene s fluorescenčnim cianinom Cy3, ki se specifično veže na mesto v rabdoklamidijskem genu za 16S rRNK. Stekla smo nato namestili v hibridizacijsko komoro (plastenka Falcon s toaletno brisačo, ki smo jo navlažili s hibridizacijskim pufrom). Hibridizacija je potekala v predhodno ogreti hibridizacijski pečici SI30H (Stuart) v temi 2 uri pri 46°C. Po hibridizaciji smo stekla za 10 minut prenesli v spiralni pufer (0,02 M Tris (pH 7,4), 0,09 M NaCl, 0,005 M EDTA), ki smo ga predhodno segreti v vodni kopeli na 48°C. Takoj zatem smo stekla z vertikalnimi gibi 10 sekund spirali v ledeno hladni destilirani vodi ter jih do opazovanja shranili v temni škatli. Po potrebi smo jedra celic barvali z barvilom DAPI (2 – 3 minute) (Daims in sod., 2005). Hibridizirane vzorce smo z uporabo ustreznih filtrov pregledali s fluorescenčnim mikroskopom Axioimager Z1 (Carl Zeiss), opremljenim s kamerama HRc in MRm AxioCam in nadgrajenim s sistemom ApoTome za izdelavo optičnih rezin.

Enak postopek hibridizacije smo izvedli tudi s kontrolnimi sondami. Za pozitivno kontrolo smo uporabili za evbakterije specifično sondo Eub338 (Amann in sod., 1990), označeno s cianinom Cy3 ali s fluoresceinom, medtem ko je kot negativna kontrola služila s fluoresceinom označena sonda NonEub338 (Daims in sod., 1999) brez specifičnega vezavnega mesta za bakterije.

Poleg hemolimfe smo hibridizirali tudi okužen hepatopankreas ter črevo in trebušnjačo z noduli. Hibridizacijo hepatopankreasa smo izvedli na 2 načina in sicer v Eppendorfovih epruveh ter na stekelih. Slednji način se je izkazal za primernejšega, zato smo ga uporabili tudi za druge organe. Izolirana tkiva smo shranili v 4 % PFA in jih pred hibridizacijo predstavili na poli-L-lizinsko stekelce. Vzorce smo sušili na zraku dokler se niso oprijeli objektnega stekla. Nadaljnji postopek ustreza zgoraj opisanemu postopku za hibridizacijo hemocitov, pri čemer smo postopke dehidracije in spiranja tkiv izvajali na stekelcu.

Metoda FISH na celih organih se je zaradi močne avtofluorescence nodularnih struktur izkazala za neprimerno, zato smo jo opustili.

3.8 PREHRANJEVALNI POSKUS

V prehranjevalnem poskusu smo spremljali prehranjevanje in preživetje okuženih živali z izrazitimi pikami na hepatopankreasu (simptomatska faza okužbe) v primerjavi z živalmi brez takšnih simptomov (asimptomatske živali). Izbrali smo 15 asimptomatskih samic in 15 asimptomatskih samcev *P. scaber* ter prav toliko živali s simptomi okužbe. Živali smo pred poskusom stehali in opazovali tudi pod modro svetlobo, s katero smo na podlagi avtofluorescence ugotavljali morebitno prisotnost nodulov. Po pregledu smo vsako žival

namestili v svojo petrijevko z navlaženim filtrirnim papirjem in znano maso posušenih leskovih listov (*Corylus avellana*), ki so služili kot hrana tekom celotnega poskusa. Liste in pokrove petrijevk smo poškopili z vodo. Petrijevke smo zložili v večji steklen terarij, v katerem smo z vlaženjem zagotavljali ustrezno vlažnost tekom 37-dnevnega poskusa, ki je potekal pri sobni temperaturi in dnevno-nočnem ciklu 16 : 8. Med poskusom smo živali preverjali trikrat na teden. Zanimala sta nas predvsem levitvena faza, gibanje, agilnost in preživetje živali. Mrtve živali smo iz poskusa odstranili, jih stehali ter s sekcijo ocenili poškodbe hepatopankreasa, značilne za rabdoklamidijsko okužbo. Ob zaključku poskusa smo preživele živali stehali, ter pri skupini asimptomatskih živali ponovno preverili morebitne znake okužbe. Vsebino petrijevk (preostalo listje in iztrebke) smo posušili v pečici pri 40°C ter stehali.

3.8.1 Statistika in grafični prikaz

Za obdelavo podatkov in grafični prikaz rezultatov smo uporabili program Statistica 7 (StatSoft). S Studentovim t-testom smo primerjali povprečno maso zaužitih listov ter povprečno maso iztrebkov med skupinama asimptomatskih in simptomatskih osebkov.

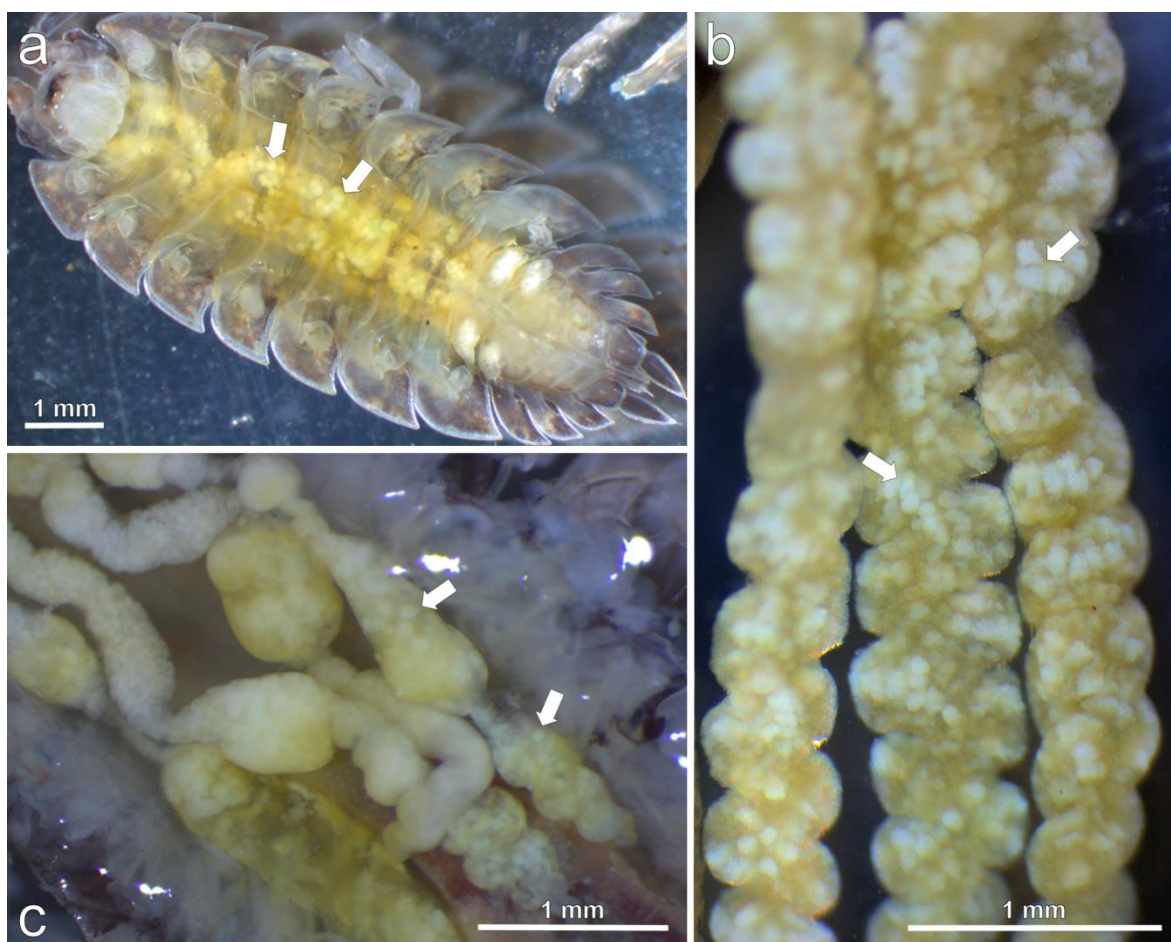
Maso zaužitih listov smo izračunali kot razliko suhe mase listov na začetku in suhe mase listov na koncu poskusa. Za maso iztrebkov smo upoštevali suho maso iztrebkov posamezne živali, ki se je nakopičila med poskusom. Maso zaužitih listov in iztrebkov smo podali na maso žive telesne mase živali ob koncu poskusa.

Za izračun smo upoštevali le preživele živali na koncu poskusa. Poleg tega smo v kontrolni (asimptomatski) skupini iz poskusa izključili žival, pri kateri so se tekom poskusa na hepatopankreasu pojavile simptomatske bele lise. Pri skupini simptomatskih živali smo izločili žival v petrijevki, kjer so se razvile ličinke žuželk, ki so se hranile z listi in iztrebki *P. scaber*. Prehranjevalni poskus je tako temeljil na 28 asimptomatskih in 14 simptomatskih živalih.

4 REZULTATI

4.1 DELEŽ OKUŽENIH ŽIVALI

Tekom raziskave smo pregledali okoli 1000 osebkov *P. scaber* iz dveh laboratorijskih in treh naravnih populacij. Delež živali v simptomatski fazi okužbe hepatopankreasa se je glede na opazovanje belih lis na prebavnih žlezah skozi sternite živih živali (Slika 3a) gibal med 2 in 27 %, pri čemer nismo opazili razlik med laboratorijskimi in naravnimi populacijami. V pregledovanje so bile vključene živali obeh spolov, različnih starosti in v različnih levitvenih fazah.

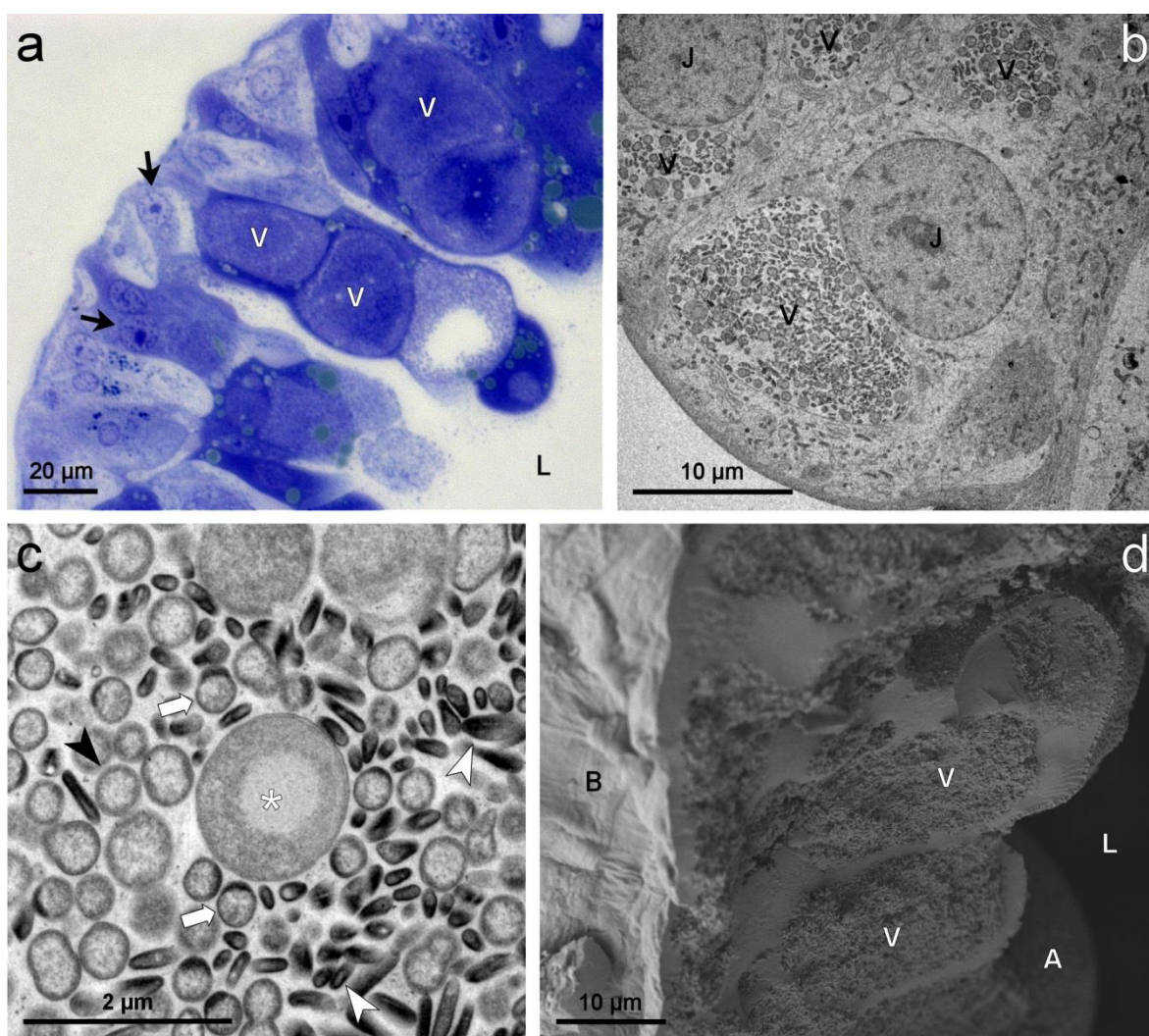


Slika 3: Simptomatska faza okužbe z *R. porcellionis*. (a) Značilne bele lise (⇔) na hepatopankreasu, vidne prek prosojnih sternitov. (b) Bele lise (⇔) na izoliranem hepatopankreasu. (c) Močno deformiran hepatopankreas z belimi lisami (⇔) v zadnjih fazah okužbe.

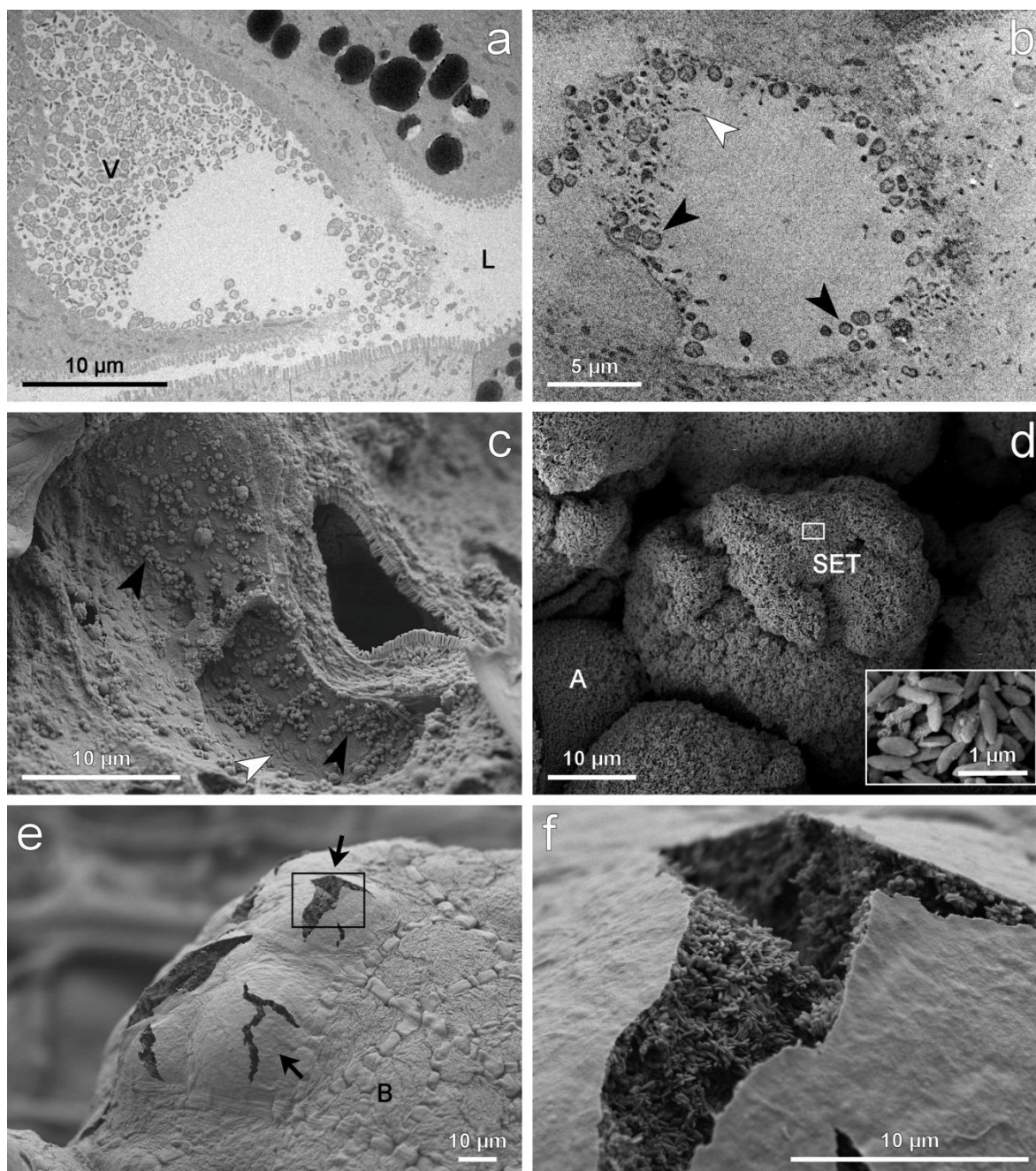
4.2 OKUŽBA HEPATOPANKREASA

Simptomatske živali so se od asimptomatskih živali razlikovale po bolj ali manj izrazitih belih lisah na hepatopankreasu, ki so se pogosto pojavljale enakomerno vzdolž vseh štirih cevkc organa (Slika 3b). Za hepatopankreas asimptomatskih osebkov so bili značilni

rumeno-rjavi odtenki, medtem ko so bili pri osebkih v simptomatski fazi ti navadno svetlejši, sam organ pa je bil manj čvrst in v zadnji fazi okužbe tudi deformiran (Slika 3c). Vrstična in transmisijska elektronska mikroskopija sta pokazali, da omenjene bele lise na prebavnih žlezah ustrezajo citoplazmatskim vakuolam, v katerih so bile pleomorfne bakterije s tremi prevladujočimi oblikami, značilnimi za *R. porcellionis* (Slika 4). Elementarna telesa so bila podolgovata s petslojno celično steno in elektronsko gosta, medtem ko so bila retikularna telesa okrogla s trislojno celično steno in elektronsko redkejša. Retikularna telesa so bila, v nasprotju z elementarnimi, sposobna delitve. Opazna so bila tudi vmesna okrogla intermediarna telesa z elektronsko gosto sredino ali polmesečastim robom. Občasno so bile vidne velike celice s kristalnimi vključki (Slika 4c).



Slika 4: Znotrajcelična okužba hepatopankreasa. (a) Vakuole (V) v okuženem hepatopankreasu. L – lumen hepatopankreasa, → – jedro hepatopankreasne celice; barvano z barvilom Richardson. (b) Vakuole (V) polne *R. porcellionis* v celicah hepatopankreasa. J – jedro; TEM. (c) Razvojne faze *R. porcellionis* znotraj vakuole. ► – retikularno telo, ≧ – elementarno telo, ⇔ – intermediarno telo, * – celica s kristalnim vključkom; TEM. (d) Vakuole (V) z *R. porcellionis* v celicah hepatopankreasa. A – apikalna površina hepatopankreasa, B – bazalna površina hepatopankreasa, L – lumen organa; SEM.



Slika 5: Sproščanje rabdoklamidij iz celic hepatopankreasa. (a) Sproščanje *R. porcellionis* iz vakuole (V) v lumen hepatopankreasa (L); TEM. (b) in (c) Preostanek elementarnih (EB) in prevladujočih retikularnih teles (RT) v vakuoli po sprostitvi iz celice; TEM (b), SEM (c). (d) Sproščanje elementarnih teles (SET) prek apikalne površine (A) v lumen hepatopankreasa. V izseku podroben prikaz elementarnih teles; SEM. (e) Sproščanje *R. porcellionis* skozi razpoke (R) na bazalni površini hepatopankreasa (B); SEM. (f) Podroben prikaz razpoke bazalne membrane iz slike (e) z *R. porcellionis* v celici hepatopankreasa; SEM.

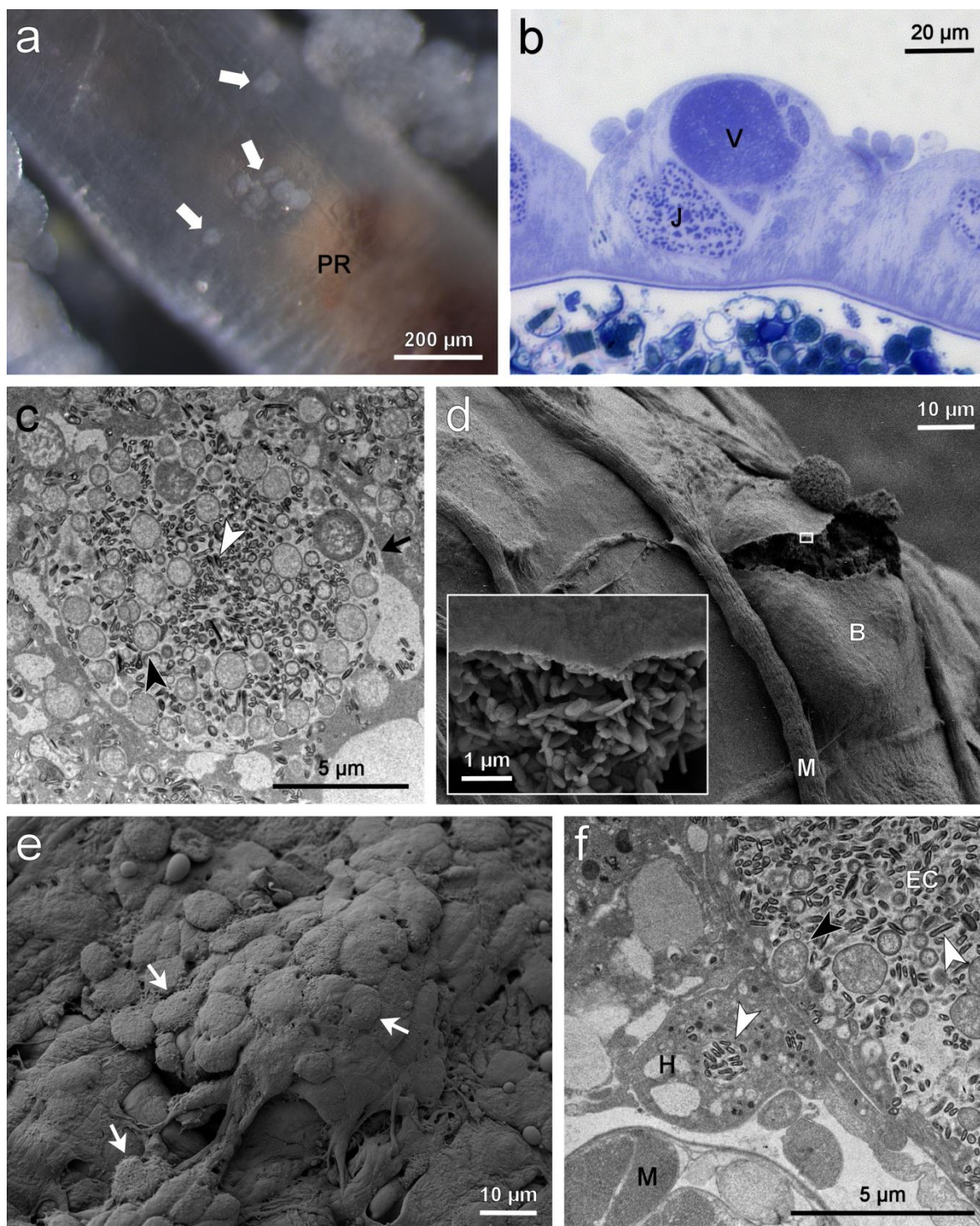
Bakterije so se v celicah hepatopankreasa nahajale v eni ali več vakuolah (Slike 4a, b in d). Na apikalni strani celic smo pogosto opazili razpadlo membrano in sprostitev bakterij v lumen žlez (Slika 5a), ki je lahko potekala tudi v obliki večjih skupkov rabdoklamidij (Slika 5d). Intaktna elementarna telesa in deformirana retikularna telesa so se pogosto

pojavnala tudi na apikalnih površinah hepatopankreasnih celic (Slika 7a). Redkeje je bilo opazno pokanje plazmaleme na bazalni strani okuženih celic. To se je pojavljalo na izbočenih delih, ki so sledili obliki pod njimi ležečih vakuol (Sliki 5e in f). Po sprostitvi rabdoklamidij iz celic so v ostankih vakuol prevladovala retikularna telesa (Sliki 5b in c).

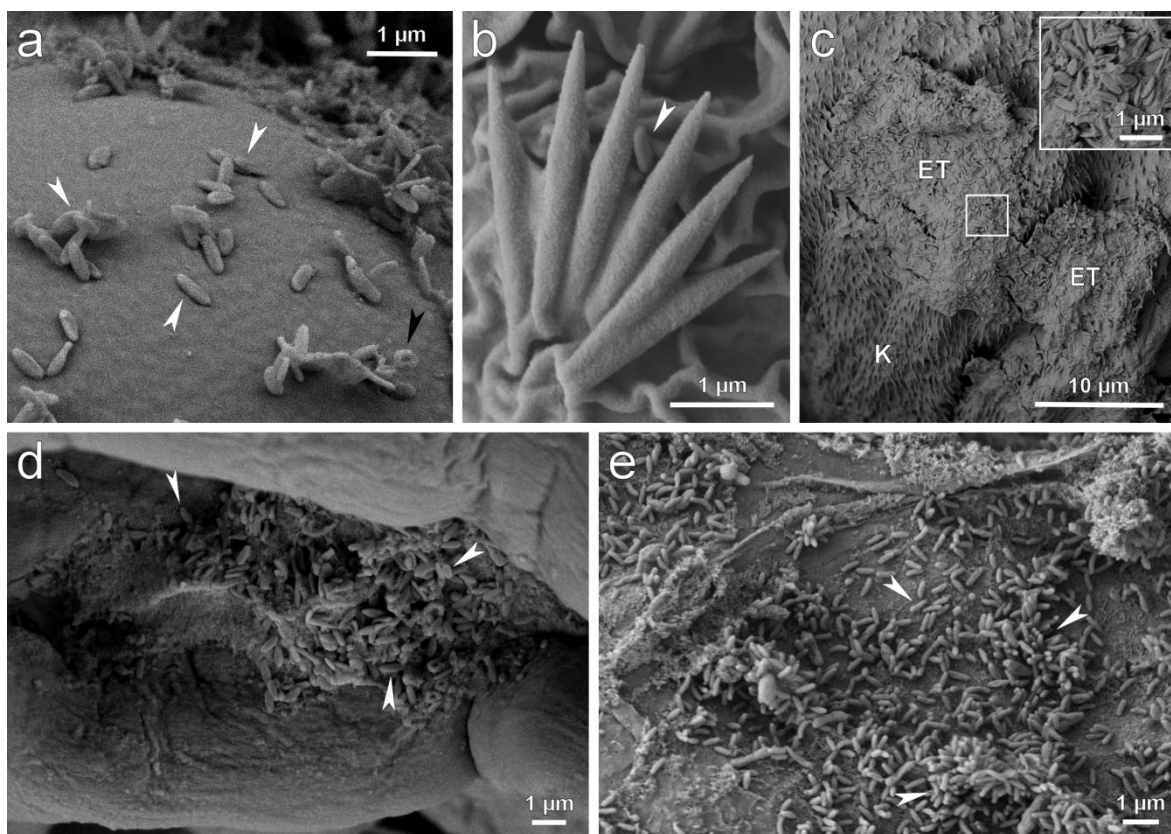
4.3 OKUŽBA ČREVEŠA

Pri živalih v simptomatski fazi okužbe so bile poleg omenjenih lis na hepatopankreasu pogoste tudi patološke spremembe v obliki hipertrofiranih, belo obarvanih celic črevesnega epitela. Te so bile najpogosteje opažene v papilatni regiji, kjer so se pojavljale posamič ali v skupinah (Slika 6a). Elektronska mikroskopija je v omenjenih celicah potrdila rabdoklamidije znotraj citoplazemskih vakuol, v katerih smo opazili vse tri oblike rabdoklamidij (Slika 6c). Vakuole so bile omejene pretežno na bazalne dele celic (Slika 6b), medtem ko so v primeru izrazite okužbe zasedle večino celičnega volumna. Močno okužene črevesne celice so bile večkrat vakuolizirane in so imele deformirana ali celo vakuolizirana jedra (Slika 11d). Na bazalni strani tako opisanih črevesnih celic so se pogosto zbirali hemociti (Sliki 6e in f), ki so lahko prav tako vsebovali rabdoklamidije (Slika 6f). Črevesna kutikula je bila pri živalih z okuženimi črevesnimi celicami intaktna ne glede na stopnjo okuženosti (Slika 11b), medtem ko smo na bazalni strani okuženih celic občasno opazili razpoke in uhajanje rabdoklamidij v hemocel (Slika 6d).

Elementarna telesa so bila pogosta tudi v črevesnem lumnu in na bazalni črevesni površini (Slike 7b, c in d), medtem ko retikularnih teles ni bilo ali so bila deformirana. Poleg rabdoklamidij smo mnogokrat naleteli na razne druge mikroorganizme in gliste.



Slika 6: Znotrajcelična okužba zadnjega črevesa. (a) Belkaste celice (\Rightarrow) v papilarni regiji črevesa (PR). (b) Vakuole (V) z rabdoklamidijami v epitelni celici zadnjega črevesa. J – jedro črevesne celice; barvano z barvilom Richardson. (c) Elementarna (\gg) in retikularna telesa (\triangleright) znotraj vakuole v črevesni celici. \rightarrow – vakuolna membrana; TEM. (d) Sproščanje *R. porcellionis* v hemocel prek razpoke na bazalni površini (B) okužene črevesne celice. M – mišica. Na izseku podrobnejši prikaz razpoke s številnimi elementarnimi telesi tik pod njo; SEM. (e) Zbiranje hemocitov (\Rightarrow) in začetek nastanka nodula na bazalni površini okužene črevesne celice; SEM. (f) Hemociti ob bazalni površini okužene epitelne celice črevesa (EC). H – okužen hemocit, M – mišice, \gg – elementarno telo, \triangleright – retikularno telo; TEM.



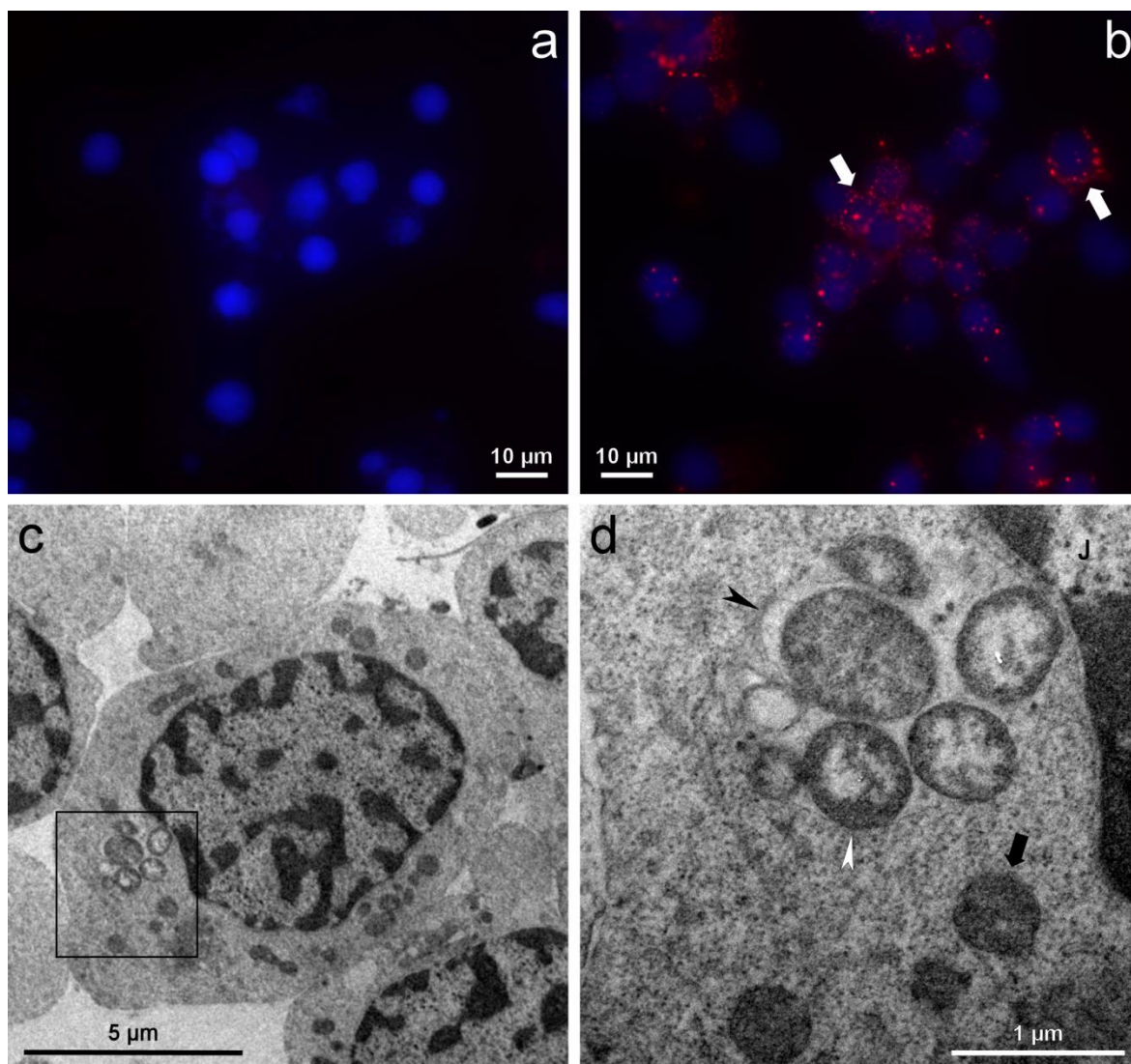
Slika 7: Rabdoklamidije v telesnih votlinah (SEM). (a) Intaktna elementarna telesa (\gg) in deformirana retikularna telesa (\blacktriangleright) na apikalni površini celic hepatopankreasa. (b) Elementarno telo (\gg) na hitinski strukturi sprednjega črevesa. (c) Skupek elementarnih teles (ET) na kutikuli (K) zadnjega črevesa. Na izseku podroben prikaz elementarnih teles. (d) Elementarna telesa (\gg) na bazalni površini zadnjega črevesa. (e) Številna elementarna telesa (\gg) na površini trebušnjače.

4.4 OKUŽBA HEMOCITOV

V hemolimfi *P. scaber* smo lahko ločili tri tipe hemocitov glede na prisotnost granul. Prevladujoči granularni in semigranularni hemociti so vsebovali granule, ki so pri prvih bile večje, medtem ko jih hialini hemociti niso vsebovali ali so bile zelo redke.

Rabdoklamidije smo v krožečih hemocitih simptomatskih živali s TEM opazili redko, opazne pa so bile večinoma kot posamezna retikularna telesa v citoplazemskih vakuolah hialinih in semigranularnih hemocitov. Bistveno pogosteje smo rabdoklamidije v hemocitih zasledili s FISH hemolimfe, s katero smo pozitiven signal za *R. porcellionis* (Slika 8b) opazili pri simptomatskih in nekaterih asimptomatskih živalih.

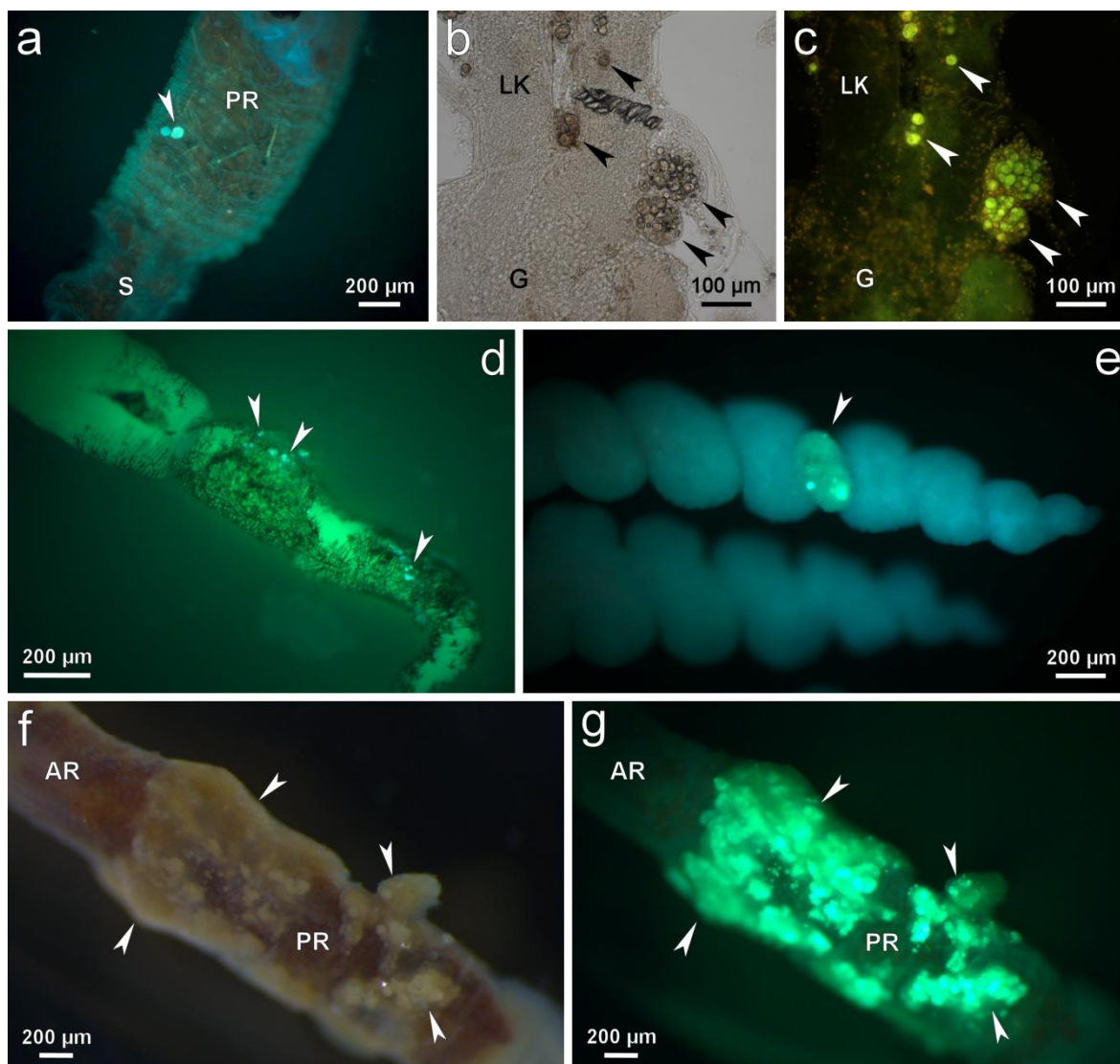
Nekoliko pogosteje so bile rabdoklamidije opažene v hemocitih hemopoetskega organa, kjer so bila opažena retikularna telesa posamezno ali v manjših skupinah, obdanih z membrano (Slike 8c in d). Različno velike skupke rabdoklamidij smo zasledili tudi v zbirajočih hemocitih na površini močno okuženih črevesnih celic (Slika 6f), v nodulih (Slike 12 c, e in f) ter v zbirajočih hemocitih ob trebušnjači (Slika 13). Hemociti, v katerih smo opazili rabdoklamidije, citoplazemskih granul niso vsebovali oziroma je bilo teh malo.



Slika 8: Okužba hemocitov. (a) Hemociti iz hemolimfe asimptomatske živali brez rdečega fluorescentnega signala po hibridizaciji z oligonukleotidno sondo, specifično za *R. porcellionis*. Moder signal – jedra barvana z DAPI. (b) Hemociti iz hemolimfe živali v simptomatski fazi okužbe. Rdeč fluorescentni signal (⇔) po hibridizaciji z oligonukleotidno sondo, specifično za *R. porcellionis*. Moder signal – jedra barvana z DAPI. (c) Okužen hemocit v hemopoetskem organu; TEM. (d) Vakuola (➤) z retikularnimi telesi (➤) v hemocitu iz slike (c). J – jedro hemocita, ➤ – mitohondrij.

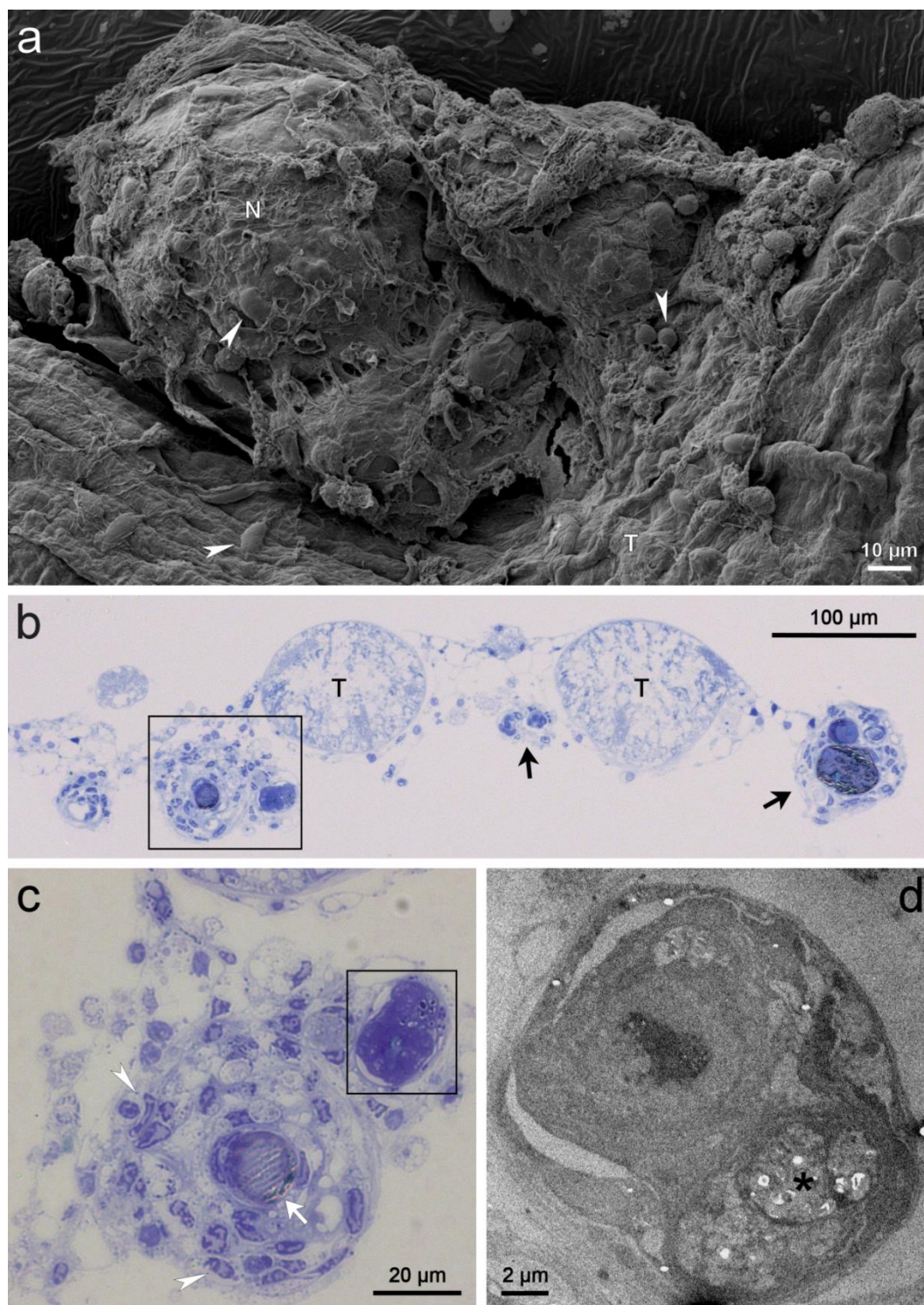
4.5 NODULACIJA

Poleg omenjenih lis na hepatopankreasu in belih celic črevesa so bile pri simptomatskih živalih pogoste tudi patološke spremembe v obliki nodularnih struktur. Te smo opazili na površini črevesa, trebušnjake, testisov, ovarijev, prebavnih žlez, v vezivu, okončinah in hemolimfi.

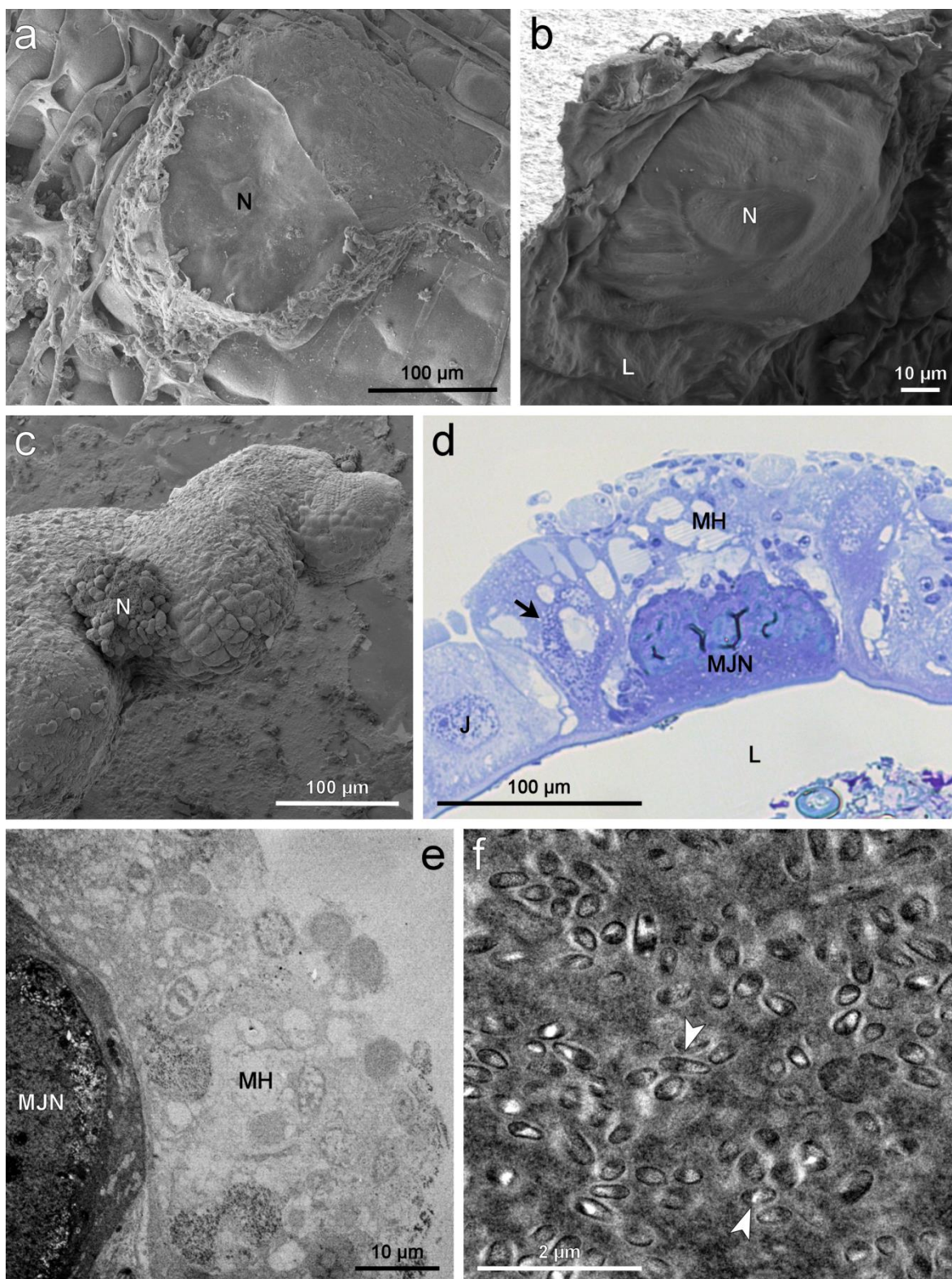


Slika 9: Avtofluorescenca nodularnih struktur na organih okuženih živali. (a) Avtofluorescenca črevesnih nodulov (➤) ob ekscitaciji z modro svetlobo. PR – papilatna regija črevesa (PR), S – sfinkter. (b) Melanizirane nodularne strukture (➤) na površini trebušnjače pod presevno svetlobo in (c) iste strukture (➤) ob ekscitaciji z modro svetlobo. LK – longitudinalni konektiv, G – ganglij. (d) Noduli na moških spolnih organih (➤) ob ekscitaciji z modro svetlobo. (e) Izražanje avtofluorescence nodula na hepatopankreasu. (f) Številni noduli vzdolž papilatne regije (PR) pod presevno svetlobo (➤) in (g) ob ekscitaciji z modro svetlobo (➤). AR – anteriorna regija črevesa.

Noduli so dosegali različne velikosti večinoma od 20 μm do 200 μm v premeru. Bili so enostavni z enim melaniziranim jedrom (Slika 9a) ali grozdasto oblikovani z več melaniziranimi jedri (Sliki 9b in c). Melanizirani deli nodulov so bili svetlo rjave barve. Pogosto so bili izredno trdi. Opazna je bila tudi avtofluorescenca melaniziranih delov (Slika 9). Najintenzivneje se je izražala pod modro svetlobo in precej manj ob ekscitaciji z zeleno svetlobo, medtem ko je pod UV svetlobo nismo zasledili.



Slika 10: Noduli na površini trebušnjače. (a) Nodul (N) in posamezni hemociti (\gg) na površini trebušnjače (T); SEM. (b) Noduli (\rightarrow) v bližini trebušnjače (T); barvano z barvilom Richardson. (c) Povečava nodulov iz slike (b). Simetrično razporejeni hemociti (\gg) okoli melanizirane sredice nodula (\Rightarrow). (d) Celični ostanki (\star), ujeti v melanizirano sredico nodula iz slike (c); TEM.



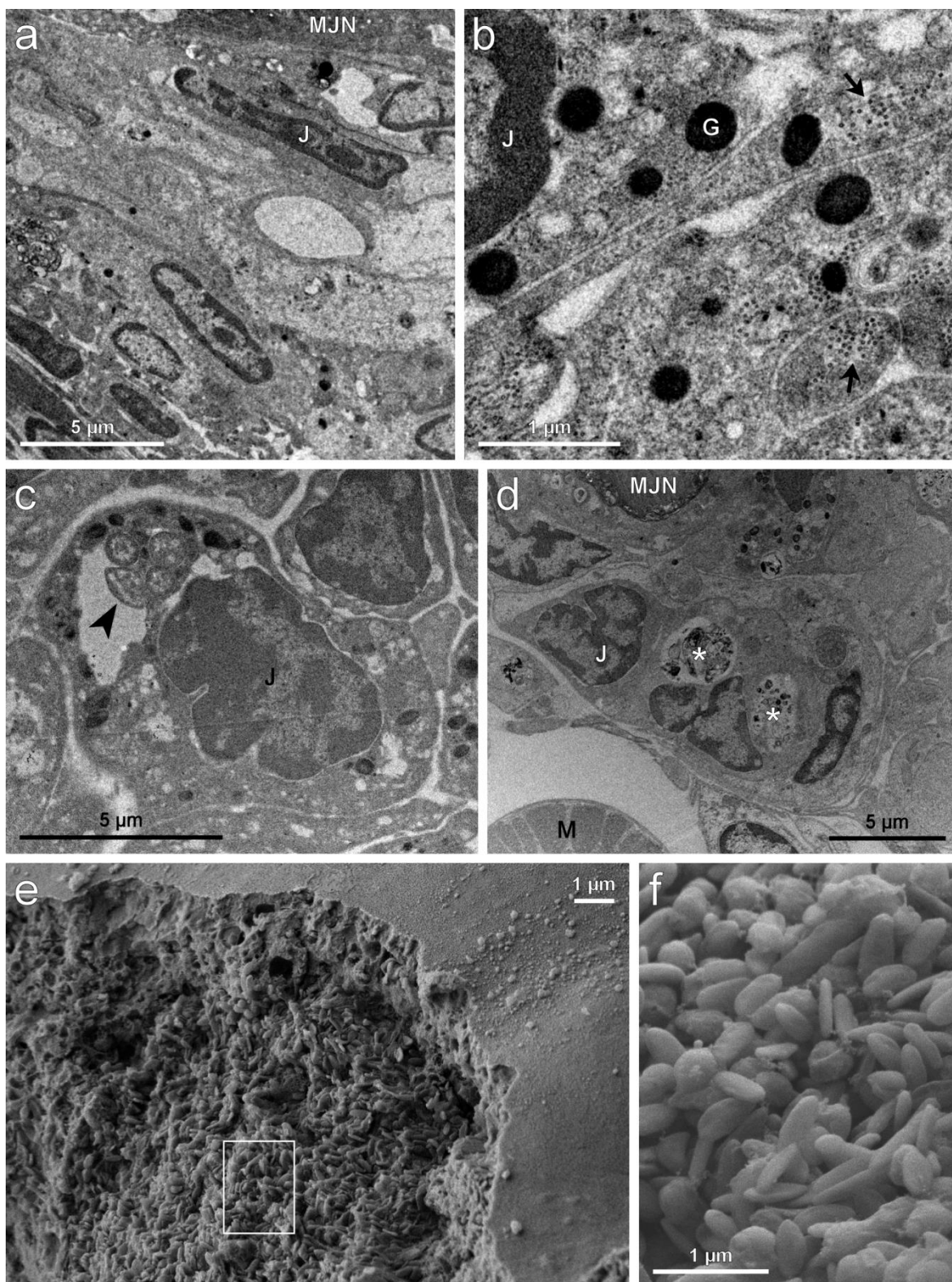
Slika 11: Nodularne strukture prebavnega sistema. (a) Nodul (N) na bazalni površini zadnjega črevesa; SEM. (b) V lumen črevesa (L) segajoč nodul (N), pokrit z intaktno črevesno kutikulo; SEM. (c) Asimetričen nodul (N) na površini okuženega hepatopankreasa; SEM. (d) Asimetrični nodul v steni zadnjega črevesa. MJN – melanizirano jedro nodula, MH – masa hemocitov, J – intaktno jedro črevesne celice, → – vakuolizirano jedro okužene črevesne celice, L – črevesni lumen; barvano z barvilom Richardson. (e) Prečni prerez

asimetričnega črevesnega nodula z melaniziranim jedrom (MJN) in maso hemocitov (MH) na periferiji; TEM. (f) Elementarna telesa (\gg) v melanizirani sredici nodula; TEM.

Melanizirana jedra nodulov so bila navadno z vseh strani enakomerno obdana z večplastno maso hemocitov. Od zunanjih proti notranjim plastem so postajali hemociti in njihova jedra čedalje bolj sploščena (Slika 10). Takšni, simetrično grajeni noduli, so se pojavljali predvsem na površini trebušnjače, testisov, ovarijev in prosto v hemocelu, medtem ko so imeli črevesni noduli večinoma asimetričen videz (Slika 11). Melaniziran, elektronsko gost del je namreč pogosto segal vse do kutikule na apikalni strani črevesnih celic (Sliki 11b in d), novi hemociti pa so se nalagali le na bazalni strani celice, obrnjeni proti hemocelu (Slika 11d). Asimetrični noduli so bili opaženi tudi na hepatopankreasu (Slika 11c).

Ultrastruktura nodulov je pokazala, da okoli melaniziranega dela prevladujejo hemociti brez ali z maloštevilnimi citoplazemskimi granulami, kar ustreza strukturi hialinih oziroma semigranularnih hemocitov (Slika 12). Celična integriteta hemocitov je bila velikokrat porušena. Pogosta je bila tudi vakuolizacija celic (Sliki 11d in e). Nekateri hemociti so vsebovali veliko število mikrotubulov (Slika 12b) ali lizosomom podobne vakuole s celičnimi ostanki (Slika 12d).

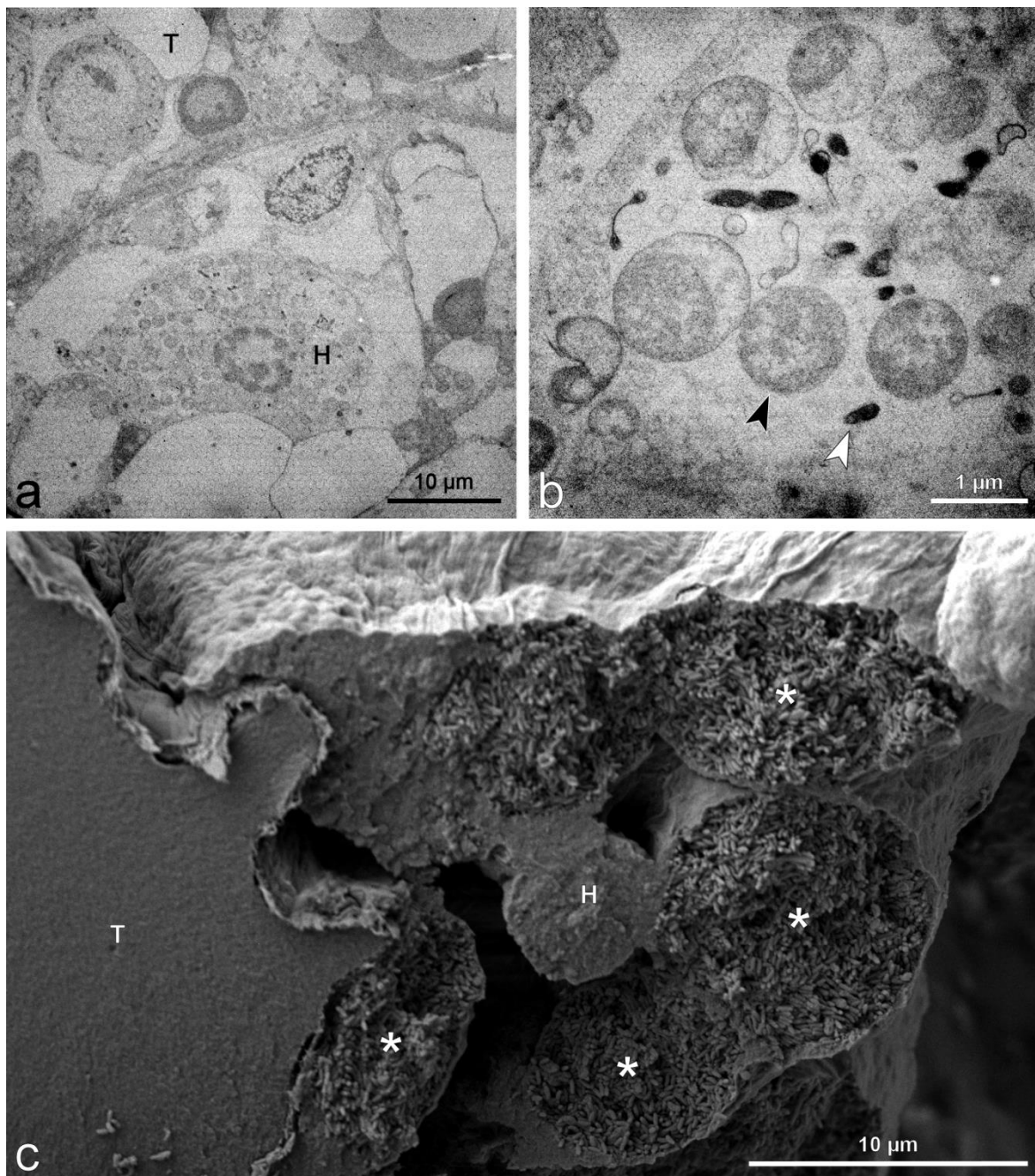
Rabdoklamidije so bile najštevilčnejše v črevesnih nodulih, kjer so bile pretežno omejene na osrednji, melaniziran del nodula, v katerem so bile lahko podvržene morfološkim spremembam ali pa je bila njihova ultrastruktura ohranjena (Slika 11f). Občasno smo rabdoklamidije opazili tudi v hemocitih stene nodula (Slike 12 c, e in f).



Slika 12: Hemociti na periferiji črevesnih nodulov. (a) Sploščena jedra (J) semigranularnih hemocitov okoli melaniziranega jedra nodula (MJN); TEM. (b) Semigranularni hemociti s številnimi mikrotubuli (→). J – jedro semigranularnega hemocita, G – granula; TEM. (c) Retikularna telesa (▶) v vakuoli semigranularnega hemocita iz zunanjih plasti nodula. J – jedro hemocita; TEM. (d) Celični ostanki (✱) v vakuoli hialinega

hemocita. MJN – melanizirano jedro nodula, M – mišice; TEM. (e) Hemocit s številnimi elementarnimi telesi; SEM. (f) Elementarna telesa znotraj hemocita iz slike (e); SEM.

4.6 OKUŽBA OSTALIH ORGANOV



Slika 13: Rabdoklamidijska okužba na površini trebušnjače. (a) Okužen hialini hemocit (H) ob površini trebušnjače (T); TEM. (b) Retikularna (➤) in elementarna (➤) telesa v vakuoli hemocita iz slike (a). (c) Hemociti (H) iz periferije nodula na površini trebušnjače (T). Številna elementarna telesa v vakuolah hemocitov (*).

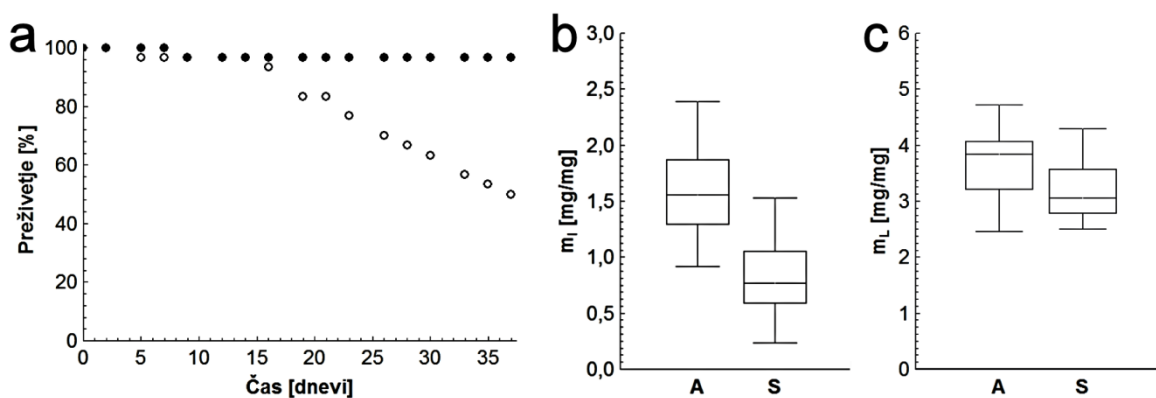
Znotrajcelične okužbe z rabdoklamidijami v tkivih trebušnjače in spolnih organov nismo potrdili. Rabdoklamidije so bile občasno prisotne zgolj v hemocitih ob nodulih (Slika 13)

in v nodulih na površini teh organov. Ti so se pojavljali pri živalih z izrazito okuženimi prebavnimi žlezami, pri katerih smo rabdoklamidije pogosto opazili v obliki prostih elementarnih teles na njihovi površini (Slika 7e).

Pri nekaterih močno oslabeledih osebkih z okuženim razpadajočim hepatopankreasom so tudi trebušnjača in spolni organi pogosto izgubili normalno čvrstost, medtem ko drugih morebitnih patoloških sprememb, kot so bele lise, na teh organih nismo opazili.

4.7 PREHRANJEVALNI POSKUS

V 37-dnevem prehranjevalnem poskusu je poginila polovica simptomatskih živali ($n=30$), medtem ko smo v kontrolni skupini brez vidnih simptomatskih znakov okužbe zabeležili 3,3 % smrtnost ($n=30$) (Slika 14a). V kontrolni skupini je poginil osebek, ki se je pripravljajal na levitev in ni kazal znakov okužbe. Pri poginulih osebkih iz simptomatske skupine so bile opazne izrazite patološke spremembe predvsem na hepatopankreasu in mnogokrat tudi na črevesu. Hepatopankreas je bil pogosto blede rumene barve in mehak ter večkrat tudi deformiran do meje razpoznavnosti simptomatskih belih lis, medtem ko so patološke spremembe črevesa pogosto vključevale številne nodule vzdolž papilatne regije. Okužene živali so nekaj dni pred smrtjo navadno izgubile telesni tonus in normalno čvrstost.



Slika 14: Prehranjevalni poskus. (a) Odstotek preživelih živali tekom 37-dnevnega poskusa. ● – asimptomatske živali, ○ – simptomatske živali ($n=30$). (b) Suha masa iztrebkov (m_i) asimptomatskih (A) in simptomatskih (S) živali, podana na maso žive živali ob koncu poskusa ($p<0,001$). (c) Masa zaužitega listja (m_L) asimptomatskih (A) in simptomatskih (S) živali, podana na maso žive živali ($p<0,02$).

Posebni sprememb v gibanju in agilnosti simptomatskih živali nismo zasledili, izrazit pa je bil upad prehranjevanja, saj smo po 37-ih dneh opazili statistično značilno razliko med skupinama tako v masi zaužitih listov ($p<0,02$) kot tudi v masi iztrebkov ($p<0,001$) (Sliki 14b in c). Asimptomatske živali so na mg telesne mase zaužile povprečno $3,67 \text{ mg} \pm 0,11 \text{ mg}$, medtem ko so simptomatske zaužile $3,20 \text{ mg} \pm 0,15 \text{ mg}$ leskovih listov. Povprečna masa iztrebkov na mg telesne mase v skupini asimptomatskih osebkih je znašala $1,58 \text{ mg} \pm 0,08 \text{ mg}$ in pri simptomatskih $0,82 \text{ mg} \pm 0,12 \text{ mg}$.

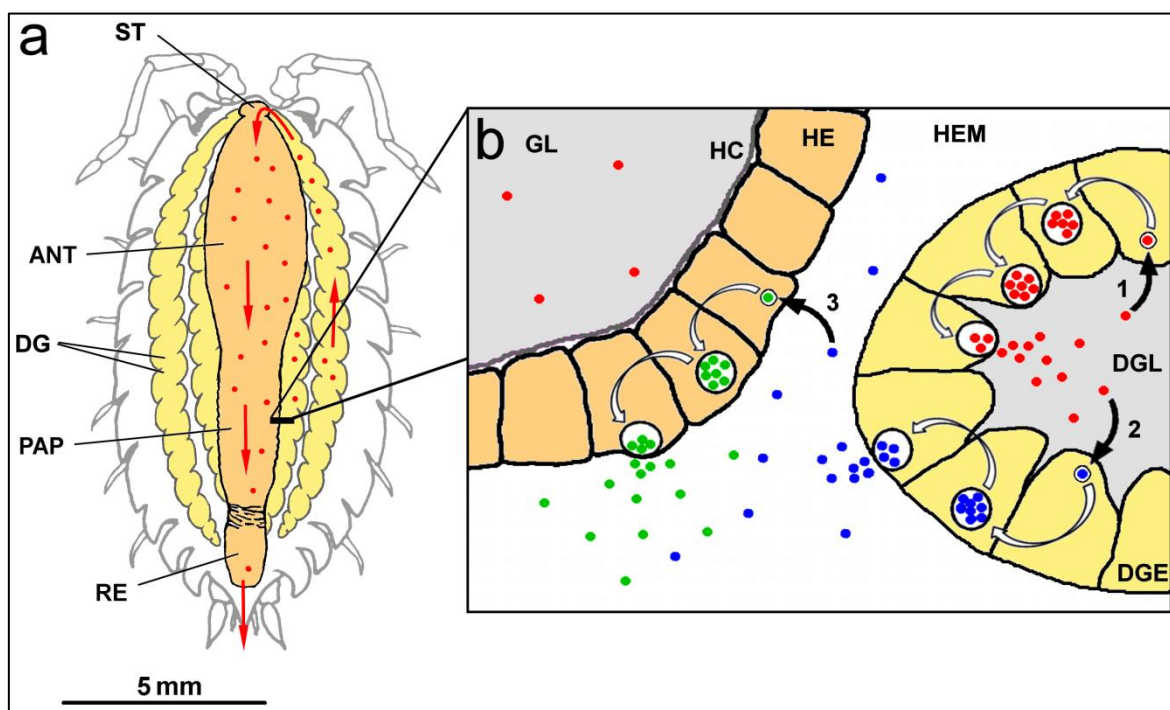
Med poskusom pri samicah ni prišlo do razvoja marzupija. Med asimptomatskimi in simptomatskimi osebki nismo zasledili očitnih razlik v levitvenem ciklu. Večina preživelih živali se je tekom poskusa levila enkrat. Od pojava kalcijevih depozitov do levitve zadnjega dela telesa je v večini primerov minilo 4 do 7 dni. Živali so zlevljeno kutikulo navadno v celoti pojedle.

5 RAZPRAVA

Morfologija bakterij, ki smo jih opazili v vakuolah celic hepatopankreasa pri simptomatskih enakonožnih rakih *P. scaber*, ustreza opisom okužbe z *R. porcellionis* (Drobne in sod., 1999; Kostanjšek in sod., 2004). Pri tem uporabljeni metodi TEM in SEM sta se zaradi specifičnih morfoloških lastnosti in razvojnega cikla rabdoklamidij izkazali primerni za prepoznavanje rabdoklamidij tudi v celicah drugih organov enakonožca. Kljub temu da nestabilna retikularna telesa, podobno kot pri drugih klamidijah, izven gostiteljskih celic kmalu propadejo (Wyrick, 2000), pa petslojna celična stena (Drobne in sod., 1999; Kostanjšek in sod., 2004) elementarna telesa *R. porcellionis* dobro varuje pred osmotskimi spremembami. Posledično ta ohranijo morfologijo ne glede na postopek priprave vzorca, kar omogoča njihovo razlikovanje od celičnih struktur gostiteljevih tkiv in drugih mikroorganizmov ter njihovo sledenje v telesu gostitelja.

Poleg omenjenih metod je za neposredno dokazovanje rabdoklamidij v tkivih gostitelja ali v celični kulturi prav tako uporabna metoda FISH (Kostanjšek in sod., 2004; Sixt in sod., 2013). Ta ima sicer omejeno uporabnost zaradi avtofluorescence nodulov, kot učinkovita pa se je izkazala za odkrivanje rabdoklamidij v vzorcih hemolimfe.

5.1 POTEK OKUŽBE V TELESU GOSTITELJA



Slika 15: Predvideni potek okužbe z *R. porcellionis* v telesu gostitelja *P. scaber*. (a) Prehajanje (→) *R. porcellionis* (•) iz hepatopankreasa (DG) v želodec (ST), anteriorno regijo zadnjega črevesa (ANT) in papilarno regijo zadnjega črevesa (PAP) ter preko rektuma (RE) sproščanje v zunanje okolje z iztrebki ali med levitvijo črevesa. (b) Podroben prikaz poti okužbe v prebavnem sistemu. → – začetek okužbe posamezne poti, ⇒ – zaporedne faze okužbe znotraj ene celice. 1 – Primarna okužba celic hepatopankreasa. Vstop *R. porcellionis* (•) iz lumna hepatopankreasa (DGL) skozi apikalno membrano celic hepatopankreasa

(DGE) in sproščanje nazaj v DGL z možnostjo širjenja *R. porcellionis* v lumen črevesa (prikazano na sliki (a)). 2 – Vstop *R. porcellionis* (●) iz lumna hepatopankreasa skozi apikalno membrano celic hepatopankreasa (DGE) in sproščanje iz njih preko bazalne membrane v hemocel (HEM). 3 – Okužba epitelnih črevesnih celic (HE). Vstop *R. porcellionis* (●) iz hemocela v HE preko bazalne membrane in sproščanje nazaj v HEM. Sproščanje *R. porcellionis* v lumen črevesa (GL) preprečeno s črevesno kutikulo (HC) (Kostanjšek in Pirc Marolt, 2014).

5.1.1 Vstop *R. porcellionis* v gostitelja

Vidni znaki okužbe z *R. porcellionis* se v začetni fazi okužbe najprej pojavijo kot bele pike na posamezni cevki prebavnih žlez. Te se kasneje razširijo na vse cevke, njihova gostota pa se postopno povečuje, zato predvidevamo, da je hepatopankreas, tako kot pri večini okužb rakov (Fryer in Lannan, 1994) vstopno mesto oziroma primarni organ okužbe. Kljub temu okužba ni omejena na omenjeni organ, kot je z molekulskimi metodami nakazala že predhodna študija (Gjureč, 2009), z mikroskopijo pa smo to potrdili tudi v naši raziskavi. Vnos rabdoklamidij v enakonožca najverjetneje poteka s prehranjevanjem s kontaminirano hrano, iztrebki ali s kanibalizmom okuženih osebkov, ki so poznane poti vnosa tudi drugih mikroorganizmov (Kautz in sod., 2002; Zimmer, 2002; Stentiford in sod., 2004; Le Clec'h in sod., 2013).

Zaužite rabdoklamidije verjetno lahko prehajajo iz želodca v hepatopankreas. Dejstvo je, da so razne bakterije v lumnu hepatopankreasa pogosto prisotne (Zimmer, 2002; Kostanjšek in sod., 2006), čeprav kompleksen filtrirni sistem preprečuje prehod večjih delcev v lumen hepatopankreasa in prepušča le tekočino ter izredno majhne delce (Hames in Hopkin, 1989). Mnenja o velikosti delcev, ki še lahko prehajajo prek filtra, so deljena, 40 nm po Hamesu in Hopkinu (1989) oziroma 1,17 μm po Woodu in Griffithsu (1988) (cit. po Zimmer, 2002). Če slednje drži, bi se elementarna telesa rabdoklamidij zlahka izmuznila v hepatopankreas, saj le redko dosežejo velikost 1 μm (Drobne in sod., 1999). Okužba hepatopankreasnih celic po vsej verjetnosti poteče iz lumna cevk preko apikalne membrane, kar nakazuje tudi velika gostota rabdoklamidijskih vakuol v apikalnem delu celic.

Vstop zaužitih rabdoklamidij v tkiva *P. scaber* preko črevesa je manj verjeten. Lumen črevesa namreč prekriva kutikula, ki se pri *P. scaber* razteza vzdolž celotne prebavne cevi (Bettica in sod., 1987) in domnevno, tako kot kutikula na telesni površini, ščiti pred vstopom patogenov v telo organizma (Martin in sod., 2004). Omenjena domneva je podprta tudi z našimi opazovanji, saj je bila črevesna kutikula vedno intaktna, ne glede na levitveno fazo in pogosto prisotnost rabdoklamidij v črevesnih celicah. Poleg tega so vakuole z rabdoklamidijami v začetni fazi infekcije črevesnih celic pretežno omejene na njihove bazalne dele, kar kaže na vstop bakterij z bazalne strani, torej ravno obratno kot to velja za hepatopankreas.

5.1.2 Širjenje *R. porcellionis* iz hepatopankreasa

V vakuolah celic hepatopankreasa se rabdoklamidije močno namnožijo, čemur sledi sproščanje v lumen organa (Drobne in sod., 1999). Ta je tako pogosto poln rabdoklamidij, zato predvidevamo, da je hepatopankreas tudi osrednje mesto okužbe (Slika 15b). Iz lumna hepatopankreasa rabdoklamidije domnevno potujejo preko želodca v lumen anteriorne in papilatne regije zadnjega črevesa ter preko rektuma zapustijo telo gostitelja z iztrebki ali med levitvijo črevesa (Slika 15a).

Poleg sproščanja preko apikalne membrane predvidevamo tudi širjenje rabdoklamidij preko bazalnih delov okuženih celic hepatopankreasa (Slika 15b). Na bazalnih delih so se namreč občasno pojavile razpoke na izbočenih delih hepatopankreasa, ki so ustrezali obliki vakuol. Pojav je značilen za kasnejše faze okužbe in je opazen precej redkeje kot sproščanje rabdoklamidij preko apikalne membrane. Slednjo domnevo podpira tudi redko opažanje asimetričnih nodulov na hepatopankreasu, katerih nastanek domnevno sproži stik sproščenih rabdoklamidij s hemociti v hemolimfi. Čeprav sproščanje rabdoklamidij prek bazalnih delov celic hepatopankreasa ni pogosto opaženo, pa bi lahko igralo pomembno vlogo v biologiji rabdoklamidij, saj bi jim omogočalo vdor v hemocel in širjenje po telesu gostitelja (Wyrick, 2000).

5.1.3 Okužba črevesa

Glede na pogostost patoloških sprememb na črevesu izrazito simptomatskih živali in uspešno razmnoževanje rabdoklamidij (prisotnost vseh treh oblik) v črevesnih celicah domnevamo, da se rabdoklamidije verjetno iz hepatopankreasa preko hemocela pogosto razširijo na črevo (Slika 15). Bazalni površini hepatopankreasa in črevesa se tudi tesno stikata (Hames in Hopkin, 1989), kar bi lahko dodatno olajšalo širjenje rabdoklamidij po črevesu. Podobno kot pri celicah hepatopankreasa razmnoževanje rabdoklamidij v citoplazemskih vakuolah črevesnih celic sčasoma privede do sproščanja rabdoklamidij, vendar je to zaradi črevesne kutikule na apikalnem delu črevesnih celic najbrž omejeno na njihove bazalne dele (Slika 15b). Sproščanje bakterij v hemocel lahko privabi hemocite in izzove tvorbo asimetričnih nodulov. Za razliko od okuženega hepatopankreasa, se znaki črevesne okužbe večinoma pojavljajo lokalno, kar še dodatno podpira predpostavko o primarnem širjenju bakterij iz hepatopankreasa v črevo. Najpogosteje so opazni na papilatni regiji, kjer so bazalni deli celic med snopi mišičnih vlaken izbočeni v hemolimfo (Hassall in Jennings, 1975) in so tako bolj izpostavljeni vdoru patogenov, zato je okužba v tem delu verjetnejša.

5.1.4 Sproščanje *R. porcellionis* iz gostiteljske celice

Klamidije se lahko iz celic sproščajo z razpadom gostiteljske celice, z odcepom celotne vakuole ali po zlitju vakuolne in plazemske membrane gostiteljske celice (Everett in sod., 1999; Hybiske in Stephens, 2007, 2008). Slednja načina omogočata preživetje gostiteljske

celice, medtem ko je prvi zanj usoden in lahko izzove hude vnetne odzive (Hybiske in Stephens, 2007, 2008).

Za sproščanje z lizo gostiteljskih celic je značilna liza vakuole, ki ji sledi liza jedra in razpad gostiteljske celice (Hybiske in Stephens, 2007). V nekaterih močno okuženih črevesnih celicah *P. scaber* so rabdoklamidije vidne prosto v citoplazmi, kar kaže na lizo vakuole. Celice so pogosto vakuolizirane in jedra občasno deformirana. Sproščanje rabdoklamidij z lizo gostiteljskih celic so opazili tudi pri gojenju *R. porcellionis* v celicah žuželk (Sixt in sod., 2013), zato je takšen način razširjanja verjetnejši pri okužbi celic, ki ne predstavljajo optimalnega okolja za rabdoklamidijsko razmnoževanje.

Poleg tega so Drobne in sod. (1999) zabeležili odcepitev celotnih skupin vakuol z *R. porcellionis* v hepatopankreasu *P. scaber*. Opazna je tudi sprostitvev rabdoklamidij iz vakuole na apikalni površini hepatopankreasa, ki spominja na sproščanje klamidij po zlitju obeh membran. Preživetje gostiteljske celice ob sprostitvi patogenov je za znotrajcelične patogene izrednega pomena, saj se na tako lahko izognejo stimulaciji imunskih celic in omogočajo kronično okužbo in s tem dolgotrajno izkoriščanje gostiteljskih celic (Hybiske in Stephens, 2007, 2008). Na kronično okužbo z *R. porcellionis* kažejo tudi rezultati prehranjevalnih poskusov, ki so razkrili večtedensko trajanje simptomatske faze okužbe in metabolno aktivnost okuženih živali (Drobne in sod., 1999). Omenjeni način razširjanja je tako za razliko od lize celic verjetnejši pri celicah, na katere je rabdoklamidija najbolj prilagojena in so tako osrednje mesto okužbe.

Rabdoklamidije so torej v celicah hepatopankreasa precej dobro zavarovane pred celičnim imunskim odzivom, če se nahajajo znotraj vakuol in dokler niso poškodbe gostiteljske celice zaradi sproščanja rabdoklamidij prehude za normalno delovanje celice ali dokler se sproščajo preko apikalne membrane v lumen žleze, kjer hemocitov ni. Ko pridejo v stik s hemociti v telesni votlini, pa ti proti rabdoklamidijam sprožijo obrambne mehanizme, kot sta že omenjena nodulacija večjih skupkov in fagocitoza posameznih bakterij.

5.1.5 Prisotnost *R. porcellionis* v hemocitih

Medtem ko so opazovanja s TEM kazala na redko prisotnost rabdoklamidij v hemocitih iz hemolimfe, pa je bila ta na podlagi opazovanj s FISH bistveno pogostejša. Do razlik je lahko prihajalo zaradi samih lastnosti uporabljenih metod, saj FISH omogoča pregled precej večjega števila celih celic v primerjavi s TEM. Eden izmed razlogov za razlike bi lahko bil tudi postopek priprave hemolimfe, ker smo jo samo za metodo TEM centrifugirali in s supernatantom morda izgubili najbolj okužene celice. V vzorcih za TEM je bilo namreč zelo malo hialinih celic, pri katerih smo zaradi njihove glavne fagocitotne aktivnosti (Chevalier in sod., 2011) pričakovali največ rabdoklamidij. Omejeno fagocitotno sposobnost imajo tudi semigranularni hemociti (Chevalier in sod., 2011), v katerih smo poleg hialinih hemocitov prav tako občasno opazili posamezne rabdoklamidije, tako da krožeči hemociti domnevno sodelujejo pri odstranjevanju

posameznih rabdoklamidij iz hemocela. Posledično je možno, da v hemocitih prej ali slej pride do razgrajevanja rabdoklamidij in jih ne bi uspeli razločiti s TEM, medtem ko bi lahko bil njihov dedni material še prisoten, kar bi omogočilo sledenje s FISH.

V primerjavi s hemolimfnimi hemociti smo s TEM rabdoklamidije v hemocitih hemopoetskega organa opazili pogosteje. Kljub temu pa so bile te vedno vidne večinoma kot manjša skupina retikularnih teles, kar kaže na suboptimalne pogoje za normalno razmnoževanje rabdoklamidij. Podobno so predlagali tudi Sixt in sodelavci (2013) za žuželčje celične linije, v katerih prav tako ni bilo popolnoma diferenciranih elementarnih teles *R. porcellionis*.

Možno je, da so elementarna telesa sposobna vstopa v hemocite in pretvorbe v retikularna telesa, ki se znotraj hemocitov omejeno razmnožujejo. Znano je, da se razsežnost okužbe s klamidijami med različnimi tipi celic vretenčarjev razlikuje. Klamidije primarno kolonizirajo epitelne celice (Wyrick, 2000; Dautry-Varsat in sod., 2004), čeprav se pojavljajo tudi v drugih celicah. Nekatere klamidije (*Chlamydia* sp.) se lahko v določenih celicah imunskega sistema vretenčarjev normalno množijo, spet druge lahko vanje zgolj vstopijo in se pretvorijo v persistentne oblike ali se sčasoma razgradijo, lahko pa je njihovo razmnoževanje omejeno (Rusconi in Greub, 2011).

Bolj prepričljive dokaze za uspešno okužbo v hemocitih enakonožca smo zasledili le v hemocitih, ki so se zbirali v bližini nodulov. Pogostejši so bili sicer hemociti s posameznimi retikularnimi telesi, a smo med njimi naleteli na nekaj hemocitov z retikularnimi in elementarnimi telesi v vakuoli, kar kaže na razmnoževanje rabdoklamidij. Morda lahko *R. porcellionis* učinkovito okuži hemocite, če so ti v stresu, ki domnevno nastane ob obsežnem sproščanju rabdoklamidij. Takrat se pričnejo množično zbirati hemociti in oblikovati nodule, kar pogosto privede do morfoloških sprememb hemocitov, morda na račun izgube integritete jedra in organelov, vakuolizacije, izločanja celične vsebine in razpada celic, kot je to znano v začetnih fazah nodulacije pri žuželkah (Ratcliffe in Gagen, 1977).

Učinkovita okužba hemocitov bi lahko predstavljala pomembno pot širjenja rabdoklamidij po telesu gostitelja. Vakuole z rabdoklamidijami (*R. crassificans*) so opazili tudi v hemocitih ščurkov (Radek, 2000). Poleg tega takšen način predpostavljajo pri nekaterih drugih znotrajceličnih bakterijah, kot je *Wolbachia* pri enakonožcu *A. vulgare* (Chevalier in sod., 2011). Kljub temu je glede na redko pojavljanje *R. porcellionis* v hemocitih iz hemolimfe takšen prenos pri *P. scaber* manj verjeten.

5.1.6 Nodulacija

Nodulacija je pomemben del celičnega odziva nevretenčarskega organizma na prisotnost patogenov (Ratcliffe in Gagen, 1976; Battistella in sod., 1996; Jiravanichpaisal in sod., 2006). Pri *P. scaber* noduli predstavljajo ključno obrambo pri omejevanju širjenja večjega

števila rabdoklamidij. Njihova struktura precej spominja na nodule žuželk, ki sta jih podrobno raziskala Ratcliffe in Gagen (1976, 1977). Ugotovila sta, da jedro izoblikovanega nodula tvori masa nekrotizirajočih celic, bakterij in melanina. Nekrotizirajoči celični material v sredini nodula izvira pretežno iz granulocitov. Sprostitev granul iz teh celic sproži nastanek več jeder ekstracelularnega materiala, ki se širijo in sčasoma melanizirajo ter tvorijo bolj ali manj enotno melanizirano sredico. Bakterije so le redko fagocitirane in večinoma ujete v melaniziran ekstracelularni material, kjer lahko še precej dolgo ohranijo intaktno obliko.

Melanizirano sredico nodulov *P. scaber* obdaja množica hemocitov, ki so urejeni v več plasti. Notranje plasti sestavljajo bolj ali manj sploščene celice in na periferiji plasti novo pritrjenih hemocitov, kar ustreza strukturi žuželčjih nodulov (Ratcliffe in Gagen, 1976, 1977). Poleg tega se v omenjenih plasteh, podobno kot pri žuželkah (Ratcliffe in Gagen, 1977), pojavljajo nekrotizirajoči hemociti in hemociti s številnimi mikrotubuli, medtem ko je fagocitoza bakterij manj pogosta. Pri enakonožcu se v hemocitih črevesnih nodulov pogosto pojavljajo tudi vakuole z rabdoklamidijami ali nerazpoznavno vsebino, ki najverjetneje vključuje ostanke hemocitov, črevesnih celic in rabdoklamidij.

Na podlagi naših rezultatov ni povsem jasno, katera podskupina hemocitov sproži nastanek nodula pri *P. scaber*, saj smo opazovali predvsem zadnje faze nodulacije. V vzorcih hemolimfe smo lahko razlikovali med granularnimi, semigranularnimi in hialinimi hemociti, kot so opisani v enakonožcu *Armadillidium vulgare* (Chevalier in sod., 2011). Medtem ko pri njem, tako kot pri drugih rakah (Johansson in sod., 2000), glavno vlogo v enkapsulaciji prevzamejo semigranularni in granularni hemociti, pa pri *P. scaber* okoli melaniziranega dela nodula prevladujejo hialini in semigranularni hemociti. Glede na prisotnost granularnih hemocitov v masi zbirajočih se hemocitov ob okuženih celicah je prav tako možno, da pri začetnih fazah nodulacije sodelujejo granularni hemociti.

Kljub temu da lastnosti opaženih nodulov v glavnem ustrezajo tistim iz literature, smo zabeležili nekaj posebnosti. Melanizirani noduli *P. scaber* so bili izredno trdi, kar v dostopni literaturi ni posebej poudarjeno. Opazili smo tudi, da melanizirani deli nodulov močno fluorescirajo pod modro svetlobo, česar v literaturi prav tako doslej nismo zasledili.

Natančen vzrok avtofluorescence melaniziranih nodulov tako ni poznan. Izključili smo fluorescenco klamidij, saj je nismo zasledili v belih lisah hepatopankreasa, kjer so zgoščene rabdoklamidije. Poleg tega fluorescirajo tudi noduli, povzročeni z drugimi mikroorganizmi. Malo verjetna je tudi fluorescenca melanina, ki velja za nefluorescirajoči pigment, kar pa ne velja nujno za njegove prekurzorje (razni kinoni in fenoli) in metabolite. Znano je namreč, da lahko ob primernih pogojih z oksidacijo melanina nastanejo fluorescirajoči razgradnji produkti (Elleder in Borovansky, 2001; Kayatz in sod., 2001).

Poleg tega raziskave kažejo, da ima pri *P. scaber* in ostalih izopodnih rakih v imunskem odgovoru pomembno fenoloksidazno aktivnost hemocianin, ki deluje kot katehol oksidaza (Jaenicke in sod., 2009). Posledično so morda substrati in produkti fenoloksidazne poti aktivacije telesne obrambe nekoliko drugačni kot pri običajni fenoloksidazni poti in možen vir opažene fluorescence.

Potrebno je omeniti še, da so bili melanizirani noduli pri *P. scaber* svetlo rjave barve, medtem ko jih v literaturi najdemo kot temno rjave strukture (npr. Johnson, 1995; Howard in sod., 1998; Sakamoto in sod., 2011). Temno rjav pigment je opazen tudi v različnih tkivih *P. scaber*, ki za razliko od nodulov, niso nikoli izražala avtofluorescence.

5.1.7 *R. porcellionis* in ostali organi

V nasprotju s hepatopankreasom, steno črevesa in hemociti, pa v drugih organih znotrajcelične okužbe bakterij nismo opazili, čeprav bi glede na raziskave okužbe z bakterijo *R. crassificans* pri ščurkih, ki se uspešno razmnožuje v maščobnem telesu, črevesu, ovariolih, hemocitih in Malpighijevih cevkah (Radek, 2000; Corsaro in sod., 2007), znotrajcelično okužbo z *R. porcellionis* pričakovali tudi v ovarijih enakonožca.

Na trebušnjači, testisih in ovarijih nismo opazili hipertrofiranih celic in belih lis, kakršne se pojavljajo na hepatopankreasu in črevesu. Tudi sicer rabdoklamidij nismo nikoli zasledili v celicah teh organov, čeprav so se občasno pojavljale v hemocitih ali kot prosta elementarna telesa na njihovi površini.

Simetrično grajeni noduli na trebušnjači in gonadah so se pojavljali izključno na površini teh organov, medtem ko so asimetrični noduli v črevesu in hepatopankreasu segali v epitel, kar bi lahko služilo za dokazovanje znotrajcelične okužbe. Simetrični noduli v telesu gostitelja najverjetneje prispevajo k omejevanju širjenja rabdoklamidij, ki so se sprostile iz celic hepatopankreasa in črevesnih celic v hemocel.

Kljub odsotnosti dokazov o obstoju rabdoklamidij v trebušnjači in spolnih organih, pa to njihove morebitne prisotnosti v omenjenih tkivih ne izključuje povsem, saj so bile v teh organih dokazane s pomnoževanjem dela gena za 16S rRNK, značilnega za *R. porcellionis* (Gjureč, 2009). Možno je, da celice navedenih organov niso optimalne za razmnoževanje rabdoklamidij in posledično okužba, podobno kot smo že omenili pri hemocitih, ne doseže večje razsežnosti in tako ne izzove celičnega imunskega odziva. Stephens (2003) namreč opaža, da je mnogo obrambnih odgovorov, ki so povezani z odzivom s klamidijami okuženih vretenčarskih celic, odvisnih od razmnoževanja klamidij. Sočasno pa ne moremo povsem izključiti možnosti, da so bili vzorci, uporabljeni v analizi PCR, le površinsko kontaminirani z rabdoklamidijami oziroma so bile rabdoklamidije v spregledanih nodulih na površini teh organov.

5.2 PREHRANJEVALNI POSKUS IN DRUGA OPAŽANJA

Enakonožci v simptomatski fazi okužbe lahko preživijo več kot pet tednov, podobno kakor so zabeležili tudi Drobne in sodelavci (1999). Kljub temu je obolenje, tako kot za ščurke (Radek, 2000), zanje smrtno, saj je v 37-dnevem prehranjevalnem poskusu poginila polovica okuženih živali. Simptomatski osebki verjetno večinoma poginejo zaradi disfunkcije prebavnih žlez, ki imajo pri mrtvih živalih pogosto močno deformirano morfologijo in konsistenco. Možen vzrok smrti je lahko vsaj v določenih primerih okužba črevesa. Pri nekaterih mrtvih osebkih je namreč hepatopankreas lahko še precej kompakten, medtem ko je črevo močno okuženo in povsem prekrito z noduli. Poleg tega ne moremo povsem izključiti niti smrti zaradi drugih mikroorganizmov, ki so v simptomatskih osebkih pogosti.

Prehranjevalni poskus ob prvotnem opisu okužbe (Drobne in sod., 1999) ni pokazal razlik v stopnji prehranjevanja med simptomatskimi in asimptomatskimi osebki. Naši rezultati nasprotujejo tem ugotovitvam, saj so simptomatske živali zaužile in posledično iztrebile statistično značilno manjše količine hrane kot asimptomatske živali. Mrtve simptomatske živali so imele deloma prazno črevo, zato menimo, da je upad hranjenja največji nekaj dni pred smrtjo, saj se hrana v črevesu normalno zadrži manj kot en dan, ali do nekaj dni pri stradanih živalih (Zimmer, 2002).

Tako simptomatske kot asimptomatske živali so se redno levile in niso kazale sprememb v gibanju in agilnosti, kar je v skladu z mikroskopskimi opazovanji, da okužba živčevja ne prizadene. Fluorescirajoči noduli so bili pogostejši pri simptomatskih živalih, čeprav so bili občasno vidni tudi pri asimptomatskih živalih, verjetno kot posledica imunskega odgovora na različne tujke. Pri simptomatskih živalih smo poleg nodulov pogosto opazili tudi različne druge mikroorganizme in gliste, zato domnevamo, da so te živali bolj dovzetne za ostale patogene v primerjavi z neokuženimi osebki. Poleg tega pa prisotnost rabdoklamidij v hemocitih asimptomatskih živali opaženih s FISH potrjuje možnost prikrite, asimptomatske okužbe z rabdoklamidijami (Kostanjšek in sod., 2004; Corsaro in sod., 2007). Ta se verjetno ob stresorjih, ki zmanjšajo odpornost, lahko razvname v simptomatsko obolenje z značilnimi bolezenskimi znaki, kot je to poznano v primeru okužb z drugimi klamidijami (Everett in sod., 1999).

Obstoj prikrite okužbe pomeni, da je pojavnost rabdoklamidij v populaciji *P. scaber* verjetno še veliko večja od tiste, ki smo jo ocenili zgolj na podlagi vidnih belih lis na hepatopankreasu živih živali in je po vsej verjetnosti povezana s socialnimi interakcijami in združevalnim vedenjem *P. scaber* (Broly in sod., 2012). Asimptomatska prisotnost rabdoklamidij v tkivih enakonožca podpira tudi domnevo o trajni evolucijski koeksistenci rabdoklamidij in členonožnih gostiteljev poznano pri nekaterih drugih klamidijah (Horn, 2008).

Kljub temu naši rezultati nedvomno dokazujejo izrazito negativen vpliv rabdoklamidij na prehranjevanje in preživetje enakonožcev v simptomatski fazi okužbe. Zaradi pogoste uporabe rakov enakonožcev kot testnih organizmov je tako potrebno okužene živali pred izvedbo poskusov izločiti, ker pa lahko že sama izpostavitvev poskusu izzove simptome pri živalih z latentno obliko okužbe je pomembno, da prisotnost simptomatskih belih pik pri poskusnih živalih preverimo tudi po končanem poskusu.

6 SKLEPI

- Hepatopankreas enakonožca *P. scaber* je primarni in osrednji organ okužbe z *R. porcellionis*.
- Sprostitev *R. porcellionis* v lumen hepatopankreasa omogoča elementarnim telesom prehod v lumen črevesa, od koder lahko zapustijo telo gostitelja.
- *R. porcellionis* se verjetno lahko sprošča iz hepatopankreasa tudi v hemocel, kar bi prispevalo k širjenju okužbe na druge organe.
- Poleg celic prebavnih žlez je bakterija *R. porcellionis* sposobna okužbe črevesnih celic, hemocitov in hemopoetskega tkiva, medtem ko gonad in trebušnjače okužba najverjetneje ne prizadene.
- Prisotnost *R. porcellionis* v hemocelu sproži obrambne odgovore gostitelja v obliki fagocitoze in zbiranja hemocitov, ki vodi v nastanek nodulov.
- Nodule gradi več plasti bolj ali manj sploščenih hemocitov, ki obdajajo melanizirano sredico nodula, v katero so ujeti skupki bakterij, s čimer gostitelj omejuje njihovo širjenje po telesu.
- Melanizirani deli nodulov izražajo avtofluorescenco predvsem ob ekscitaciji z modro svetlobo.
- Na okuženem črevesu in redkeje na hepatopankreasu se oblikujejo asimetrični noduli, ki nastanejo kot posledica nalaganja hemocitov na bazalno stran okužene celice.
- V populaciji *P. scaber* je z *R. porcellionis* okuženih do 27 % osebkov, vendar je dejanski delež okuženih lahko precej večji zaradi asimptomatske prisotnosti bakterije v tkivih.
- Simptomatske živali pojedjo in iztrebijo manj v primerjavi z živalmi brez znakov okužbe, medtem ko okužba nima izrazitega vpliva na levitev, gibanje in agilnost živali.
- Porušena struktura in s tem motnje v delovanju prebavnega sistema vodijo v smrt gostitelja v zadnji fazi okužbe z *R. porcellionis*.

7 POVZETEK

Rhabdochlamydia porcellionis je ena izmed redkih poznanih klamidij, ki uspešno okužijo tkiva členonožcev. Pojavlja se kot patogen v hepatopankreasu kopenskega enakonožnega raka *Porcellio scaber*, kjer povzroča patološke spremembe, ki vodijo v smrt gostitelja. Razvojni krog *R. porcellionis* se odvija znotraj vakuol gostiteljske celice, kjer prihaja do pretvorbe med elementarnimi in retikularnimi telesi prek vmesnih intermediarnih teles. Zelo stabilna podolgovata elementarna telesa so ključna pri razširjanju okužbe, medtem ko so okrogla retikularna telesa metabolno aktivna in odgovorna za pomnoževanje. Kljub dobro poznani morfologiji in razvojnem krogu *R. porcellionis* znotraj celic hepatopankreasa so poti okužbe po telesu gostitelja, vpliv na fiziologijo gostitelja in gostiteljevi obrambni odzivi slabo poznani, zato smo jih skušali v okviru naloge razjasniti.

Simptomatsko fazo okužbe, ki se izraža v obliki belih lis vzdolž celotnega hepatopankreasa, smo prepoznali na podlagi stereomikroskopskih opazovanj preko sternitov živih organizmov. Na izoliranih organih simptomatskih živali smo preverjali morebitno prisotnost patoloških sprememb, kot so bele lise in noduli. Iskanje nodulov smo si olajšali s pregledovanjem pod modro svetlobo, ki v melaniziranih nodulih izzove avtofluorescenco. Potencialno okužene organe smo pripravili za transmissijsko ali vrstično elektronsko mikroskopijo.

Prisotnost *R. porcellionis* v organih enakonožca smo skušali potrditi tudi z metodo hibridizacije *in situ*, vendar so bili zaradi avtofluorescence nodulov rezultati vprašljivi, zato smo na tak način lahko dokazovali le *R. porcellionis* v hemocitih iz hemolimfe.

Poleg mikroskopskih tehnik smo izvedli tudi 37-dnevni prehranjevalni poskus, v katerem smo spremljali umrljivost ter količino zaužite hrane in iztrebkov pri skupini asimptomatskih osebkov in skupini osebkov v simptomatski fazi okužbe.

Vstop *R. porcellionis* v telo gostitelja verjetno poteka z vnosom hrane. Primarni in glavni organ okužbe z *R. porcellionis* je hepatopankreas. Sproščanje rabdoklamidij prek apikalnih celičnih površin v lumen hepatopankreasa vodi rabdoklamidije v zadnje črevo, od koder se izločijo iz telesa gostitelja. Precej redkeje, a prav tako pomembno bi morda lahko bilo sproščanje rabdoklamidij iz bazalnih delov celic v hemocel, kar bi omogočilo širjenje okužbe v ostale organe in tkiva.

Okužba bi se tako iz celic hepatopankreasa preko bazalnih površin celic lahko uspešno razširila tudi v črevesne celice, v katerih smo potrdili znotrajcelično okužbo z *R. porcellionis*. Patološko spremenjene belkaste celice na črevesu se v primerjavi s hepatopankreasom pojavljajo kasneje in bolj lokalno, kar podpira predpostavko o širjenju rabdoklamidij iz hepatopankreasa v črevo.

Hemociti, ki krožijo v hemolimfi, domnevno sodelujejo pri odstranjevanju posameznih rabdoklamidij iz hemolimfe s fagocitozo, medtem ko se lahko v zbirajočih hemocitih na

površini organov rabdoklamidije tudi uspešno množijo. V okuženih hemocitih hemopoetskega organa glede na odsotnost elementarnih teles verjetno vladajo suboptimalni pogoji za uspešen zaključek razvojnega kroga rabdoklamidij.

Stik rabdoklamidij s hemolimfo sproži obrambne mehanizme gostitelja. Prične se zbiranje hemocitov in nastanek nodulov, ki omejujejo širjenje okužbe in tako predstavljajo pomemben del obrambnih odzivov ob okužbi z *R. porcellionis*. V telesu živali v simptomatski fazi okužbe so pogosti melanizirani noduli dveh osnovnih tipov. Prvi tip so asimetrični noduli. Nahajajo se na površini hepatopankreasa in še pogosteje na črevesu, kjer je sproščanje *R. porcellionis* preko bazalne membrane verjetno edina pot sproščanja rabdoklamidij. Noduli pogosto segajo globoko v enoslojni epitel teh organov, plasti bolj ali manj sploščenih hemocitov pa se nalagajo na melanizirano jedro le z zunanje, hemocelne strani. Drugi tip so simetrični noduli. Ti so opazni predvsem na površini trebušnjače in gonad ter v hemocelu. Tvori jih eno ali več melaniziranih jeter, okoli katerih se z vseh strani enakomerno nakopičijo plasti hemocitov. Takšni noduli najverjetneje prestrezajo skupke rabdoklamidij, ki se v hemocel sprostijo iz hepatopankreasa in črevesa.

V tkivih gonad in trebušnjače okužbe z *R. porcellionis* nismo zasledili, čeprav se na površini teh organov rabdoklamidije občasno pojavljajo v zbirajočih hemocitih, v nodulih ali v obliki elementarnih teles.

R. porcellionis lahko prizadene do 27 % osebkov v populaciji *P. scaber*, čeprav je dejanski delež okuženih živali lahko še precej večji na račun prikrite okužbe, ki jo je razkrila hibridizacija hemocitov asimptomatskih živali. Okužba nima očitnega vpliva na levitev, gibanje in agilnost živali, vendar je prehranjevalni poskus pokazal statistično značilen upad v prehranjevanju in visoko umrljivost osebkov v simptomatski fazi okužbe. Slednje je najverjetneje posledica strukturnih poškodb okuženih tkiv in s tem povezane funkcije hepatopankreasa ali črevesa.

8 VIRI

- Amann R. I., Krumholz L., Stahl D. A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172, 2: 762–770
- Appel C., Quadros A. F., Araujo P. B. 2011. Marsupial extension in terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *Nauplius*, 19, 2: 123-128
- Araujo P. B., Augusto M. M., Bond-Buckup G. 2004. Postmarsupial development of *Atlantoscia floridana* (van Name, 1940) (Crustacea, Isopoda, Oniscidea): the manca stages. *Journal of Natural History*, 38, 8: 951-965
- Battistella S., Bonivento P., Amirante G. A. 1996. Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Italian Journal of Zoology*, 63, 4: 337-343
- Becker F. D., Mann M. E. 1938. The Reproductive System of the Male Isopod, *Porcellio scaber* Latreille. *Transactions of the American Microscopical Society*, 57, 4: 395-399
- Belland R. J., Zhong G. M., Crane D. D., Hogan D., Sturdevant D., Sharma J., Beatty W. L., Caldwell H. D. 2003. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 14: 8478-8483
- Bettica A., Witkus R., Vernon G. M. 1987. Ultrastructure of the foregut-hindgut junction in *Porcellio scaber* Latreille. *Journal of crustacean biology*, 7, 4: 619-623
- Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. 1997. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 5331: 1453-1462
- Broly P., Mullier R., Deneubourg J.-L., Devigne C. 2012. Aggregation in woodlice: social interaction and density effects. *ZooKeys*, 176: 133-144
- Brusca R. 1997. Isopoda. The Tree of Life Web Project. <http://tolweb.org/Isopoda> (januar 2014)
- Brusca R. C., Brusca G. J. 2003. Phylum Arthropoda: The Crustacea. V: Invertebrates. 2. Izdaja. Sunderland, Sinauer Associates: 511-587
- Brusca R. C., Wilson, G. D. F. 1991. A phylogenetic analysis of the Isopoda with some classificatory recommendations. *Memoirs of the Queensland Museum*, 31: 143-204
- Byrne G. I., Ojcius D. M. 2004. Chlamydia and apoptosis: Life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 10: 802-808

- Carabeo R. A., Grieshaber S. S., Hasenkrug A., Dooley C., Hackstadt T. 2004. Requirement for the Rac GTPase in *Chlamydia trachomatis* invasion of non-phagocytic cells. *Traffic*, 5, 6: 418-425
- Casson N., Entenza J. M., Greub G. 2007. Serological cross-reactivity between different *Chlamydia*-like organisms. *Journal of clinical microbiology*, 45, 1: 234-236
- Cerenius L., Söderhäll K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 116-126
- Chevalier F., Herbiniere-Gaboreau J., Bertaux J., Raimond M., Morel F., Bouchon D., Greve P., Braquart-Varnier C. 2011. The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*: meeting with their invaders, *Wolbachia*. *PloS one*, 6, 4: e18531
- Clifton D. R., Dooley C. A., Grieshaber S. S., Carabeo R. A., Fields K. A., Hackstadt T. 2005. Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infection and Immunity*, 73, 7: 3860-3868
- Cocchiario J. L., Valdivia R, H. 2009. New insights into *Chlamydia* intracellular survival mechanisms. *Cellular Microbiology*, 11, 11: 1571-1578
- Corsaro D., Feroldi V., Saucedo G., Ribas F., Loret J. F., Greub G. 2009. Novel Chlamydiales strains isolated from a water treatment plant. *Environmental Microbiology*, 11, 1: 188-200
- Corsaro D., Greub G. 2006. Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 19, 2: 283-297
- Corsaro D., Thomas V., Goy G., Venditti D., Radek R., Greub G. 2007. '*Candidatus* Rhabdochlamydia crassificans', an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta : Blattodea). *Systematic and Applied Microbiology*, 30, 3: 221-228
- Corsaro D., Valassina M., Venditti D. 2003. Increasing diversity within chlamydiae. *Critical Reviews in Microbiology*, 29, 1: 37-78
- Corsaro D., Venditti D. 2004. Emerging chlamydial infections. *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 2: 75-106
- Corsaro D., Venditti D. 2009. Detection of Chlamydiae from freshwater environments by PCR, amoeba coculture and mixed coculture. *Research in microbiology*, 160, 8: 547-552
- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H., Wagner M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria; development and

- evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 3: 434–444
- Daims H., Stoecker K., Wagner M. 2005. Fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of prokaryotes. V: *Molecular microbial ecology*. Osborn A. M., Smith C. J. (ur.). Abingdon, Bios-Garland: 213–239
- Dautry-Varsat A., Balana M. E., Wyplosz B. 2004. *Chlamydia* - Host cell interactions: Recent advances on bacterial entry and intracellular development. *Traffic*, 5, 8: 561-570
- Drobne D. 1997. Terrestrial isopods - A good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 6: 1159-1164
- Drobne D., Štrus J., Žnidaršič N., Zidar P. 1999. Morphological description of bacterial infection of digestive glands in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 1: 113-119
- Elleder M., Borovansky J. 2001. Autofluorescence of melanins induced by ultraviolet radiation and near ultraviolet light. A histochemical and biochemical study. *The Histochemical Journal*, 33, 5: 273-281
- Everett K. D. E., Thao M., Horn M., Dyszynski G. E., Baumann P. 2005. Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts '*Candidatus Fritschea bemisiae*' strain Falk and '*Candidatus Fritschea eriococci*' strain Elm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, Pt 4: 1581-1587
- Everett K. D. E., Bush R. M., Andersen A. A. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 415-440
- Fryer J. L., Lannan C. N. 1994. Rickettsial and Chlamydial Infections of Freshwater and Marine Fishes, Bivalves, and Crustaceans. *Zoological Studies*, 33, 2: 95-107
- Gjureč P. 2009. Prenos okužbe z znotrajcelično bakterijo "*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*" in njena prisotnost v tkivih kopenskega raka enakonožca *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- Griffiths E., Ventresca M. S., Gupta R. S. 2006. BLAST screening of chlamydial genomes to identify signature proteins that are unique for the Chlamydiales, Chlamydiaceae, *Chlamydophila* and *Chlamydia* groups of species. *BMC genomics*, 7, 14: 1-20

- Gupta R. S., Griffiths E. 2006. Chlamydiae-specific proteins and indels: novel tools for studies. *Trends in Microbiology*, 14, 12: 527-535
- Hackstadt T., Baehr W., Ying Y. 1991. *Chlamydia trachomatis* developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 9: 3937-3941
- Hackstadt T., Todd W. J., Caldwell H. D. 1985. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *Journal of Bacteriology*, 161, 1: 25-31
- Haider S., Collingro A., Walochnik J., Wagner M., Horn M. 2008. *Chlamydia*-like bacteria in respiratory samples of community-acquired pneumonia patients. *FEMS microbiology letters*, 281, 2: 198-202
- Hames C. A. C., Hopkin S. P. 1989. The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. *Journal of Zoology*, 217: 599-627
- Harding P. T., Sutton, S. L. 1985. Woodlice in Britain and Ireland: distribution and habitat. *Huntingdon, Institute of Terrestrial Ecology*: 151 str.
- Hassall M., Jennings J. B. 1975. Adaptive features of gut structure and digestive physiology in the terrestrial isopod *Philoscia muscorum* (Scopoli) 1763. *Biological Bulletin*, 149: 348-364
- Hopkin S.P., Martin M. H. 1982. The distribution of zinc, cadmium, lead and copper within the hepatopancreas of a woodlouse. *Tissue & Cell*, 14, 4: 703-715
- Horn M., 2008. Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annual Review of Microbiology*. 62, 113-131
- Horn M. 2010a. Chlamydiae. V: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (ur.). Vol. 4. New York, Springer: 843-844
- Horn M. 2010b. Chlamydiae. V: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (ur.). Vol. 4. New York, Springer: 844

- Horn M. 2010c. *Candidatus* Clavichlamydia. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (ur.). Vol. 4. New York, Springer: 865-866
- Horn M. 2010d. *Candidatus* Piscichlamydia. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (ur.). Vol. 4. New York, Springer: 872-873
- Horn M. 2010e. Rhabdochlamydiaceae. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (ur.). Vol. 4. New York, Springer: 873
- Horn M. 2010f. Simkaniaceae. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (ur.). Vol. 4. New York, Springer: 874
- Horn M., Collingro A., Schmitz-Esser S., Beier C. L., Purkhold U., Fartmann B., Brandt P., Nyakatura G. J., Droege M., Frishman D., Rattei T., Mewes H.-M., Wagner M.. 2004. Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science*, 304, 5671: 728-730
- Hornung E. 2011. Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life: Structure, physiology and behavior. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 4, 2: 95-130
- Howard R. W., Miller J. S., Stanley D. W. 1998. The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. *Journal of Insect Physiology*, 44, 2: 157-164
- Hryniewiecka-Szyfter Z. 1972. Ultrastructure of hepatopancreas of *Porcellio scaber* Latr. In relation to the function of iron and copper accumulation. *Bulletin de la Société des Amis des Sciences et des Lettres de Poznan, Serie D*, 12/13: 135-142

- Hybiske K., Stephens R. S. 2007. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 27: 11430-11435
- Hybiske K., Stephens R. S. 2008. Exit strategies of intracellular pathogens. Nature reviews Microbiology, 6, 2: 99-110
- Jaenicke E., Fraune S., May S., Irmak P., Augustin R., Meesters C., Decker H., Zimmer M. 2009. Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice? Developmental and Comparative Immunology, 33, 10: 1055-1063
- Jiravanichpaisal P., Lee B. L., Söderhäll K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology, 211, 4: 213-236
- Johansson M. W., Keyser P., Sritunyalucksana K., Söderhäll K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191, 1-3: 45-52
- Johnson S. K. 1995. Handbook of shrimp disease. Aquaculture. Texas, Texas A&M University: 27 str.
- Kautz G., Zimmer M., Topp W. 2002. Does *Porcellio scaber* (Isopoda: Oniscidea) gain from coprophagy? Soil Biology & Biochemistry, 34, 9: 1253-1259
- Kayatz P., Thumann G., Luther T. T., Jordan J. F., Bartz-Schmidt K. U., Esser P. J., Schraermeyer U. 2001. Oxidation causes melanin fluorescence. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42, 1: 241-246
- Kostanjšek R., Štrus J., Drobne D., Avguštin G. 2004. '*Candidatus* Rhabdochlamydia porcellionis', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 543-549
- Kostanjšek R., Štrus J., Lapajne A., Avguštin G., Rupnik, M. Drobne D. 2006. Intestinal Microbiota of Terrestrial Isopods. V: Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates. Soil biology. Vol. 2. König H., Varma A. (ur.). Heidelberg, Springer: 115-131
- Kostanjšek R., Pirc Marolt T. 2014. Pathogenesis, tissue distribution and host response to *Rhabdochlamydia porcellionis* infection in rough woodlouse *Porcellio scaber*. Journal of invertebrate pathology (poslano v objavo)
- Kumari C. J., Rao K. H., Shyamasundari K. 1987. Anatomy and histology of the nervous system of *Ligia exotica* Roux (Crustacea, Isopoda). Folia Morphologica, XXXV, 3: 329-337

- Kuo C.-C., Horn M., Stephens R. S. 2010a. Order I. Chlamydiales. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (ur.). Vol. 4. New York, Springer: 844-845
- Kuo C.-C., Stephens R. S., Bavoil P. M., Kaltenboeck B. 2010b. Genus I. *Chlamydia*. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (ur.). Vol. 4. New York, Springer: 846-865
- Lagkouvardos I., Weinmaier T., Lauro F. M., Cavicchioli R., Rattei T., Horn M. 2014. Integrating metagenomic and amplicon databases to resolve the phylogenetic and ecological diversity of the Chlamydiae. The International Society for Microbial Ecology Journal, 8, 1: 115-125
- Lamoth F., Aeby S., Schneider A., Jatton-Ogay K., Vaudaux B., Greub G. 2009. *Parachlamydia* and *Rhabdochlamydia* in Premature Neonates. Emerging Infectious Diseases, 15, 12: 2072-2075
- Lamoth F., Jatton K., Vaudaux B., Greub G. 2011. *Parachlamydia* and *Rhabdochlamydia*: Emerging Agents of Community-Acquired Respiratory Infections in Children. Clinical Infectious Diseases, 53, 5: 500-501
- Lane R. L. 1988. The digestive-system of *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Isopoda, Oniscoidea): histology and histochemistry. Crustaceana, 55: 113-128
- Le Clec'h W., Chevalier F. D., Genty L., Bertaux J., Bouchon D., Sicard M. 2013. Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. PloS one, 8, 4: e60232
- Longo G., Musmeci R., Privitera R., Sottile L. 1998. Ultrastructural organization of seminal receptacle and sperm storage in *Porcellio laevis* Latreille (Crustacea: Isopoda Oniscidea). Tissue & Cell, 30, 4: 464-474
- Magura T., Hornung E., Tóthmérész B. 2008. Abundance patterns of terrestrial isopods along an urbanization gradient. Community Ecology, 9, 1: 115-120
- Martin G. G., Rubin N., Swanson E. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. Diseases of Aquatic Organisms, 60, 1: 21-29

- Mehlitz A., Rudel T. 2013. Modulation of host signaling and cellular responses by *Chlamydia*. *Cell Communication and Signaling*, 11, 90: 1-11
- Milatovič M., Kostanjšek R., Štrus J. 2010. Ontogenetic development of *Porcellio scaber*: staging based on microscopic anatomy. *Journal of Crustacean Biology*, 30, 2: 225-235
- Millaku A., Lešer V., Drobne D., Godec M., Torkar M., Jenko M., Milani M., Tatti F. 2010. Surface characteristics of isopod digestive gland epithelium studied by SEM. *Protoplasma*, 241, 1-4: 83-89
- Newhall W. J., Jones R. B. 1983. Disulfide-linked oligomers of the major outer-membrane protein of chlamydiae. *Journal of Bacteriology*, 154, 2: 998-1001
- Niemi S., Greub G., Puolakkainen M. 2011. *Chlamydia*-related bacteria in respiratory samples in Finland. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*, 13, 10: 824-827
- Palackal T., Faso L., Zung, J. L., Vernon G., Witkus R. 1984. The ultrastructure of the hindgut epithelium of terrestrial isopods and its role in osmoregulation. *Symposia of the Zoological Society of London*, 53: 185-198
- Peeling R. W., Peeling J., Brunham R. C. 1989. High-resolution ³¹P nuclear magnetic resonance study of *Chlamydia trachomatis*: induction of ATPase activity in elementary bodies. *Infection and Immunity*, 57, 11: 3338-3344
- Plaunt M. R., Hatch T. P. 1988. Protein synthesis early in the developmental cycle of *Chlamydia psittaci*. *Infection and Immunity*, 56, 12: 3021-3025
- Radek R. 2000. Light and electron microscopic study of a *Rickettsiella* species from the cockroach *Blatta orientalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76, 4: 249-256
- Ratcliffe N. A., Gagen S. J. 1976. Cellular defense reactions of insect hemocytes in vivo: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28, 3: 373-382
- Ratcliffe N. A., Gagen S. J. 1977. Studies on in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue & Cell*, 9, 1: 73-85
- Rockey D. D., Rosquist J. L. 1994. Protein antigens of *Chlamydia psittaci* present in infected cells but not detected in the infectious elementary body. *Infection and Immunity*, 62, 1: 106-112
- Rowley A. F., Powell A. 2007. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific, or nonspecific? *Journal of Immunology*, 179, 11: 7209-7214

- Rurangirwa F. R., Dilbeck P. M., Crawford T. B., McGuire T. C., McElwain T. F. 1999. Analysis of the 16S rRNA gene of microorganism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 577-581
- Rusconi B., Greub G. 2011. Chlamydiales and the innate immune response: friend or foe? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 61, 3: 231-244
- Sakamoto M., Ohta M., Suzuki A., Takase H., Yoshizawa Y., Kitami M., Sato R. 2011. Localization of the serine protease homolog BmSPH-1 in nodules of *E. coli*-injected *Bombyx mori* larvae and functional analysis of its role in nodule melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 5: 611-619
- Schmalfuss H. 1998. Evolutionary strategies of the antennae in terrestrial isopods. *Journal of Crustacean Biology*, 18, 1: 10-24
- Schmalfuss H., Wolf-Schwenninger, K. 2002. A bibliography of terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde. Serie A*, 639: 120 str.
- Schmidt C. 2008. Phylogeny of the Terrestrial Isopoda (Oniscidea): a Review. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 66, 2: 191-226
- Schmitz E. H. 1989. Anatomy of the central nervous system of *Armadillidium vulgare* (Latreille) (Isopoda). *Journal of Crustacean Biology*, 9, 2: 217-227
- Scidmore M. A., Fischer E. R., Hackstadt T. 2003. Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infection and Immunity*, 71, 2: 973-984
- Seidl B. H. M., Ziegler A. 2012. Electron microscopic and preparative methods for the analysis of isopod cuticle. *ZooKeys*, 176: 73-85
- Shay M. T., Bettica A., Vernon G. M., Witkus E. R. 1985. *Chlamydia isopodii* sp. n., an obligate intracellular parasite of *Porcellio scaber*. *Experimental Cell Biology*, 53, 2: 115-120
- Sixt B. S., Kostanjšek R., Mustedanagic A., Toenshoff E. R., Horn M. 2013. Developmental cycle and host interaction of *Rhabdochlamydia porcellionis*, an intracellular parasite of terrestrial isopods. *Environmental Microbiology*, 15, 11: 2980-2993
- Söderhäll K., Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10, 1: 23-28

- Stentiford G. D., Bateman K., Feist S. W. 2004. Pathology and ultrastructure of an intranuclear bacilliform virus (IBV) infecting brown shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crangonidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, 2-3: 89-97
- Stephens R. S. 2003. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends in microbiology*, 11, 1: 44-51
- Stichmann-Marny U., Kretzschmar E. 2009. Novi vodnik po živalskem in rastlinskem svetu; [prevedel Milan Lovka]. 1. izd. Olševsek, Narava: 543
- Storch V. 1987. Microscopic anatomy and ultrastructure of the stomach of *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Zoomorphology*, 106, 5: 301-311
- Subtil A., Collingro A., Horn M. 2014. Tracing the primordial Chlamydiae: extinct parasites of plants? *Trends in Plant Science*, 19, 1: 36-43
- Suzuki S., Ziegler A. 2005. Structural investigation of the female genitalia and sperm-storage sites in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Arthropod Structure & Development*, 34, 4: 441-454
- Thomas V., Casson N., Greub G. 2006. *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular Chlamydiales isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environmental Microbiology*, 8, 12: 2125-2135
- Vilisics F., Elek Z., Lövei G. L., Hornung E. 2007. Composition of terrestrial isopod assemblages along an urbanisation gradient in Denmark. *Pedobiologia*, 51, 1: 45-53
- Wagar E. A., Stephens R. S. 1988. Developmental-form-specific DNA-binding proteins in *Chlamydia* spp. *Infection and Immunity*, 56, 7: 1678-1684
- Wägele J. W. 1992. Isopoda. V: Microscopic anatomy of invertebrates. Harrison F. W., Humes A. (ur.). Vol 9. (Crustacea). New York, Wiley-Liss: 529-617
- Ward M. 2004. The chlamydial developmental cycle in pictures. Chlamydial cell biology. http://chlamydiae.com/twiki/bin/view/Cell_Biology/GrowthCycle (maj 2014)
- Wheelhouse N., Katzer F., Wright F., Longbottom D. 2010. Novel *Chlamydia*-like organisms as cause of bovine abortions, UK. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 8: 1323-1324
- Wheelhouse N., Longbottom D. 2012. Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59, 4: 283-291
- Wilkens J. L. 1999. Evolution of the cardiovascular system in Crustacea. *American Zoologist*, 39, 2: 199-214

- Wilson G. D. F. 1991. Functional Morphology and Evolution of Isopod Genitalia. V: Crustacean Sexual Biology. Bauer R., Martin, J. (ur.). New York, University of Columbia Press: 228-245
- Wolff C. 2009. The embryonic development of the malacostracan crustacean *Porcellio scaber* (Isopoda, Oniscidea). Development genes and evolution, 219, 11-12: 545-564
- Wyrick P. B. 2000. Intracellular survival by *Chlamydia*. Cellular Microbiology, 2, 4: 275-282
- Ying S., Pettengill M., Latham E. R., Walch A., Ojcius D. M., Haecker G. 2008. Premature apoptosis of *Chlamydia*-infected cells disrupts chlamydial development. Journal of Infectious Diseases, 198, 10: 1536-1544
- Zidar P., Drobne D., Štrus J. 1998. Determination of moult stages of *Porcellio scaber* (Isopoda) for routine use. Crustaceana, 71: 646-654
- Ziegler A. 1997. Ultrastructural changes of the anterior and posterior sternal integument of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latr. (Crustacea) during the moult cycle. Tissue & Cell, 29, 1: 63-76
- Zimmer M. 2002. Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary-ecological approach. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, 77, 4: 455-493

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Roku Kostanjšku za odlično mentorstvo, uvajanje v raziskovalno delo in vse pridobljene izkušnje. Iskrena hvala za usmerjanje pri izdelavi naloge, vse koristne nasvete, dragoceno znanje, prijaznost in pomoč.

Recenzentki doc. dr. Nadi Žnidaršič hvala za pregled magistrskega dela in tehtne komentarje. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Primožu Zidarju in Barbari Drašler za živali ter Jožici Murko Bulić za prijaznost in pomoč. Celotni katedri za zoologijo hvala za prijetno vzdušje.

Najlepša hvala najbližjim za potrpežljivost, razumevanje, spodbujanje in vso podporo tekom študija.