

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja GRAČNER

**OPIS BIOLOŠKIH IN MOLEKULARNIH ZNAČILNOSTI
BAKTERIJE *RICKETTSIA* SP. IZOLIRANE IZ KLOPOV
*HAEMAPHYSALIS SULCATA***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja GRAČNER

**OPIS BIOLOŠKIH IN MOLEKULARNIH ZNAČILNOSTI BAKTERIJE
RICKETTSIA SP. IZOLIRANE IZ KLOPOV *HAEMAPHYSALIS*
*SULCATA***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF
BACTERIA *RICKETTSIA* SP. ISOLATED FROM *HAEMAPHYSALIS*
SULCATA TICKS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2009

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti. Opravljena je bila na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani, na Univerzi v Galvestonu v Ameriki, na oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani in v Prirodoslovnem muzeju Slovenije.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja doktorske disertacije imenovala znan. sod. dr. Darjo Duh.

Mentor: znan. sod. dr. Darja Duh

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jasna Štrus, Biotehniška fakulteta

Mentor in član: znan. sod. dr. Darja Duh, Zavod za zdravstveno varstvo Maribor

Član: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, Medicinska fakulteta

Član: viš. znan. sod. dr. Tomi Trilar, Prirodoslovni muzej Slovenije

Datum zagovora: 21. 12. 2009

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka: Maja GRAČNER, univ. dipl. biolog

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	576. 89 : 595. 4 (043. 3) = 163.6
KG	rikecioze/ rikecije/ <i>Rickettsia</i> sp./ nova vrsta rikecije/ klopi/ <i>Haemaphysalis sulcata</i>
AV	GRAČNER, Maja, univ. dipl. biolog
SA	DUH, Darja (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Pod. študij, Znanst. področje: Biologija
LI	2009
IN	OPIS BIOLOŠKIH IN MOLEKULARNIH ZNAČILNOSTI BAKTERIJE <i>RICKETTSIA</i> SP. IZOLIRANE IZ KLOPOV <i>HAEMAPHYSALIS SULCATA</i>
TD	Doktorska disertacija
OP	X, 106 str., 5 pregl., 19 sl., 7 pril., 229 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI AVTORSKI IZVLEČEK

Rickettsia hoogstraalii (hoog.straal'i.i N.L. gen.masc. n. *hoogstraalii*, po Hoogstraal, imenovano v čast Dr. Harry Hoogstraalu, ki je prispeval veliko znanja o klopih).

Rickettsia hoogstraalii je obvezna znotrajcelična bakterija, ki raste na celični liniji komarjevih celic C6/36 pri temperaturi 26°C, v okolju brez CO₂. Celicam smo za rast dodali sterilno gojišče Leibovitz 15 Glutamax, obogateno s 5 % telečjim serumom. Uspešno so jo vzgojili tudi na klopni celični liniji CCE3 in ISE6 pri temperaturi 32–34°C. Morfologija *R. hoogstraalii* je značilna za rikecije iz skupine SFG. Gram negativno celično steno in plazmalemo ločuje periplazemski prostor, ki smo ga opisali (identificirali) s transmisijsko elektronsko mikroskopijo. Rikecije v okuženih komarjevih celicah, pobarvanih z metodo Diff-Quick, izgledajo kot majhni, vijolično obarvani kokobacili. Rikecija je bila do zdaj izolirana samo iz dveh vrst kloпов, in sicer iz *Haemaphysalis sulcata* in *Carios capensis*. *Rickettsia hoogstraalii* kaže citopatski učinek na celicah C6/36, CCE3 in IJS6. Bakterija *R. hoogstraalii* je geografsko široko razširjena, saj so jo dokazali na Hrvaškem, v Španiji in v ZDA. Zaporedja genov za 16S rRNK, 17 kDa, gltA, rOmpA in rOmpB proteine so potrdila, da je *R. hoogstraalii* nova vrsta iz skupine SFG. Znotraj skupine SFG je najbolj sorodna humani patogeni bakteriji *R. felis*.

Prototip bakterije *R. hoogstraalii* je sev Croatica, ki smo ga izolirali iz kloпов *Hae. sulcata*, nabranih leta 2000 na Hrvaškem. Bakterija *Rickettsia hoogstraalii*, sev Croatica, je dostopna v dveh neodvisnih zbirkah kultur v dveh državah: DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany (identifikacijska številka DSM 22243) in zbirka UTMB – Galveston, Texas, ZDA (identifikacijska številka UTMB00003).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 576. 89 : 595. 4 (043. 3) = 163.6
CX rikeciosis/ *Rickettsia* sp./ new rickettsia species/ ticks/ *Haemaphysalis sulcata*
AU GRAČNER, Maja
AA DUH, Darja (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgrad. study, Scient. area: Biology
PY 2009
TI BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF
BACTERIA *RICKETTSIA* SP. ISOLATED FROM *HAEMAPHYSALIS*
SULCATA TICKS
DT Doctoral Dissertation
NO X, 106 p., 5 tab., 19 fig., 7 ann., 229 ref.
LA sl
AL sl/en

AB ABSTRACT

Rickettsia hoogstraalii (hoog.straal'i.i N.L. gen. masc. n. *hoogstraalii* of Hoogstraal, named in honour of Dr. Harry Hoogstraal who contributed significantly to the general knowledge on ticks).

Rickettsia hoogstraalii is an obligately intracellular bacterium which can be grown in mosquito cell line C6/36 at 26°C with L-15 Leibovitz supplemented with 5 % FCS, in environment without CO₂. It also grows in tick CCE3 and ISE6 cell lines. The morphology of *R. hoogstraalii* is typical of SFG rickettsiae. Its gram-negative cell wall and cytoplasmic membrane are separated by a narrow periplasmic space as determined by TEM. The rickettsiae-infected cells can be stained with Diff-Quik, which reveals a small coccobacillary appearance of *R. hoogstraalii*. This *Rickettsia* was so far isolated only from two species of ticks, *Haemaphysalis sulcata* and *Carios capensis*. *Rickettsia hoogstraalii* showed cytopathic effect in CCE3 and ISE6 cells. *Rickettsia hoogstraalii* is geographically widely distributed, having been detected in Croatia, Spain and Georgia, USA. The 16S rRNA, 17kDa, *gltA*, *ompA* and *ompB* gene sequence analyses indicate that *R. hoogstraalii* is a unique species different from other SFG rickettsiae. It is most closely related to *R. felis*.

The prototype strain of *R. hoogstraalii* is strain Croatia isolated from *Hae. sulcata* ticks collected in Croatia in 2000. The prototype strain has been deposited in two recognized culture collections in two different countries: DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany (identification number DSM 22243) and UTMB collection – Galveston, Texas, USA (identification number 00003).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO TABEL	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RIKECIJE	3
2.1.1 Uvod	3
2.1.2 Značilnosti in zgradba rikecij	3
2.1.3 Filogenija in taksonomija reda Rickettsiales	5
2.1.4 Ekologija rikecij	9
2.1.4.1 Gostitelji in prenašalci rikecij	9
2.1.4.2 Prenos rikecij	12
2.1.5 Patogeneza rikecij	13
2.1.5.1 Rikecije in gostiteljeva celica	13
2.1.5.2 Rikecioze	16
2.1.5.2.1 Pegavice	16
2.1.5.2.2 Mrzlice	18
2.1.5.2.3 Rikecije s še neznanom patogenostjo	22
2.1.5.2.3 Nepatogene rikecije	22
2.1.6 Diagnostika in zdravljenje rikecioz	23
2.1.6.1 Diagnostika rikecioz	23
2.1.6.1.1 Serologija	23
2.1.6.1.2 Gojenje rikecij	24
2.1.6.1.3 Molekularno – biološke metode za dokazovanje rikecij	25
2.1.6.2 Zdravljenje rikecioz	25
2.1.7 Kriteriji za opis in poimenovanje nove vrste rikecije in rikecioz	26
2.1.7.1 Kriteriji za opisovanje nove vrste rikecije	26
2.1.7.1.1 Začetki opisovanja novih vrst rikecij	26
2.1.7.1.3 Molekularno – biološki testi	28
2.2 KLOPI	30
2.2.1 Klopi in rikecije	30
2.2.2 Klopi iz rodu <i>Haemaphysalis</i> in klop vrste <i>Haemaphysalis sulcata</i>	31
2.2.2.1 Klopi iz rodu <i>Haemaphysalis</i>	31

2.2.2.2 Klop vrste <i>Haemaphysalis sulcata</i>	31
2.3 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	32
3 MATERIALI	35
3.1 Nabiranje klopov	35
4 METODE IN REZULTATI	38
4.1 OSAMITEV IN KULTIVACIJA NOVE RIKECIJE	38
4.1.1 Priprava celične linije	38
4.1.2 Kultivacija rikacij	38
4.1.2.1 Priprava klopov	39
4.1.2.2 Kultivacija rikacij na celični liniji komarjevih celic C6/36	39
4.1.2.2.1 Poskus s skupino 20	41
4.1.2.2.1.2 Poskus s skupino 33	42
4.1.2.2.1.3 Poskus s skupino 42	44
4.1.3 Priprava serološke metode IF	44
4.2. MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI NOVE RIKECIJE	46
4.2.1 Elektronska mikroskopija nove rikacije iz notranjih organov klopov	46
4.2.2 Elektronska mikroskopija nove rikacije, gojene na celični liniji komarjevih celic C6/36	48
4.3 MOLEKULARNO – BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI NOVE RIKECIJE	51
4.3.1 Dokaz prisotnosti nove rikacije v vzorcu	51
4.3.2 Pomnožitev in dokaz nukleotidnega zaporedja nove rikacije iz klopa <i>Hae. sulcata</i>	52
4.3.3 Pomnožitev in dokaz nukleotidnega zaporedja nove rikacije iz celične linije komarjevih celic C6/36	56
4.3.4 Uvrstitev nove rikacije v filogenetski sistem	57
4.4 PREIZKUS PATOGENOSTI NOVE RIKECIJE	63
4.5 DOSTOPNOST IZOLATA NOVE RIKECIJE V DVEH NEODVISNIH BANKAH	63
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	65
5.1 RAZPRAVA	65
6.1 POVZETEK	77
6.2 SUMMARY	79
7 VIRI	82
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO TABEL

Tabela 1: Rodovi klopov in rikecije, ki jih prenašajo (rikecije z znano patogenostjo iz skupine rikecij SFG/ rikecije z neznanu patogenostjo iz skupine rikecij SFG in skupine izvornih rikecij/ rikecije, ki še nimajo statusa vrste) (Fournier in Raoult 2007).....	11
Tabela 2: Nova rikecija v klopih vrste <i>Hae. sulcata</i> na območju Splita leta 2000	39
Tabela 3: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za sekveniranje fragmenta A in fragmenta B (obarvano črno) in začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za kloniranje (obarvano rdeče)	55
Tabela 4: Primerjava zaporedij gena <i>ompA</i> iz nove rikecije iz klopov <i>Hae. sulcata</i> (Split 2000).....	55
Tabela 5: Primerjava zaporedij gena <i>ompA</i> iz izolata nove rikecije na celični liniji komarjevih celic C6/36 (p3d14).....	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogenetska razdelitev rikecijskih vrst, narejena na podlagi primerjave zaporedja 16S rRNK in genov <i>gltA</i> , <i>ompA</i> , <i>ompB</i> , <i>sca4</i> (gen <i>D</i>), <i>sca1</i> in <i>sca2</i> (Fournier in Raoult 2007).....	9
Slika 2: Primer epidemiološkega cikla endemične pegavice (Prenaša jo rikecija vrste <i>R. typhi</i> (belo – neokuženi, sivo – okuženi) (<i>Polyplax spinulosa</i> je, kot vse živalske uši, zelo strogo vezana na svojega gostitelja in prenaša <i>R. typhi</i> s podgane na podgano, <i>Xenopsylla cheopis</i> pa je, kot vse bolhe, manj strogo vezana na gostitelja in lahko prenese <i>R. typhi</i> tudi na človeka) (Traub in sod. 1978; Fahrhang-Azad in sod. 1985; Trilar 1995).	10
Slika 3: Klop vrste <i>Hae. sulcata</i> (na levi sliki je samec, na desni napita samica) (Foto: T. Trilar).	35
Slika 4: Nabiranje kloпов iz ovce v Splitu, leta 2007 (Foto: M. Korva).	36
Slika 5: Povečan prikaz metode nabiranja kloпов iz ovce v Zadru, leta 2007 (Foto: T. Trilar).	36
Slika 6: Nabiranje kloпов z metodo zastave (Foto: T. Trilar).	37
Slika 7: Pobiranje kloпов s krpe z ekshaustorjem (Foto: T. Trilar).	37
Slika 8: Slika neokužene celične linije komarjevih celic C6/36 (levo) in slika celične linije po okužbi z mikroorganizmi vrste <i>Pseudomonas</i> spp. oziroma <i>Burkholderia cepacia</i> strain (desno), kjer je prišlo do močnega citopatskega učinka.....	41
Slika 9: Celični razmaz (po tehniki Diff-quick) z novo rikecijo okuženih komarjevih celic C6/36 (A) in neokuženih komarjevih celic C6/36 (B) – poskus 33bAb, p3d14.	42
Slika 10: Shematski prikaz poteka poskusa s skupino 33bAb.	43
Slika 11: Intenzivnost fluorescence s titrom protiteles nove rikecije – A) negativna kontrola, B) 1:80 in C) 1:320.....	45
Slika 12: Seciranje klopa (trebušna stran klopa je prilepljena na samolepilni trak) (Foto: D. Duh).	46
Slika 13: Prerez žlez slinavk klopa vrste <i>Hae. sulcata</i> , okužene z novo rikecijo.	47
Slika 14: Prerez srednjega črevesa klopa vrste <i>Hae. sulcata</i> , okuženega z novo rikecijo.	48
Slika 15: A: Fagocitoza novih rikecij v komarjevo celico C6/36, B: Fagocitoza nove rikecije v komarjevo celico C6/36; C: Tvorba psevdopodijev komarjeve celice C6/36 med fagocitozo nove rikecije; Č: Rikecije, razporejene v citoplazmi komarjeve celice C6/36; D: Delitev rikecije v citoplazmi komarjeve celice C6/36; E: Začetek razgradnje komarjeve celice C6/36.	50
Slika 16: Filogenetsko drevo, narejeno na podlagi poravnave 3178 bp gena <i>ompA</i>	59
Slika 17: Filogenetsko drevo, narejeno na podlagi poravnave 766 bp gena 16S rRNA.	60
Slika 18: Filogenetsko drevo, narejeno na podlagi poravnave 239 bp 17 kDa gena.	61
Slika 19: Filogenetsko drevo, narejeno na podlagi poravnave 1217 bp gena <i>gltA</i>	62

KAZALO PRILOG

Priloga A: Podatki o gostiteljih in zunanjih zajedavcih, nabranih v Splitu leta 2006 (oktober)

Priloga B: Podatki o gostiteljih in zunanjih zajedavcih, nabranih v Zadru leta 2007 (april)

Priloga C: Podatki o gostiteljih in zunanjih zajedavcih, nabranih v Splitu leta 2007
(november)

Priloga Č: Prerez žlez slinavk klopa vrste *Hae. sulcata*, okužene z novo rikecijo

Priloga D: Prerez srednjega črevesa klopa vrste *Hae. sulcata*, okužene z novo rikecijo

Priloga E: Potrdilo o dostopnosti izolata z identifikacijsko številko UTMB00003

Priloga F: Potrdilo o dostopnosti izolata z identifikacijsko številko DSM22243

OKRAJŠAVE

SFG – skupina mrzlic (Spotted Fever Group)
TG – skupina pegavic (Typhus Group)
STG – skupina grmičevskih mrzlic
RMSF – Mrzlica skalnega gorovja (Rocky Mountain Spotted Fever)
DNK – deoksiribonukleinska kislina
RNK – ribonukleinska kislina
ATP – adenzintrifostat
ADP – adenzindifosfat
SCA – družina površinskih celičnih antigenov
IF – imunofluorescenca
PCR – verižna reakcija s polimerazo (Polymerase Chain Reaction)
PMS – Prirodoslovni muzej Slovenije
UTMB – University of Texas Medical Branch
IMI – Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
FCS – telečji serum (Fetal Calf Serum)
PBS – fosfatni pufer (Phosphate Buffered Salin)
LD50 – 50 % smrtnost (Lethal Dose 50 %)

1 UVOD

Rikecije so bakterije, ki so obvezni znotrajcelični paraziti evkariontskih celic. Pri ljudeh povzročajo obolenja imenovana rikecioze (Parola in sod. 2005a). Rikecije delijo v skupino mrzlic (angl.: spotted fever group, SFG) in skupino pegavic (angl.: typhus group, TG) glede na njihove antigenske lastnosti in glede na to, katera vrsta členonožcev jih prenaša. Rikecije iz skupine SFG večinoma prenašajo klopi, rikecije iz skupine TG pa uši in bolhe (Azad in Beard 1998). Nevarni humani patogeni bakteriji, *Rickettsia typhi* in *Rickettsia prowazekii*, sta edini predstavnici skupine TG. Nasprotno v skupino SFG uvrščajo za ljudi patogene rikecije, kot sta *Rickettsia conorii* in *Rickettsia rickettsii* ter rikecije, ki jih niso nikoli dokazali pri ljudeh (npr. *Rickettsia tamurae*, *Rickettsia rhipicephali*, in druge) (Parola in sod. 2005a). Zaradi načina prenosa rikecij predvidevajo, da lahko vse rikecije povzročijo bolezen, če prenašalci v kri gostitelja sprostijo dovolj velik začetni inokulum bakterij. Posledično domnevajo, da so lahko vse rikecije, prisotne ali ugotovljene v členonožcih, ki parazitirajo na ljudeh, potencialno patogene za ljudi (Parola in sod. 2005a; La Scola in sod. 1997). Klopi iz družine Ixodidae so najpomembnejši prenašalci in gostitelji rikecij iz skupine SFG. Dokazali so, da klopi iz večine rodov v družini Ixodidae prenašajo rikecije. Klopi iz rodu *Haemaphysalis* do nedavnega niso veljali za značilne prenašalce rikecij (Ishikura in sod. 2003).

Rikeciologija je razvijajoča se disciplina in zato je povsem pričakovano, da se število na novo odkritih rikecij povečuje. Rikecije iz skupine SFG postajajo vse bolj prepoznavne in pomembne pri pojavljanju rikecioz (Parola in sod. 2005). Po uveljavljenih kriterijih (Fournier in sod. 2003) je za opis nove vrste rikecije na osnovi molekularnih značilnosti potrebno analizirati odseke vsaj petih izmed sledečih rikecijskih genov: 16S rRNK, 17 kDa, *gltA*, *ompB*, *ompA*, *sca1*, *sca2*, *sca4* in *groEL*. Med pomembne biološke značilnosti pri opisu nove vrste rikecije pa prištevajo osamitev in kultivacijo rikecije, morfologijo in ultrastrukturo ter določitev patogenosti (Fournier in Raoult 2007). Po uspešno pridobljenih podatkih, ki so potrebni za opis nove vrste rikecije, je potrebno rezultate dela objaviti v mednarodni reviji *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Pogoji za objavo je dostopnost izolata nove vrste rikecije v dveh neodvisnih zbirkah kultur (Fournier in sod. 2003). Poimenovanje rikecij in rikecioz ni vezano samo na znanstvena pravila, ampak tudi na dogovore o poimenovanju med raziskovalci na tem področju (Raoult in sod. 2005).

Doktorska naloga je predstavljala nadaljevanje raziskave, narejene na območju Srednje Dalmacije na Hrvaškem. V suličastih klopah (*Haemaphysalis sulcata*) (klope so nabrali na ovcah in kozah), so dokazali novo rikecijo iz skupine SFG z visoko stopnjo okuženosti klopov (26 %). Novi rikeciji so določili molekularne značilnosti. Z analizo odsekov genov za encim citrat sintazo (*gltA*), 17 kDa in rOmpB protein so potrdili, da je ta rikecija glede na molekularne značilnosti najbolj podobna *R. felis* (s 97,5 % podobnostjo gena *gltA*, 95,2 % podobnostjo 17 kDa proteina in 98 % podobnostjo gena *ompB*) (Duh in sod. 2006). Zaradi podobnosti nove rikecije z *R. felis*, ki je humani patogen (Parola in sod. 2005), smo poleg molekularnih, določili tudi biološke značilnosti omenjene nove vrste rikecije. Z molekularno določitvijo gena *ompA*, 16S rRNK in opisom bioloških značilnosti, kot so morfologija, izolacija in patogenost rikecije, smo lahko opredelili novo vrsto rikecije in jo filogenetsko uvrstili v sistem.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RIKECIJE

2.1.1 Uvod

Rod *Rickettsia* so dolgo uporabljali kot splošen pojem za veliko majhnih bakterij, ki jih ni mogoče kultivirati in jih zaradi značilnih rikecijskih posebnosti z rutinskimi in tradicionalnimi molekularnimi pristopi ni mogoče določiti. V zadnjih 35-tih letih je razvoj molekularnih tehnik omogočil nov vpogled v razvrščanje in poznavanje rikecij. Kot rezultat danes pojem rikecije povezujejo predvsem z bakterijami, ki jih prenašajo členonožci in sodijo v rod *Rickettsia*, znotraj družine Rickettsiaceae, α -Proteobacteria. V rod *Rickettsia* sodi trenutno 24 uradno priznanih vrst rikecij in kar nekaj neopredeljenih sevov (Fournier in Raoult 2007).

Glavni prenašalci in rezervoarji večine rikecij so klopi. Nekatere vrste rikecij prenašajo uši, muhe in pršice (Fournier in Raoult 2007). Rikecije povzročajo rikecioze, ki sodijo med starejše prenosljive bolezni, ki jih prenašajo členonožci. Predvidevajo, da naj bi bil vzrok za pojav kuge v Atenah v petem stoletju prav izbruh epidemične pegavice. Leta 1899 je Edward E. Maxey predstavil prvi klinični opis Mrzlice skalnega gorovja (angl. RMSF – Rocky Mountain Spotted Fever), kot prototip klopno prenosljive rikecioze (Weiss E. 1988). Leta 1906 je Howard Ricketts, ki je bil pomemben raziskovalec Mrzlice skalnega gorovja, poimenoval povzročitelja le-te, rikecijo *Rickettsia rickettsii*. Ricketts je bil prvi, ki je opisal rikecije kot obvezne znotrajcelične bakterije, novo kategorijo patogenov tistega časa, ki so jih kasneje poimenovali rikecije. Razvil je osnovne laboratorijske metode za zaznavanje in ugotavljanje prisotnosti rikecij v vzorcih. Poudaril je pomembnost kloпов in vlogo sesalcev kot gostiteljev pri vzdrževanju populacije *R. rickettsii* v naravi. Rod *Rickettsia* je poimenovan po Horwardu Rickettsu (Walker 2004).

2.1.2 Značilnosti in zgradba rikecij

V red Rickettsiales sodijo kratke, paličaste, v obliki kokobacilov ali pleomorfne Gram negativne bakterije, ki so obvezni znotrajcelični paraziti (Winkler 1990). Dolge so od 0,8–2,0 μm in široke od 0,3–0,5 μm (La Scola in Raoult 1997). Rikecijsko ovojnico sestavljajo notranja plazmalema, tri-slojna celična stena in mikrokapsularni ovoj na zunanji strani celične

stene (Silverman in Wisseman 1978; Yano in sod. 2004). V okuženih celicah jih najdemo posamezno, v parih, kratkih verigah ali filamentih (Avšič-Županc 2002). Takoj po vstopu v celico se nahajajo v fagosomu, saj vstopajo v celico z inducirano fagocitozo. Pri tem morata biti metabolno aktivni tako gostiteljska kot rikecijska celica. Sicer jih po vstopu znotraj fagosomov ali fagolizosomov ne najdemo, saj se v celici nahajajo prosto v gostiteljevi citoplazmi, ki jo potrebujejo za stabilizacijo njihove prepustne celične membrane in oskrbo snovi, potrebnih za metabolizem (Winkler 1990). Rikecije, ki povzročajo mrzlice, so našli tudi v jedru gostiteljske celice (Raoult in Roux 1997). Rikecije se pomnožujejo z dvojnimi cepljenjem v gostiteljevi citoplazmi (Yano in sod. 2004).

Rikecije vsebujejo ribosome in nimajo jasno izraženega jedra. Genom rikecij sestavlja DNK v obliki krožnega kromosoma, velikega od 1 Mbp do 1,6 Mbp (Andersson in Andersson 1999; Raoult in Roux 1997; Yano in sod. 2004). Razmerje med RNK in DNK je tako kot pri običajnih bakterijah 1:3, različne skupine rikecij pa imajo različna razmerja gvanina in citozina proti adeninu in timinu (Fournier in Raoult 2007). Rikecije so sposobne normalno delovati z majhno količino genetskega materiala, kar je povezano z njihovim obveznim, znotrajceličnim načinom življenja. Tako majhen genom naj bi bil rezultat redukcijskega evolucijskega procesa iz izvornega prednika, ki je imel večji genom (Andersson in Andersson 1999; Harrison in Gerstein 2002). Rikecije so izgubile gene, ki so odgovorni za biosintezo aminokislin, nukleozidov in anaerobno glikolizo. Omenjeni geni so značilni za prostoživeče bakterije, izguba le teh pa je rikecije vodila v obvezno znotrajcelično življenje (Renesto in sod. 2005). Vendar pa ostaja točen izvor rikecij neznan. Npr. za rikecijo vrste *R. prowazekii* je značilna zelo tesna sorodnost z mitohondriji (Andersson in sod. 1998). Rikecije in mitohondriji so se morda razvili iz skupnega prednika, saj vsebujejo veliko skupnih DNK zaporedij (Weisburg in sod. 1985; Emelyanov 2003, Andersson in sod. 1998). Ena izmed teorij tudi predvideva, da naj bi se rikecije razvile iz prostoživečih bakterij (Roux in sod. 1997).

S sekveniranjem 16S rRNK so ugotovili, da sodijo rikecije v deblo purpurnih bakterij in da so zelo podobne za rastline patogeni vrsti *Agrobacterium tumefaciens* iz družine Rhizobiaceae. Domnevajo, da naj bi se v evolucijskem razvoju rikecije razvile iz rastlinskih znotrajceličnih parazitov in so jih na živali prenesli njihovi prenašalci členonožci (Weisburg in sod. 1985). Predvidevajo tudi, da bi lahko prišlo do horizontalnega prenosa ATP/ADP translokaz na rikecije iz klamidij, *Chlamydia* (Renesto in sod. 2005). Pri rikeciji *R. felis* so odkrili konjugativni plazmid,

prvi primer pri znotrajceličnih bakterijah. Zato predvidevajo, da naj bi v evoluciji rikecijskega genoma igrala konjugacija pomembno vlogo (Ogata in sod. 2005). Opazna je tudi degradacija genoma in pojavljanje psevdogenov, kar naj bi rikecije tudi pripeljalo do masovnih izgub genetskih informacij in do znotrajceličnega načina življenja (Andersson in Kurland 1998; Andersson in sod. 1998). Sekeyova in sod. (2001) predvidevajo, da naj bi bile rikecije vrst *R. canadensis*, *R. bellii* in *AB bacterium* izvorni predstavniki rodu *Rickettsia*.

Kljub temu, da so bakterije same sposobne sintetizirati vse potrebne snovi za preživetje v gostiteljski celici, imajo ATP-transportni sistem, ki jim omogoča, da uporabljajo gostiteljev ATP. Imajo respiratorno verigo s citokromi, sposobne so oksidativne fosforilacije, kot donor elektronov pa uporabljajo NADH. Posebnost rikecijskega metabolizma je v tem, da lahko oksidirajo le glutamin, ne pa glukoze, glukoze 6-fosfata ali organskih kislin. Glutamin jim predstavlja glavni vir energije (Fournier in Raoult 2007). Sicer pa so rikecije zunaj gostiteljeve celice zelo nestabilne. Izjema sta zelo stabilni obliki rikecij, *R. prowazekii* in *R. typhi*, ki sta sposobni preživeti v iztrebkih uši tudi do nekaj tednov (Houhamdi in sod. 2002; Houhamdi in sod. 2003). Na splošno postanejo rikecije takoj neaktivne pri temperaturi 56°C (Fournier in Raoult 2007).

Rikecije vsebujejo pomembne antigene kot so lipopolisaharidi, lipoproteini, zunanje membranske proteine iz družine površinskih celičnih antigenov (SCA) in proteine temperaturnega šoka. Pri rikecijah so določili antigene kot so 17 kDa lipoprotein (Anderson in Tzianabos 1989) in člane iz družine SCA, kot so: 12 kDa S-slojni protein (OmpB ali Sca 5) (Ching in sod. 1990), rOmpA, ki je prisoten samo pri rikecijah, ki povzročajo mrzlice (SFG) (Fournier in sod. 1998; Anderson in sod. 1990) in protein Sca4 (gen *D*) (Sekeyova in sod. 2001). Identificirali so še ostalih 14 genov SCA proteinov (Blanc in sod. 2005), med katerimi se gen *sca1* nahaja pri vseh vrstah rikecij (Ngwamidiba in sod. 2006). Določene regije proteinov, ki jih kodirajo geni *ompA*, *ompB*, *sca1*, *sca2* in *sca4*, so vključene v interakcijo z gostiteljem (Blanc in sod. 2005).

2.1.3 Filogenija in taksonomija reda Rickettsiales

Red Rickettsiales so na začetku razdelili v tri družine: Rickettsiaceae, Bartonellaceae in Anaplasmataceae (Dumler in sod. 2001). Družino Rickettsiaceae so kasneje razdelili v tri razrede: Rickettsiae, Ehrlichiae in Wolbachiae; razred Rickettsiae pa v tri rodove: *Coxiella*,

Rickettsia in *Rochalimaea* (La Scola in Raoult 1997). Na začetku so filogenetsko analizo rikecij in tudi drugih prokariotov naredili na podlagi morfoloških, antigenskih in metabolnih značilnosti le-teh (Gimenez 1964). Z molekularnimi taksonomskimi metodami so pokazali, da razvrščanje, ki temelji samo na teh značilnostih, ni najbolj primerno in kar nekaj predstavnikov reda so na podlagi zaporedja gena 16S rRNK prestavili v podskupino Proteobacteria. Rod *Rickettsia* so prestavili v α -1 podskupino, rodova *Rochalimaea* in *Bartonella* pa so povezali in prestavili v α -2 podskupino (La Scola in Raoult 1997). Do sprememb je prišlo tudi znotraj razreda Rickettsiae. Na podlagi zaporedja gena 16S rRNK so rikecijo *Rickettsia tsutsugamushi* uvrstili v svoj rod *Orientia*, ki vsebuje danes samo eno vrsto, *Orientia tsutsugamushi* (Tamura in sod. 1995). Red Rickettsiales vključuje danes rodove *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Orientia*, *Rickettsia* in *Wolbachia* (Dumler in sod. 2001). Med rikecije sodi 24 uradno priznanih vrst. Med rikecije, ki povzročajo pegavice (angl. Typhus Group – TG) sodita danes rikeciji vrste *R. typhi* in *R. prowazekii*, v skupino rikecij, ki povzročajo mrzlice (angl. Spotted Fever Group – SFG) pa: *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. africae*, *R. sibirica*, *R. slovaca*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. australis*, *R. akari*, *R. felis*, *R. aeschlimannii*, *R. helvetica*, *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. montanensis*, *R. parkeri*, *R. heilongjiangensis*, *R. tamurae*, *R. asiatica* in *R. peacockii*. *Rickettsia bellii* in *Rickettsia canadensis* predstavljata tretjo, tako imenovano izvorno skupino. Obstaja še veliko izolatov rikecij, ki jih še niso uspeli povsem karakterizirati in opredeliti (Fournier in sod. 2003; Fournier in Raoult 2007).

Natančnejše razvrščanje rikecij je postalo mogoče šele s primerjavo zapisov za določene gene. Primerjava DNK zaporedij genov za 16S rRNK se ni izkazala za dovolj natančno in občutljivo (Fox in sod. 1992; Raoult in Roux 1997), zato so vpeljali primerjavo DNK zaporedij hitro mutirajočih genov kot so gen *gltA* (Roux in sod. 1997), gen, ki kodira 17 kDa protein (Anderson in Tzianabos 1989) in gene iz družine SCA: *ompA* (Fournier in sod. 1998), *ompB* (Roux in Raoult 2000), gen *D* (Sekeyova in sod. 2001), *scal* (Ngwamidiba in sod. 2006) in *sca2* (Ngwamidiba in sod. 2005). Gena *gltA* in *ompA* se največkrat uporabi pri sekveniranju pri predstavnikih rikecij iz skupine SFG in izkazalo se je, da sta primerna in zadostna pri študijah filogenetskega razvrščanja rikecij (Fournier in sod. 1998; Roux in sod. 1997). Tako primerjava DNK zaporedij genov za 16S rRNK kot DNK hibridizacija, se ne uporabljata rutinsko za identifikacijo rikecij (Weisburg in sod. 1989). Z raziskavami, narejenimi na podlagi DNK hibridizacije so pokazali, da se rikecije znotraj nukleotidnega

zaporedja med seboj ne razlikujejo za več kot 4,9 % in bi jih na podlagi tega lahko uvrstili v isto vrsto. Stopnja genetske variabilnosti pri rikacijah SFG je tako nižja, kot med npr. posameznimi vrstami črevesnih bakterij (Beati in sod. 1992).

Filogenetska analiza, narejena na podlagi gena, ki kodira 17 kDa protein (*htrA*) ni pokazala specifično značilnih povezav med rikacijami (Anderson in Tzianabos 1989).

Nasprotno je filogenetska analiza, narejena na podlagi gena *gltA*, pokazala več specifičnih povezav, z izjemo znotraj skupine SFG (Roux in sod. 1997). Gen *gltA* je sestavni del večine celic in je encim centralne metabolne poti, kjer sodeluje pri tvorbi energije (Roux in sod. 1997). Iz filogenetskega debla (Slika 1), narejenega na podlagi analize gena *gltA* je razvidno, da sodijo v skupino rikacij, ki so sorodne vrsti *R. rickettsii* naslednje rikacije: *R. conorii*, *R. honei*, *R. rickettsii*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. sibirica*, *R. slovaca* in *R. japonica*; v skupino rikacij, ki so sorodne vrsti *R. massiliae* pa rikacije *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. aeschlimannii* in *R. montanensis* (Fournier in Raoult 2007). *Rickettsia canadensis*, *AB bacterium* in *R. bellii* ne sodijo niti v skupino TG ali SFG in predstavljajo na podlagi zgoraj omenjene analize oddaljene predstavnike rikacij. *Rickettsia helvetica*, *R. akari*, *R. australis* in *R. felis* pa zasedajo mesto med skupinama *R. massiliae* in TG (Fournier in sod. 1998; Fournier in Raoult 2007).

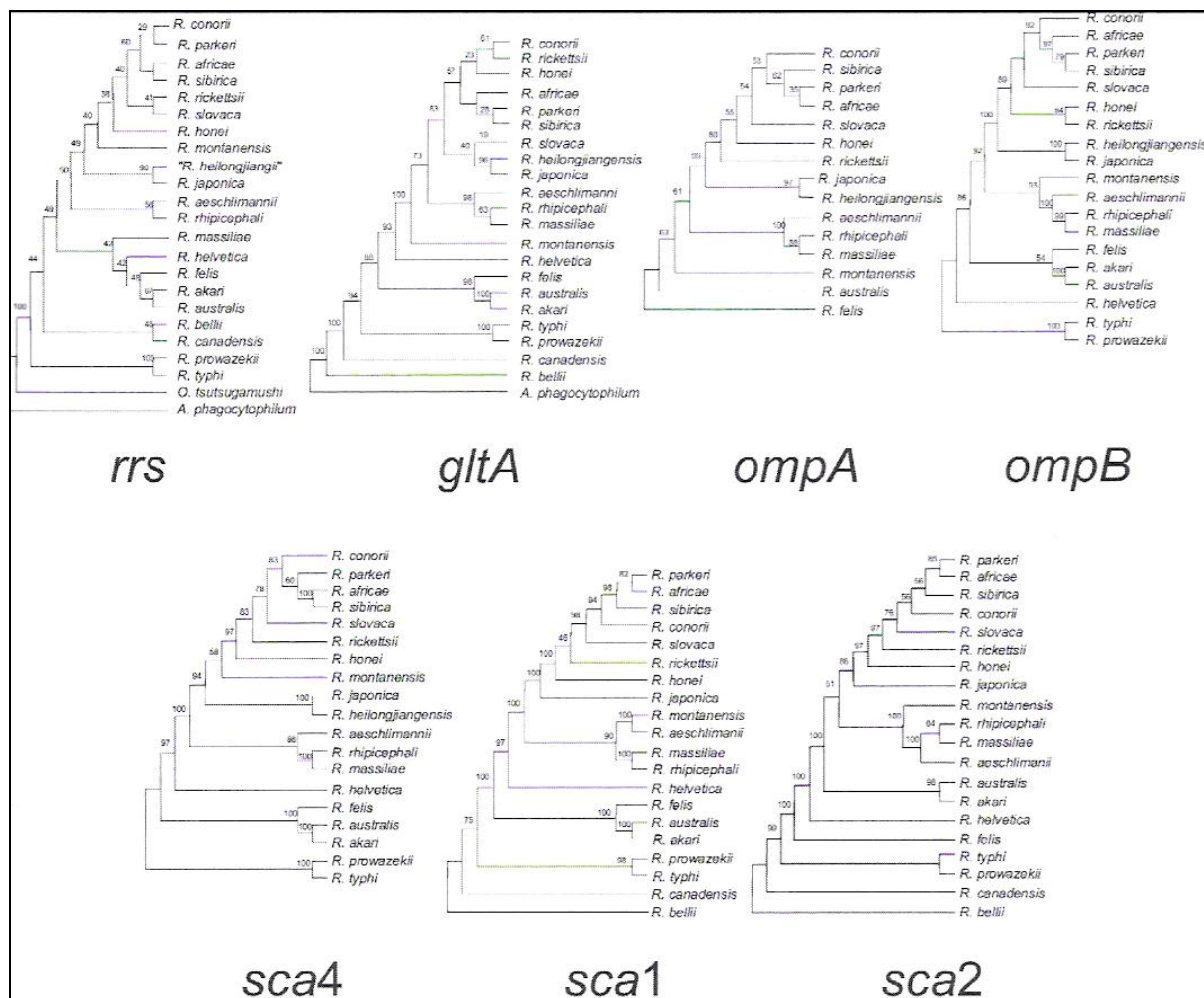
Gen *ompA* zapisuje 190 kDa velik protein, vendar velikost proteina znotraj posameznih rikacij variira (Vishwanath 1991). Nahaja se samo pri rikacijah iz skupine SFG in igra pomembno vlogo pri pritrjevanju rikacije na gostiteljevo celico. Vsebuje domeno iz različnega števila (od 6 do 15) identičnih tandemskih enot, kar narekuje genetsko diverziteteto SFG rikacij (Gilmore 1993; Stenos in Walker 2000). Ponavljajoča tandemaska regija predstavlja 43 % celotnega *ompA* gena in se pojavlja pri vseh SFG rikacijah (Anderson in sod. 1990; Gilmore 1993). Razvrstitev in število ponavljajočih tandemskih enot so glavni vzrok za antigenske razlike med SFG rikacijami (Gilmore 1993). Protein rOmpA je tako uporaben za diagnosticiranje rikacij, rikacijskih vrst in je pomemben kandidat pri izdelavi cepiv (Zavala-Castro in sod. 2005). S primerjavo zaporedja gena *ompA* so skupino rikacij, sorodno vrsti *R. rickettsii*, dobro raziskali in razčlenili. Na podlagi filogenetske analize zaporedja gena *ompA* (Slika 1), vsebuje kompleks vrst, ki so sorodne vrsti *R. conorii*, različne seve *R. conorii*. Tako se sevi »indijskega klopnega tifusa«, Malish, M1 in Moroccan razlikujejo predvsem po nukleotidnih zaporedjih za protein rOmpA in reaktivnosti z monoklonskimi protitelesi. Seva

»astrahanske vročice« in »izraelskega klopnega tifusa« sta zelo sorodna *R. conorii* sp. Drugo skupino sestavljajo rikecije *R. sibirica*, *R. africae* in *R. parkeri*. *Rickettsia rickettsii*, *R. slovaca*, *R. honei* in *R. japonica* predstavljajo po tej analizi samostojno vejo (Fournier in Raoult 2007). Potrebno je poudariti, da rikecije iz skupine TG in rikecije iz tako imenovane izvorne skupine ne izrazijo gena *ompA* (Fournier in sod. 1998).

Gen *ompB* so prvič opisali pri rikeciji vrste *R. prowazekii* (Carl in sod. 1990). rOmpB je kristalinski S-slojni protein, ki vpliva na obliko in togost bakterije. Pomembno je vključen v površinsko prepoznavanje in pričvrščevanje rikecije na gostiteljsko celico. Filogenetska analiza, narejena na podlagi zaporedja gena *ompB*, v večini sovпада s filogenetsko analizo, narejeno na podlagi zaporedja gena *ompA* (Roux in Raoult 2000). Pri rikecijah vrste *R. helvetica*, *R. akari*, *R. australis*, *R. typhi* in *R. prowazekii* pa filogenetska analiza bolj sovпада s filogenetsko analizo zaporedja gena *gltA* (Fournier in Raoult 2007) (Slika 1).

S primerjavo zaporedja gena *sca4* (gen *D*) razdelijo rikecije v pet filogenetskih skupin, in sicer: v kompleks vrst, ki so sorodne vrsti *R. massiliae* (*R. massiliae*, sev Bar29, *R. aeschlimannii*, *R. rhipicephali*) (Fournier in Raoult 2007), v že zgoraj opisan kompleks vrst, ki so sorodne vrsti *R. rickettsii*, skupino rikecij, ki so sorodne vrsti *R. helvetica*, ki vsebuje samo vrsto *R. helvetica* in skupino rikecij, ki so sorodne vrsti *R. akari*, ki vsebuje vrste *R. australis*, *R. akari* in *R. felis* in skupino TG. Pri vrsti *R. canadensis* in *R. bellii* gena *D* niso dokazali, kar ju z *AB bacterium* uvrsti v skupino izvornih rikecij (Sekeyova in sod. 2001; Fournier in Raoult 2007) (Slika 1).

Filogenetska analiza, narejena na podlagi zaporedja genov *scal* in *sca2*, vsebuje podobne rezultate kot analiza, narejena na podlagi zaporedja genov *ompA*, *ompB* in gena *D* (Ngwamidiba in sod. 2006; Ngwamidiba in sod. 2005) (Slika 1).



Slika 1: Filogenetska razdelitev rikecijskih vrst, narejena na podlagi primerjave zaporedja 16S rRNK in genov *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* (gen *D*), *sca1* in *sca2* (Fournier in Raoult 2007).

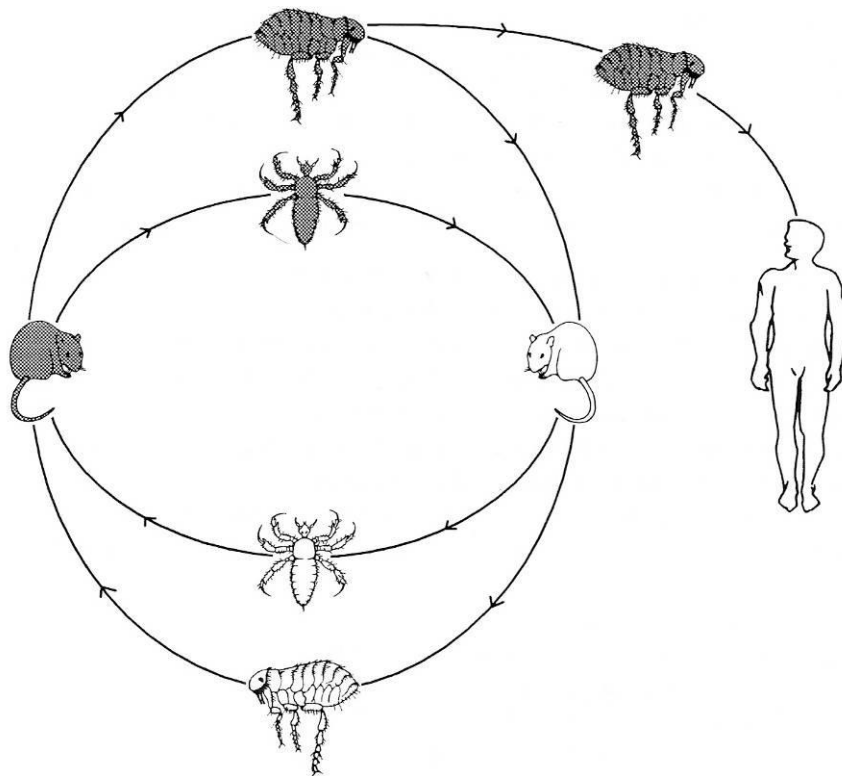
Raziskave, narejene na podlagi primerjave analize posameznega zaporedja gena, so primerne za identifikacijo bakterije, ne pa za njihovo uvrstitev v filogenetski sistem. Za ustrežnejšo uvrstitev rikecij v filogenetski sistem je priporočljiva analiza primerjav zaporedja večjega števila genov in poleg molekularnih, upoštevanje morfoloških, fizioloških in ekoloških značilnosti rikecije (Roux in Raoult 2000).

2.1.4 Ekologija rikecij

2.1.4.1 Gostitelji in prenašalci rikecij

Življenjski cikel rikecij je zapleten in pogosto vključuje večje število prenašalcev in gostiteljev (Slika 2). V naravi so gostitelji rikecij sesalci, tako divje kot domače živali in/ali

členonožci, ki imajo pogosto tudi vlogo prenašalca. V rikecijskem življenjskem ciklu so zunanji zajedavci zelo pomembni, saj sta zmožnost preživetja in razmnoževanja rikecij vezani prav na njih (Azad in Beard 1998).



Slika 2: Primer epidemiološkega cikla endemične pegavice (Prenaša jo rikecija vrste *R. typhi* (belo – neokuženi, sivo – okuženi) (*Polyplax spinulosa* je, kot vse živalske uši, zelo strogo vezana na svojega gostitelja in prenaša *R. typhi* s podgane na podgano, *Xenopsylla cheopis* pa je, kot vse bolhe, manj strogo vezana na gostitelja in lahko prenese *R. typhi* tudi na človeka) (Traub in sod. 1978; Fahrhang-Azad in sod. 1985; Trilar 1995).

Zunanji zajedavci delujejo kot prenašalci in rezervoarji rikecij in z nekaj izjemami (npr. človeška uš *Pediculus humanus humanus*, okužena z rikecijo vrste *R. prowazekii*) niso podvrženi posledicam okužbe (Raoult in Roux 1997; Azad in Beard 1998; Parola in sod. 2005). Pri prenosu rikecij in izbruhu rikeciov je pomembna tudi ekologija gostiteljev. Ekološki faktorji, ki pomembno vplivajo na epidemiologijo rikeciov so gostiteljevo optimalno okolje, gostiteljeva specifičnost za določeno rikecijo in prehranjevalno vedenje zunanjega zajedavca. Vse to je povezano z geografsko in sezonsko razporeditvijo gostitelja in zajedavca, s prisotnostjo zoonoz v določenem okolju in s številom gostiteljev, na katerem se zunanji zajedavec lahko hrani in okuži (Raoult in Roux 1997; Azad in Beard 1998).

Rikecije so evolucijsko vezane na prenašalce iz skupine členonožcev (Walker in sod. 2007). Iz skupine pršic (Acarina), so klopi najpogostejši prenašalci rikecij. Klopi iz družine Ixodidae so najpogostejši prenašalci rikecij iz skupine SFG, z dvema izjemama, rikecijo vrste *R. akari* in *R. felis* (Raoult in Roux 1997; Azad in Beard 1998). Pod določenimi pogoji se lahko tudi predstavniki rikecij iz skupine TG (*R. prowazekii*) prenašajo s klopi (Medina-Sanchez in sod. 2005). Klopi iz družine mehkih klopov, Argasidae, niso, oziroma so zelo redko prenašalci rikecij (Walker in sod. 2007) (Tabela 1). Pred kratkim so dokazali prisotnost rikecij v mehkih klopih vrste *Carios capensis* in *Ornithodoros moubata* (Kawabata in sod. 2006; Cutler in sod. 2006).

Tabela 1: Rodovi klopov in rikecije, ki jih prenašajo (rikecije z znano patogenostjo iz skupine rikecij SFG/ rikecije z neznano patogenostjo iz skupine rikecij SFG in skupine izvornih rikecij/ rikecije, ki še nimajo statusa vrste) (Fournier in Raoult 2007).

<u>Rod klopa</u>	<u>Rikecije</u>
<i>Rhipicephalus</i>	<i>R. rickettsii</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i> , <i>R. massiliae</i> , <i>R. africae</i> , <i>R. aeschlimannii</i> / <i>R. rhipicephali</i> / <i>R. raoultii</i>
<i>Dermacentor</i>	<i>R. rickettsii</i> , <i>R. slovaca</i> , <i>R. heilongjiangensis</i> , <i>R. japonica</i> / <i>R. montanensis</i> , <i>R. rhipicephali</i> , <i>R. peacockii</i> , <i>R. bellii</i> -
<i>Amblyomma</i>	<i>R. rickettsii</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i> , <i>R. parkeri</i> , <i>R. africae</i> , <i>R. honei</i> / <i>R. tamurae</i> , <i>R. bellii</i> / <i>R. amblyommii</i> , <i>R. raoultii</i> , <i>R. texiana</i>
<i>Haemaphysalis</i>	<i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i> , <i>R. aeschlimannii</i> , <i>R. japonica</i> / <i>R. canadensis</i> , <i>R. bellii</i> / <i>Candidatus R. principis</i>
<i>Hyalomma</i>	<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolotimoniae</i> , <i>R. aeschlimannii</i> / -/ -
<i>Ixodes</i>	<i>R. honei</i> , <i>R. japonica</i> , <i>R. australis</i> / <i>R. asiatica</i> , <i>R. helvetica</i> / <i>Candidatus R. andeana</i> , <i>Candidatus R. tarasevichiae</i> , <i>R. monacensis</i> , <i>R. moreli</i> , <i>R. thailandii</i>
<i>Boophilus</i>	<i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i> / -/ -
<i>Argas</i>	-/ <i>R. bellii</i> / -
<i>Ornithodoros</i>	-/ <i>R. bellii</i> / -

Prenašalec rikecije vrste *R. akari* je pršica vrste *Liponyssoides sanguineus* (iz skupine plenilskih pršic, Gamasida, Acarina) (Tarman 2003), ki zajeda na domači miši (*Mus musculus*) (Comer in sod. 1999; Choi in sod. 2005; Schoeler in sod. 2005).

Med žuželkami, ki prenašajo rikecije, pa so najbolj poznane uši in bolhe. Poznanih je 3000 vrst uši (Anoplura), na njih pa je vezana samo ena rikecioza (Walker in sod. 2007). Uši vrste *P. h. humanus* so prenašalci rikecije vrste *R. prowazekii* (Raoult in Roux 1997; Azad in Beard 1998). Od poznanih 2000 vrst bolh, sta na bolhe vezani samo dve rikeciozi (rikeciozi, ki ju povzročata rikeciji vrste *R. typhi* in *R. felis*). Vzroki za to so morda v tem, da so bolhe in uši do gostitelja dokaj vrstno specifične, precej nemobilne in vezane na gostitelje (predvsem glodalce) v gnezdih. Večina bartonel se prenaša z bolhami in ušmi, zato predvidevajo, da naj bi le-te izpodrinile rikecije, čeprav je telesna uš, *P. h. humanus*, glavni prenašalec tako bartonele vrste *Bartonella quintana* kot tudi rikecije vrste *R. prowazekii*. Poleg tega pa nekatere bolhe in uši ne preživijo okužbe z rikecijami (Walker in sod. 2007).

2.1.4.2 Prenos rikecij

Zunanji zajedavci se z rikecijami okužijo na enega od naslednjih načinov:

- zunanji zajedavec se hrani na gostitelju, ki je okužen z rikecijo,
- preko transovarialnega prenosa – okužena samica okuži svoje potomce; preden vstopijo rikecije v hemolimfo zajedavca, najprej okužijo njegovo črevo, predvsem srednje črevo, nato okužijo in se razmnožujejo v njegovih organih; če se okužijo ovariji, se lahko rikecija prenese naprej na potomce,
- preko transstadialnega prenosa – v črevesu zunanjega zajedavca se lahko nahaja majhen delež rikecij, ki se v procesu levitve prenesejo na naslednjo generacijo (Raoult in Roux 1997),
- preko razmnoževanja – z rikecijo okužen samec klopa pri razmnoževanju okuži samico (Hayes in sod. 1980) in
- pri »cofeedingu«, kjer se klopi med prehranjevanjem nahajajo tesno skupaj in lahko pride do prenosa rikecij; to se zgodi zelo redko (Telford in Parola 2007)

Transstadialen in transovarialen prenos rikecij v klopah omogoča obstoj SFG rikecij med generacijami klosov. To uvršča klope tudi med pomembne rezervoarje in ne le prenašalce rikecij (Azad in Beard 1998).

Prenos rikecij na gostitelja lahko poteka preko:

- vdihavanja aerosolov,
- ugriza ali vboda zajedavca – prenos rikecije s slino med hranjenjem, kar je v večini značilnost za prenašalce rikecij. Vendar pa med posameznimi skupinami zajedavcev obstajajo razlike. Klopi se v vsakem stadiju prehranjujejo na enem gostitelju enkrat in nato presnavljajo krvni obrok in niso več vezani na gostitelja (značilnost prenosa predvsem rikecij iz skupine SFG); nasprotno bolhe in uši, ki lahko v zelo kratkem času okužijo tudi po več gostiteljev, saj se hranijo in presnavljajo kri sproti in vseskozi (Walker in sod. 2007; Raoult in Roux 1997; Azad in Beard 1998),
- prenosa rikecij z iztrebki npr. uši ali bolh, kar je značilnost rikecij iz skupine TG (*R. prowazekii* v iztrebku uši in *R. typhi* v iztrebkih bolh so lahko stabilno kužne tudi do nekaj mesecev, če ne več) (Walker in sod. 2007) in preko
- prstov osebe, ki je odstranila zajedavca iz gostitelja in pri tem prenesla okuženo hemolimfo zajedavca na svojo očesno sluznico – takšni prenosi so zelo redki (Walker in sod. 2007).

2.1.5 Patogeneza rikecij

2.1.5.1 Rikecije in gostiteljeva celica

Rikecije so obvezne znotrajcelične bakterije, ki živijo večinoma v citoplazmi gostiteljske celice, redko pa rikecije iz skupine SFG najdemo tudi v jedru (Silverman in Wisseman 1979; Silverman in sod. 1980). Ko členonožec ugrizne ali vbode gostitelja, se rikecije preko krvnega obtoka prenesejo do regionalnih limfnih vozljev, kjer vstopijo v endotelne celice majhnih arterij, ven in kapilar. Razpadu gostiteljeve celice sledi okužba. To vodi do večje prepustnosti krvožilnega sistema (vaskulitisa), zabuhlin, nizkega krvnega tlaka, zmanjšanega volumna krvne plazme, pojava izpuščajev, povišane temperature, strjevanja krvi, kome ... (Raoult in Roux 1997; Diaz-Montero in sod. 2001; Wilson in sod. 2002). Pomembne tarčne celice rikecij so fibroblasti, makrofagi, dermalne dendritske celice in limfatski del endotela (Walker in sod. 2007). Glavna tarča rikecij so endotelne celice (Olano 2005; Sahni 2007). Kljub temu, da rikecije napadejo vse organe, so možgani in pljuča kritični organi, glede smrtnosti okuženega gostitelja (Walker in sod. 2007). V *in vitro* pogojih lahko rikecije okužijo širši spekter celic. Rikecije morajo vstopiti v evkariontsko celico, se v njej razmnoževati in se sproščati v okolje, da okužijo druge celice (Teysseire in sod. 1995).

Vstop rikecije v celico gostitelja je inducirana fagocitoza (pri nefagocitnih celicah – epitelne, endotelne celice) ali fagocitoza (pri fagocitnih celicah – makrofagi, nevtrofili) (Wilson in sod. 2002; Whitworth in sod. 2005), ki zahteva metabolno aktivno rikecijsko in gostiteljsko celico (Teyssere in sod. 1995). Glavna zunanja proteina SFG rikecij, rOmpA in rOmpB, omogočata pritrđitev rikecije na celico gostitelja (Li in Walker 1998; Uchiyama 2003). Membrana gostiteljeve celice s psevdopodiji obda bakterijo (Teyssere in sod. 1995). Npr. pri *R. conorii* se rOmpB veže na protein Ku70 gostiteljske celice (Uchiyama 2003; Martinez in sod. 2005). Molekule Ku70 so ubikvitinirane, kar omogoča fagocitozo rikecije, ki je povezana z Arp2/3 kompleksom. GTP-aze, Cdc 42, protein tirozin kinaze, fosfoinozid 3 kinaze in Src družina kinaz aktivirajo Arp2/3 kompleks, ki tvori citoskeletni aktin na vstopni strani gostiteljeve celice in omogoči inducirano fagocitozo rikecije. Ta proces se imenuje »zipper« mehanizem (Martinez in Cossart 2004; Walker in Ismail 2008), ki je hiter in traja okoli 15 minut (Walker in sod. 2007). V samo aktivacijo Arp2/3 kompleksa je pri SFG rikecijah vključen protein RickA, ki se nahaja na zunanji površini rikecij (Gouin in sod. 2004; Jeng in sod. 2004). Zgradba proteina RickA je v ogljikovi terminalni domeni povsem identična domeni WASP proteinov, ki so pri drugih organizmih odgovorni za aktivacijo Arp2/3 kompleksa. Po aktivaciji se Arp2/3 kompleks prenese na zunanjo površino rikecije, kjer deluje kot usmerjevalec aktinske polimerizacije (Walker in sod. 2007; Walker in Ismail 2008).

Rikecije iz skupine SFG, razen *R. peacockii*, se od celice do celice prenašajo z aktinskimi vlakni (Heinzen in sod. 1999; Van Kirk in sod. 2000). Nastanek aktinskih vlaken izzove rikecijski protein RickA (Gouin in sod. 2004; Jeng in sod. 2004). *Rickettsia prowazekii* in *R. typhi* (obe iz TG) ne vsebujeta RickA proteina, in se od celice do celice ne prenašata z aktinskimi vlakni. *Rickettsia prowazekii* se prenaša tako, da okužena gostiteljska celica počí in se rikecije prenesejo do drugih celic (Walker in sod. 2007). *Rickettsia typhi* sicer lahko polimerizira kratke aktinske repe, ki pa ne tvorijo filopodija in ne vsebuje RickA proteina (Teyssere in sod. 1992). Za rikecije iz TG skupine je značilno, da je vezava rikecij temperaturno odvisna in v povezavi s holesterolnimi receptorji na zunanji membrani gostiteljske celice in ligandi rikecije (Ramm in Winkler 1973; Ramm in Winkler 1976). Če so rikecije izpostavljene temperaturi 56°C vsaj 10 minut, je vezava le-teh onemogočena (Li in Walker 1992).

Po vstopu rikecij v celico preko fagosoma (Teyssere in sod. 1995), rikecije uničijo membrano fagosoma, s proteinoma fosfolipazo D in hemolizinom C (Tly C) in se tako izognejo potencialni smrti, ki bi jo povzročila fagolizosomska fuzija (Whitworth in sod. 2005; Renesto in sod. 2003). Tly C naj bi bil pri razgradnji membrane fagosoma pomembnejši od fosfolipaze D (Whitworth in sod. 2005). Domnevajo, da naj bi bila razgradnja membrane

fagosoma odvisna tudi od encima fosfolipaze A2, ki ga izločajo rikecije (Teyssere in sod. 1995; Walker in sod. 2001). V raziskavi, kjer so Vero celice okužili z *R. conorii* so ugotovili, da poteka uničenje membrane fagosoma zelo hitro, saj so nekatere rikecije že po 3 minutah lizirale membrano fagosoma in se sprostile v citoplazmo gostiteljeve celice (Teyssere in sod. 1995). Ko se rikecija sprosti v citoplazmo, začne rasti in se razmnoževati (Teyssere in sod. 1995; Billings in sod. 2001). V citoplazmi so za rikecijo potrebna hranila, adenozin trifosfati, nukleotidi in aminokisljine, potrebne za razmnoževanje (Renesto in sod. 2003; Whitworth in sod. 2005; Audia in Winkler 2006).

TG rikecije se v gostiteljski celici številčno bolj namnožijo kot SFG rikecije (Rydkina in sod. 2007). Da rikecije preživijo v gostiteljski celici, se v gostiteljski celici namnožijo do te mere, da je ne poškodujejo. Rikecije lahko zapustijo gostiteljsko celico, ne da bi se pri tem poškodovale ali bi jih gostiteljska celica uničila (Walker in sod. 2007). Iz tega sledi, da naj bi bilo medsebojno delovanje znotrajcelične rasti rikecij in procesa razgradnje gostiteljske celice, osnova rikecijske patogeneze (Feng in sod. 1993).

Po okužbi endotelnih celic s SFG rikecijami, se le-te na okužbo odzovejo z oksidativnim stresom, kar povzroči lipidno peroksidacijo, ki poškoduje celično membrano gostitelja. Tega procesa pri TG rikecijah niso zasledili (Rydkina in in sod. 2004). Sicer pa so po rikecijski okužbi endotelnih celic opazili, da aktivirajo rikecije sproščanje pomembnih transkripcijskih faktorjev NF- κ B, ki po okužbi vplivajo na sintezo citokinov in kemokinov gostiteljske celice (Clifton in sod. 2005; Rydkina in sod. 2007). Pomembnejša vloga aktivacije NF- κ B transkripcijskih faktorjev je inhibicija apoptoze z rikecijo okužene gostiteljske celice, kar omogoča preživetje gostiteljske celice, to pa posledično omogoča rast in razmnoževanje rikecij v njej (Radulovic in sod. 2002). Inhibicija apoptoze gostiteljske celice poteka na dveh nivojih; najprej po primarni okužbi gostiteljske celice z rikecijo in nato po po-apoptotskem imunološkem odzivu gostiteljske celice (npr. s tvorbo citokinov), kar je pomembno za ustvarjanje pogojev, ki omogočajo trdovratno rikecijsko okužbo (Yoshiie in sod. 2000; Radulovic in sod. 2002). Kasneje v procesu okužbe, ko je imunski sistem rikecije in gostiteljske celice polno aktiviran, pa zmanjšano sproščanje NF- κ B faktorjev privede do apoptoze okužene gostiteljske celice (Walker in sod. 2007). CD4- in CD8-T limfociti gostiteljske celice vseskozi kontrolirajo rast in smrt rikecij kot tudi preživetje okužene gostiteljske celice (Valbuena in sod. 2002).

2.1.5.2 Rikecioze

2.1.5.2.1 Pegavice

Etiološki vzrok bolezni, ki jih povzročajo rikecije iz skupine TG, je znan komaj v tem stoletju, kljub temu pa nekateri opisi iz preteklosti ustrezajo bolezenskim znamenjem pegavic. Prvi opis pegavice naj bi bilo Tukitidovo poročilo o kugi v Atenah v petem stoletju pred našim štetjem, ustrezali pa naj bi tudi nekateri Hipokratovi opisi. V križarskih vojnah, od leta 1095 do 1270, je zaradi epidemij različnih infekcij umrlo veliko več vojakov kot v bitkah, med temi boleznimi pa so bile po opisih sodeč tudi pegavice. Prvič je pegavico jasno opisal Fracastro v času epidemije v Italiji leta 1505 in 1528. Sicer pa zgodovina rikecioz, ki se kažejo kot pegavice, sovпада s človeškim vojskovanjem. Epidemije so spremljale vojake ob osvajanju Granade, v tridesetletni vojni, med francosko revolucijo, na mnogih Napoleonovih pohodih in v krimski vojni. Vojaki in vojni ujetniki pa so bili tudi pomemben vir okužb za civilno prebivalstvo. V Srbiji je leta 1914 izbruhnila epidemija. Umrlo je 150000 srbskih vojnih ujetnikov in med 30000 in 60000 avstrijskih vojnih ujetnikov (Weiss K. 1988). Ko je Nicolle ugotovil, da pegavico prenašajo okužene uši, se je stanje nekoliko umirilo (Weiss E. 1988). Epidemije pegavic so bile hude v nemških in avstrijskih taboriščih; v Buchenwaldu in Auschwitzu so delali poskuse na zdravih internirancih, kjer so jih inokulirali s krvjo bolnikov, na nekaterih pa so preizkušali tudi cepiva. V II. svetovni vojni so leta 1942 Američani ustanovili komisijo za pegavice. Izboljšanje higienskih razmer, uspešnejše zdravljenje, masovna cepljenja in zatiranja uši so zmanjšali število obolelih in umrlih za pegavicami (Weiss K. 1988).

Leta 1930 so ločili med povzročiteljema epidemične in endemične pegavice. Pomembno je bilo tudi odkritje, da se v naravi povzročitelji pegavic vzdržujejo v krogu podgan in drugih malih sesalcev ter njihovih bolh, na človeka pa jih običajno prenese človeška uš (Weiss E. 1988).

- Epidemična pegavica (angl. Epidemic Typhus)

Epidemično pegavico povzroča rikecija vrste *R. prowazekii* in se najpogosteje pojavi, ko so pogoji (revščina, pomanjkanje higiene, hladnejše vreme) za razrast prenašalca, telesne uši (*P. h. humanus*), ugodni. Pomembno je omeniti, da je okužba uši s to rikecijo za uš smrtna. Bolezen se pojavlja na območju Severne in Južne Amerike, Azije in Afrike (Raoult in Roux

1997; Raoult in sod. 1997; Roux in Raoult 1999). Leteče veverice (*Glaucomys volans*) so pomemben rezervoar te vrste rikecije (Reynolds in sod. 2003). Sicer pa je to edina rikecioza, kjer je človek končni primarni vretenčarski gostitelj. Glavni klinični znaki akutne rikecijske okužbe so nespecifični in izgledajo kot gripa. Ponavadi so prisotni visoka vročina, glavobol, občutek slabosti, bruhanje, driska, prisotnost izpuščajev, ki se v večini primerov nahaja na mestu ugriza. Lahko se pojavijo tudi težave z dihanjem, s srcem, jetri in ledvicami ter nastop kome (Parola in sod. 2005). Bolezen traja ponavadi 2–3 tedne. Smrtnost je lahko tudi do 30 %. Bolezen se lahko pojavi ponovno, v blažji obliki, imenovana Brill-Zinsserjeva bolezen. Smrtnost je pri tej obliki veliko nižja, do 1,5 % (Raoult in Roux 1997).

Pred kratkim je okužba z rikecijo vrste *R. prowazekii* v Burundi zahtevala 30000 človeških žrtev (posledica slabih socialnih razmer). Pomembno je poudariti, da so epidemije, ki jih je povzročila rikecija te vrste, zahtevale skupno več žrtev kot vse vojne v zgodovini. Japonska in Sovjetska zveza sta med II. svetovno vojno in tudi po njej raziskovali možnosti uporabe rikecij za biološko orožje (Azad in Radulovic 2003). Walker (2003) predvideva, da naj bi bilo v laboratorijih USSR že razvito biološko orožje z rikecijo *R. prowazekii*, ki naj bi bilo odporno na vse antibiotike. Rikecija vrste *R. prowazekii* je zaradi svoje stabilnosti in visoke patogenosti na seznamu »Centers for Disease Control and Prevention« uvrščena pod stopnjo nevarnosti B (Walker 2003; McLeod in sod. 2004).

- Endemična pegavica (angl. Murine Typhus)

Endemično pegavico povzroča rikecija vrste *R. typhi*. Endemična pegavica se, v nasprotju z epidemično pegavico, pojavlja pogosteje v območjih s toplejšim podnebjem (Raoult in Roux 1997). Naravni gostitelji rikecije so podgane, miši, rovkve, skunki, oposumi in mačke (Azad 1990). Naravni nevretenčarski prenašalci so bolhe *Xenopsylla cheopis*, *Nasopsylla fasciatus* in *Leptopsylla segnis*, *Ctenocephalides felis* (Azad in Beard 1998). V ciklus zoonoze *Xenopsylla* – *Rattus* spp. je pogosto vključena tudi podganja uš (*P. spinulosa*) (Traub in sod. 1978). Pomen *C. felis* ostaja v rikecijskem krogu še dokaj neznan. Rikecija okuži prebavilo bolhe in se preko iztrebka bolhe ali z vdihavanjem prenese na gostitelja. Lahko se prenese tudi preko rane gostitelja, če le-ta pride v stik z okuženim iztrebkom bolhe (Azad 1990). Okužbo z rikecijo vrste *R. typhi* so dokazali tudi v treh vrstah uši, v treh vrstah pršic in v klopu iz rodu *Hyalomma* (Traub in sod. 1978). Endemična pegavica se najpogosteje pojavlja v USA, Afriki, Evropi in Aziji (Raoult in Roux 1997). Klinični znaki bolezni so vročina, težave z dihanjem in živčnim sistemom. Smrtnost je manjša od 3 % (Bernabeu-Wittel in sod. 1998).

2.1.5.2.2 Mrzlice

Z razvojem molekularno bioloških metod je v zadnjih 20-ih letih znanje o rikecijah SFG zelo napredovalo. Rikecije iz skupine SFG najdemo na vseh kontinentih, razen na Antarktiki. Povzročajo mrzlice in do danes je opisano več mrzlic, ki jih povzročajo različne vrste rikecij iz SFG (Parola in sod. 2005).

- Mrzlica Skalnega gorovja (angl. Rocky Mountain spotted fever – RMSF)

Prvič je bolezen opisal zdravnik Edward Maxey leta 1899, med množičnim obolevanjem pionirjev, ki so naseljevali mesti Idaho in Montano. Leta 1905 so dokazali, da povzročitelja prenašajo klopi, Wolbach pa je leta 1919 opisal etiološki vzrok bolezni. Ugotovil je, da povzročitelj ni virus, kot so sprva domnevali, ampak bakterija (Weiss E 1988). Bolezen povzroča rikecija vrste *R. rickettsii*, ki naj bi bila od vseh SFG rikeciov najbolj nevarna, saj je smrtnost te rikecioze več kot 30 % in ni izključena, kljub zdravljenju. Brez zdravljenja lahko okužba pri ljudeh vodi do sistemske okužbe, pojava pljučnice, vnetja srčne mišice, hepatitisa, okužbe ledvic, vnetja možganskih oken, gangrene in v končni fazi do smrti (Parola in sod. 2005). Rikecijo *R. rickettsii* prenašajo klopi različnih vrst iz rodu *Amblyomma* (*Amblyomma americanum*), *Dermacentor* (*Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersonii*) in *Rhipicephalus*, ki se lahko prehranjujejo na domačih in divjih živalih (za primer: *Microtus pennsylvanicus* je med pomembnejšimi gostitelji nimf in ličink klopa vrste *D. variabilis*) (Kollars 1996; Parola in sod. 2005). Bolezen se pojavlja na območjih Kanade ter Severne in Južne Amerike, kjer povzroča rikecija takoimenovano Brazilsko vročico (Brazilian spotted fever) (Fuentes 1986; Raoult in Roux 1997; Galvao in sod. 2003; Horta in sod. 2004).

- Sredozemska mrzlica (angl. Mediterranean Spotted Fever)

Sredozemsko mrzlico povzroča rikecija vrste *R. conorii*. Bolezen je poznana pod imeni »Mediterranean spotted fever«, »Boutonneuse fever«, »Kenya tick-bite fever« in »Marseille fever« (Anacker in sod. 1980; Burgdorfer in sod. 1975; Rutherford in sod. 2004; Raoult in Roux 1997). Pojavlja se na območju Sredozemlja (Tunizija, Alžirija, Maroko, Libija, Egipt ...), Sahare, Kenije, Indije, okoli Črnega morja, v vzhodnih predelih Rusije ... (Parola in sod. 2001). Bolj je pogosta poleti in ima podobne klinične znake kot mrzlica Skalnega gorovja, s smrtnostjo okoli 2,5 % (Raoult in Roux 1997). Prenašalci rikecije so klopi iz rodu *Rhipicephalus* (najpogosteje klop vrste *Rhipicephalus sanguineus*), pomembni gostitelji in rezervoarji so psi (Espejo in sod. 1983; Burgdorfer in sod. 1995; Beati in sod. 1996; Anton in sod. 2003; Rutherford in sod. 2004).

Okužba z *R. conorii israeli* (Israeli spotted fever) in *R. conorii caspia* (Astrakhan fever) povzroča podobne klinične znake kot zgoraj omenjena okužba z *R. conorii* (Tarasevich in sod. 1991, Aharanowitz in sod. 1999; Bacellar in sod. 1999, Giammanco in sod. 2003; Rydkina in sod. 1999; Parola in Raoult 2001; Parola in sod. 2005).

- Afriška mrzlica klopnega ugriza (angl. African Tick Bite Fever)

Afriško mrzlico klopnega ugriza povzroča rikecija vrste *R. africae*. Bolezen je bila prvič opisana v Mozambiku in v Južni Afriki leta 1910. Rikecijo so izolirali iz klopa iz rodu *Amblyomma* in poimenovali leta 1973. Patogenost rikecije so dokazali leta 1992 (Fournier in sod. 1999; Parola in sod. 2005). Pred poimenovanjem so rikecijo imenovali *R. conorii* var. *pijperi*. Predvidevali so, da je *R. conorii* povzročitelj obeh afriških rikecioz (tako sredozemske mrzlice kot afriške mrzlice klopnega ugriza) (Xu in sod. 1997). Rikecijo prenašajo klopi vrste *A. hebraeum* in *A. variegatum*, ki se nahajajo v Južni in Osrednji Afriki in na območju Karibov (Kelly in sod. 1996; Raoult in sod. 2001; Kelly 2006). Pomembni prenašalci in rezervoarji rikecije so tudi klopi iz rodu *Rhipicephalus*. Bolezen je blage oblike s kliničnimi znaki kot so vročina, glavobol, mišični revmatizem in izpuščaji na mestu vboda (Kelly in sod. 1992; Fournier in sod. 1999; Parola in sod. 2001; Parola in Raoult 2001a; Jensenius in sod. 2003; Kelly 2006). Posebno pozornost je potrebno posvetiti popotnikom z zgoraj omenjenimi kliničnimi znaki, saj je velik delež okuženih ravno tistih, ki so potovali po podeželskih področjih Južne Afrike (Fournier in sod. 1999; Jensenius in sod. 2003).

- Kalifornijski tifus (angl. Californian Flea Typhus)

Leta 1990 so v srednjem črevesu mačke bolhe (*Ctenocephalides felis*), z elektronskim mikroskopom opazili mikroorganizem, ki so ga sprva poimenovali ELB agent (po EL laboratoriju). Kasneje so ELB agent dokazali tudi v krvnih vzorcih oposumov (Williams in sod. 1992; Radulovic in sod. 1995; Radulovic in sod. 1995a). S primerjavo nuklotidnega zaporedja ELB agenta z izbranimi rikecijami so ugotovili, da se ELB agent z *R. prowazekii* razlikuje v 24 baznih parih, z *R. typhi* pa v 32 baznih parih. Z dodecil sulfat-poliakrilamidno gelsko elektroforezo in imunoblot analizo ELB agenta so ugotovili, da so površinski antigeni ELB agenta bolj sorodni rikeciji *R. typhi*, ki jo prenaša bolha, kot rikeciji, *R. akari*, ki jo prenaša pršica. Na podlagi teh rezultatov in primerjav s 16S rRNK, 17 kDa proteinom in citrat sintaznim genom, so ELB agent leta 1996 preimenovali v *R. felis* (Higgins in sod. 1996).

Primeri okužbe s to vrsto rikecije se pojavljajo na območju Severne in Južne Amerike (Mehika, Brazilija, Peru), Evrope, Afrike, Nove Zelandije (Schriefer in sod. 1994; Higgins in sod. 1996; Zavala-Velazquez in sod. 2000; Bouyer in sod. 2001; La Scola in sod. 2002; Richter in sod. 2002; Oliveira in sod. 2002; Kelly in sod. 2004; Stevenson in sod. 2005). Bolezen, ki jo povzroča *R. felis*, se pojavlja v blagi obliki in je zelo podobna endemični pegavici (Schoeler in sod. 2005).

Veljalo je, da obe, *R. typhi* in *R. felis*, ne vsebujeta 190 kDa antigena. Obe rikeciji ne delata celične lize in plakov na celičnih kulturah, vsebujeta pa 120 kDa antigen; poleg tega obe bakteriji prenašajo bolhe. Posledično so si postavljali vprašanje, ali *R. felis* predstavlja sev rikecije *R. typhi*, ki je prešel dovolj sprememb, da so lahko *R. felis* uvrstili kot novo vrsto (Higgins in sod. 1996). Rikecijo *R. felis* so na začetku uvrstili med predstavnike TG skupine, saj jo prenašajo bolhe (žuželke) in ne klopi (pršice), in reagirajo s protitelesi *R. typhi*. Starejša razdelitev rikecij v skupine je bila namreč narejena na podlagi prenašalca rikecije. Tudi test IF je rikecijo uvrstil med rikecije iz skupine TG. Enakosti z rikecijama iz TG skupine pa so se kazale tudi v rastnih značilnostih rikecije na celični kulturi (Fournier in Raoult 2007). Na podlagi prisotnosti gena *ompA* (Bouyer in sod. 2001), testa IF in ponovne molekularne analize so *R. felis* uvrstili v skupino SFG (Fang in Raoult 2003). Filogenetske analize nukleotidnega zaporedja 16S rRNK so *R. felis* uvrstile v skupino k *R. australis* in *R. akari*. Zanimivo je, da imajo vse tri rikecije različne prenašalce (bolha, klop, plenilska pršica). Z deležem 17 kDa proteina v *R. felis* so dokazali, da je *R. felis* za 11 % drugačna od rikecij iz skupine TG, kar se ujema z 10–12 % razliko, ki je pogoj za razlikovanje med rikecijami iz skupine TG in SFG (Bouyer in sod. 2001). Kot prenašalce te rikecije so opisali tudi klope vrste *Haemaphysalis flava*, *Haemaphysalis kitasatoes* in *Ixodes ovatus* (iz območja Japonske), čeprav se ne ve točno, ali so se klopi okužili z rikecijo iz gostitelja, ki ga je poprej okužila bolha (ki je njen primarni gostitelj), ali se je rikecija med klopi prenesla transovarialno. Sicer pa o življenjskem krogu *R. felis* vedo še zelo malo (Ishikura in sod. 2003). Poleg mačje bolhe (*C. felis*), so rikecijo dokazali tudi v ostalih vrstah bolh, in sicer v pasjih bolhah (*Ctenocephalides canis*) (Horta in sod. 2006a), *Anomiopsyllus nudata* (Stevenson in sod. 2005), ježevi bolhi (*Archaeopsylla erinacei*) (De Sousa in sod. 2006), *Ctenophthalmus* sp., podganji bolhi (*Xenopsylla cheopis*) (Jiang in sod. 2006) in v pršicah iz Koreje (Choi in sod. 2007). Samo pri mačji bolhi (*C. felis*) so uspeli dokazati transovarialen prenos rikecije (Azad in sod. 1992). *Rickettsia felis* je geografsko zelo razširjena, dokazali so jo pri ljudeh, živalih, klopih, bolhah, in ker so klinični znaki okužbe zelo podobni boleznim endemične pegavice, lahko predstavlja okužba z rikecijo *R. felis* v prihodnje večjo grožnjo človeški populaciji, ki bi se je bilo potrebno zavedati (Perez-Osorio in sod. 2008).

- Rikecijske koze (angl. Rickettsialpox)

Rikecijske koze povzročajo rikecija vrste *R. akari*. Klinični znaki bolezni so vročina, glavobol, izpuščaji (podobni kot pri vodenih kozah). Prvič so bolezen opisali leta 1946 v New Yorku. Podatki o bolezni so dostopni iz Ukrajine, Slovenije, Hrvaške, Turčije in Koreje (Radulovic in sod. 1996; Raoult in Roux 1997). Prenašalec je pršica vrste *L. sanguineus*, ki zajeda na domači miši (*M. musculus*) (Raoult in Roux 1997; Comer in sod. 1999; Schoeler in sod. 2005).

- TIBOLA/ DEBONEL

Rikecijo vrste *R. slovaca* so prvič izolirali iz klopa vrste *Dermacentor marginatus* leta 1968 na Slovaškem, njeno patogenost pa so potrdili leta 1980 (Raoult in sod. 2002a). Klinični znaki rikecioze, ki jo povzročajo ta rikecija, se kažejo v obliki povečanih limfnih žlez, iz česar sledi tudi ime rikecioze, TIBOLA (angl. Tick-Borne Lymphadenopathy). Kasneje se je ime preimenovalo v DEBONEL (angl. Dermacentor Borne Necrosis Erythema Lymphadenopathy) (Oteo in sod. 2004; Parola in sod. 2005). *Rickettsia slovaca* je široko razširjena po Evropi (Raoult in sod. 1997a; Parola in Raoult 2001a; Raoult in sod. 2002a). Pomembni prenašalci rikecije so poleg klopa vrste *D. marginatus* tudi klopi vrste *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis inermis* in *Argas persicus* (Beati in sod. 1994).

- Ostale, za človeka patogene rikecije

Med pomembnimi rikeciozami je potrebno omeniti še Queenslandski klopni tifus, ki ga povzročajo *R. australis*, Flindersko mrzlico, ki jo povzročajo *R. honei* in Avstralsko mrzlico, ki jo povzročajo *R. marmionii* – vse na avstralskem kontinentu (Weiss E. 1988; Sexton in sod. 1990; Stewart 1991; Baird in sod. 1996; Raoult in Roux 1997; Stenos in sod. 1997; Stenos in Walker 2000; Graves in Stones 2003; Graves in sod. 2006).

Rikecije, patogene za človeka, so tudi *Rickettsia sibirica mongolotimonae* (Parola in sod. 2001; Parola in Raoult 2001), *R. sibirica sibirica*, ki povzročajo Sibirski klopni tifus (Lewin in sod. 2003), *R. heilongjiangensis* (Zhang in sod. 2000; Parola in sod. 2005), *R. helvetica* (Beati in sod. 1993; Fournier in sod. 1998; Parola in sod. 1998; Nilsson in sod. 1999; Beninati in sod. 2002; Satoh in sod. 2002; Fournier in sod. 2004; Fournier in sod. 2000; Fournier in sod. 2002; Giammanco in sod. 2003; Ishikura in sod. 2003; Parola in sod. 2005), *R. japonica*, ki povzročajo Japonsko mrzlico (Uchida in sod. 1995; Mahara 1997; Satoh in sod. 2001; Satoh in

sod. 2002; Araki in sod. 2002; Fournier in sod. 2002; Ishikura in sod. 2003; Choi in sod. 2005), *Rickettsia parkeri* (Paddock in sod. 2004; Raoult 2004), *R. massiliae* (Beati in Raoult 1993; Parola in Raoult 2001; Vitale in sod. 2005) in *Rickettsia aeschlimannii* (Pretorius in Birtles 2002; Raoult in sod. 2002; Fernandez-Soto in sod. 2003; Punda-Polic in sod. 2002; Matsumoto in sod. 2004; Shpynov in sod. 2004). Klinični znaki teh obolenj so bolj ali manj enaki (Walker in sod. 2007).

2.1.5.2.2 Rikecije s še neznanom patogenostjo

Opisanih je še nekaj rikecij, katerim patogenosti še niso določili. Te rikecije so uradno priznane kot vrste, vendar so jih izolirali iz prenašalcev. To so rikecije vrste *R. bellii*, *R. canadensis*, *R. rhipicephali*, BJ-90, *R. hulinensis*, *R. tamurae* sp. nov. in *Rickettsia* spp. strain S (Raoult in Roux 1997; Fournier in sod. 2006).

Zaradi podobnih znakov z ostalimi boleznimi, kot so rdečke, vodene koze, vročični izpuščaji, tropska mrzlica dengue in leptospiroza, ostanejo rikecioze pogosto neprepoznane in neinterpretirane (Azad in Beard 1998).

2.1.5.2.3 Nepatogene rikecije

Nepatogene rikecije so dokazali v različnih rodovih klopov. Nekatere od njih vsebujejo zunanje membranske proteine, ki jih najdemo tudi v patogenih rikecijah. S spremembo zunanjih membranskih proteinov nepatogenih rikecij se lahko razvijejo patogene rikecije. Klopi, ki vsebujejo nepatogene rikecije, bi zato lahko bili pomembni rezervoar naslednjih generacij patogenih rikecij. Klop vrste *A. americanum* je poznan kot nosilec nepatogene rikecije, izolata WB-8-2, ki je najbolj soroden rikeciji *R. montana* (Weller in sod. 1998). *Rickettsia peacockii* je nepatogena rikecija, endosimbiont v klopih vrste *Dermacentor andersoni*. Predvidevajo, da naj bi bila visoka prisotnost rikecije *R. peacockii* v ovarijih klopov *D. andersoni* vzrok za nezmožnost transovarialnega prenosa *R. rickettsii*. Rikecija *R. peacockii* je sorodna rikeciji *R. rickettsii*. Od nje se razlikuje v omejeni možnosti izražanja gena *ompA*. Zaradi zmanjšane sposobnosti tvorbe aktinskih filamentov (*R. peacockii*), je oslABLJena vezava rikecije na gostiteljsko celico, kar pojasnjuje njeno nepatogenost (Niebylski in sod. 1997; Azad in Beard 1998; Simser in sod. 2001; Baldrige in sod. 2004).

Predvidevajo, da so se nepatogene rikecije razvile iz patogenih, ker so izgubile sposobnost okužbe gostitelja in prenašalca. Študije teh vrst rikecij lahko pomagajo pri prepoznavanju mehanizmov, ki dovoljujejo nepatogenim organizmom, da se ponovno vzpostavijo kot patogeni in tako posredujejo informacijo o tem, kako lahko endosimbionti pripomorejo h kontroli klosov in njihovih patogenov, ki jih prenašajo (Simser in sod. 2001).

2.1.6 Diagnostika in zdravljenje rikecioz

Kljub razširjenosti rikecij in rikecioz, se raziskovanju tega področja namenja premalo pozornosti. Simptomi rikecioz so si med seboj zelo podobni, zato je diagnostika dokaj težavna. Še danes se, kljub zelo razvitim diagnostičnim tehnikam, rikecioze diagnosticirajo v nezadovoljivi meri (Azad in Radulovic 2003).

2.1.6.1 Diagnostika rikecioz

Za diagnosticiranje rikecioz uporabljajo serološke in molekularno-biološke tehnike ter tehnike gojenja celičnih kultur. Pri odločitvi za test moramo biti pozorni na vrsto rikecije, ki jo raziskujemo, na dostopnost in občutljivost opreme in usposobljenost delavcev ter na specifičnost in uporabo rezultatov; v rutinske ali raziskovalne namene.

2.1.6.1.1 Serologija

Ko se odločamo za izbiro laboratorijske diagnostike za dokazovanje rikecij, moramo upoštevati specifičnost, občutljivost in ceno testa. Obstaja več seroloških testov za dokazovanje rikecij, in sicer: Weil-Felix test, test IF, imunoperoksidazni test, komplementarna fiksacija, encimsko vezani imunosorbentni test, Western blotting, Line blot test, mikroaglutinacijski test, indirektni hemaglutinacijski test, latex aglutinacijski test in test navzkrižne adsorpcije (Tselentis in Gikas 2007). Z Weil-Felix testom zaznajo samo IgM protitelesa, 5–10 dni po okužbi. Je slabo občutljiv in specifičen in ga danes ne uporabljajo več (Amano in sod. 1992; La Scola in Raoult 1997). Imunoperoksidazni test je alternativni IF, kjer namesto fluorescina uporabijo peroksidazo. S tem omogočijo stalno preparacijo vzorca in opazovanje le-tega pod navadnim svetlobnim mikroskopom. Komplementarna fiksacija je visoko specifična, vendar v zgodnji fazi bolezni ni dovolj občutljiva. S testom zaznajo protitelesa po drugem ali šele po četrtem tednu bolezni. Uporabna je za seroepidemiološke študije. Encimsko vezani imunosorbentni test je enako občutljiv kot test IF in ga uporabljajo za akutne in seroepidemiološke študije. Z njim zaznajo protitelesa v serumu tudi po

enem letu po bolezni. Pomanjkljivost tega testa je časovna zamudnost (La Scola in Raoult 1997). Western blotting je najbolj specifičen test, s katerim zaznajo protitelesa v zelo zgodnji fazi bolezni in je primerljiv z IF. Z njim ločijo med pozitivnimi in lažno pozitivnimi rezultati. Je časovno zamudna metoda in na voljo le v referenčnih laboratorijih (Teyssere in Raoult 1992; La Scola in Raoult 1997). Občutljivost in specifičnost Line blot testa je podobna IF, vendar je test uporaben samo v primerih akutne bolezni. Mikroaglutinacijski test je manj občutljiv od IF in kaže največ navzkrižnih reakcij od vseh testov. Indirektni hemaglutinacijski test je zelo enostavna metoda dokazovanja rikecij, vendar je manj občutljiva od IF (Tselentis in Gikas 2007). Latex aglutinacijski test je enostavna, po občutljivosti primerljiva metoda z IF. Pomankljivost metode so zelo dragi reagenti. Najboljša izbira testa je test IF (La Scola in Raoult 1997). Občutljivost testa IF je 94–100 %, specifičnost pa je lahko tudi do 100 % (Parola in sod. 2005). S serološkimi metodami lahko danes ločijo ne le protitelesa proti skupinam, ampak tudi proti posameznim vrstam rikecij, seveda pa se pri sorodnih vrstah lahko pojavi tudi navzkrižna reaktivnost (La Scola in Raoult 1997).

2.1.6.1.2 Gojenje rikecij

Tehnika gojenja rikecij je uporabna za izolacijo rikecij iz vzorcev. Izolacija rikecij iz na rikecije pozitivne hemolimfe je časovno zamudna (rikecije rastejo v primerjavi z ostalimi bakterijami počasneje (Winkler 1990)) in ne najbolj praktična tehnika v primerih večjih epidemioloških študij. Tehnika je dokaj občutljiva, zato je dobro, da jo izvede tehnično usposobljena oseba (Beati in sod. 1992). Predvsem se je izolacija rikecij izboljšala z razvojem Shell-Vial tehnike (Kelly in sod. 1991).

Klopne in ostale nevretenčarske celične linije, dvoživkine celične linije, človeška embrionalna pljuča in piščančje embrionalne celice se lahko uporabljajo za gojenje rikecij. Ker rikecije ne rastejo v gojiščih z antibiotikom, je potrebno biti pri delu zelo natančen, da ne pride do okužbe, in da rikecij ne prerastejo druge bakterije ali glive (Baird in sod. 1992; Raoult in Roux 1997). Posamezne rikecijske vrste se razlikujejo v optimalnih temperaturah za rast, kjer rastejo rikecije iz TG pri temperaturi 35°C, rikecije iz SFG pa pri temperaturi 32–34°C (Teyssere in sod. 1992). Razlike med rikecijami so tudi v času, ki je potreben za pojav prvih rikecij na celični kulturi in v izboru celične linije (Baird in sod. 1992; Raoult in Roux 1997).

2.1.6.1.3 Molekularno – biološke metode za dokazovanje rikecij

PCR je skupaj s sekveniranjem najbolj specifična metoda za dokazovanje rikecij. Navadni PCR je neuporaben za diagnosticiranje v primerih, ko se v periferni krvi nahaja nizka koncentracija rikecij (Stenos in sod. 2005). PCR v realnem času je napredek v razvoju PCR tehnik in je zelo občutljiva tehnika in se ga zato uporablja na kliničnih vzorcih (Reynolds in sod. 2003). Zaradi visoke občutljivosti, tudi do dokaza ene SFG rikecije v PCR reakciji, je test uporaben za dokazovanje rikecij v rikecemičnih pacientih, kjer je koncentracija bakterij zelo nizka. PCR v realnem času je dobra tehnika za reševanje problemov, ki nastanejo pri serologiji in navadnem PCR (Stenos in sod. 2005).

Za dokazovanje rikecijske DNK se pri metodi PCR uporabljajo specifični začetni oligonukleotidi za rikecijske gene – 16S rRNK gen (Wilson in sod. 1990), 17 kDa antigen (Anderson in Tzianabos 1989), citrat sintazni gen *gltA* (Roux in sod. 1997), geni, ki kodirajo zunanje proteine rOmpB (Ching in sod. 1990) in rOmpA za SFG rikecije (Roux in sod. 1996), *groEL* gen, ki kodira 60 kDa protein temperaturnega šoka (Lee in sod. 2003) in gen *sca4* (gen *D*), ki kodira protein PS 120 (Sekeyova in sod. 2001). Objavljeni PCR protokoli niso vrstno specifični, zato je potrebno PCR produkte analizirati z metodo sekveniranja, da določimo vrsto rikecije (Raoult in Roux 1997). Potrebno je opozoriti, da ni standardnega algoritma za uporabo določenih PCR testov za dokazovanje rikecij – protokoli se med laboratoriji razlikujejo.

2.1.6.2 Zdravljenje rikecioz

Najpogosteje za zdravljenju rikecioz uporabljajo tetracikline, med katerimi je najpogosteje uporabljen doksiciklin. Uporabljajo ga lahko otroci in odrasli, vendar ne nosečnice. Priporočljiva doza jemanja za odrasle je 100 mg antibiotika/12 ur, za otroke 5 mg/kg/dan. Zdravljenje ponavadi traja 7–15 dni, ali vsaj 2 dni. V primeru neučinkovitosti zdravljenja z doksiciklinom, se lahko uporabi kloramfenikol, ki ga lahko jemljejo tudi nosečnice. Seveda je uporaba antibiotikov vezana tudi na specifično okužbo z rikecijo. Med pomembne antibiotike, ki jih lahko uporabljajo za zdravljenje rikecioz, sodijo tudi fluorokinoli (ciprofloksacin, ofloksacin, pefloksacin, levofloksacin), rifampicin, thiamfenikol, makrolid, eritromicin, klaritromicin, josamicin in telitromicin (Tselentis in Gikas 2007). Pri bolnikih, ki imajo zmanjšano sposobnost sinteze glukoze-6-fosfat dehidrogenaze, je zdravljenje z antibiotiki nezadostno, če pacienti sami ne vplivajo na izboljševanje imunske odpornosti. Sinteza glukoze-6-fosfat dehidrogenaze je namreč pomembna komponenta zaščitnega antioksidativnega sistema celice, ki jo okuži rikecija (Walker in sod. 2007).

Zadostno poznavanje interakcij med rikecijami in gostiteljskimi celicami je pomembno za odkrivanje metod za preprečevanje rikecijskih okužb z inhibicijo prve stopnje okužbe, vezave rikecij na gostiteljske celice (Walker in sod. 2007). Z metodo pretočne citometrije in monoklonskimi protitelesi so dokazali, da je med vsemi površinskimi proteini rikecij, protein rOmpA, najbolj kritičen in odgovoren za pritrjevanje rikecij na gostiteljsko celico (Li in Walker 1992). Proteina rOmpA in rOmpB naj bi bila dobra kandidata za cepivo, saj njihovi površinski epitopi vsebujejo epitope tako T kot B limfocitov (Diaz-Montero in sod. 2001). S fragmenti rOmpA 2176–3933, rOmpA 4999–6710, rOmpB 1550–2738 in rOmpB 2459–4123, ki so jih uporabili v cepivu, so uspeli hipotetično dokazati 100 % zaščito miši pred rikecijsko okužbo z *R. conorii*. Vendar pa komercialno izdelanega cepiva proti rikecijski okužbi še ni (Diaz-Montero in sod. 2001). Whithworth in sod. (2005) predlagajo razvoj zdravil in protiteles v smeri, ki bi omogočila inhibicijo funkcij proteinov Tly C in Pld, predvsem pri okužbah z *R. prowazekii*.

2.1.7 Kriteriji za opis in poimenovanje nove vrste rikecije in rikecioz

2.1.7.1 Kriteriji za opisovanje nove vrste rikecije

2.1.7.1.1 Začetki opisovanja novih vrst rikecij

Rod *Rickettsia* je bil na začetku razdeljen v tri skupine; v skupino rikecij, ki povzročajo pegavice (TG), v skupino rikecij, ki povzročajo mrzlice (SFG) in v skupino rikecij, ki povzročajo grmičevsko mrzlico (STG), predvsem na podlagi naslednjih kriterijev:

- znotrajcelični položaj bakterije v jedru in citoplazmi in sposobnost polimerizacije celičnega aktina, kar je značilnost predstavnikov skupine SFG (Gouin in sod. 2004),
- optimalna temperatura, potrebna za rast: 32°C za predstavnike iz skupine SFG in 35°C za predstavnike iz skupine TG in STG,
- navzkrižne reakcije seruma bolnikov z antigeni treh sevov vrste *Proteus vulgaris* (sevi imajo podobne površinske antigene kot rikecije in zato aglutinirajo s serumi bolnikov, okuženih z rikecijami): sev OX19 za predstavnike iz skupine TG in rikecijo *R. rickettsii*, sev OX2 za predstavnike iz skupine SFG in sev OXK za predstavnike iz skupine STG (Tamura in sod. 1995; Raoult in sod. 2005).

Poleg teh kriterijev so uporabljali tudi druge, in sicer, geografsko razširjenost sevov; prenašalce rikecije; velikost rikecije; patogenost rikecije za ljudi, miši, morske prašičke; čas, potreben za rast rikecije na celični kulturi; hemolitska aktivnost (Raoult in sod. 2005); nevtralizacija toksinov (Bell in Stoenner 1960); rast rikecije v embrionalnih kokošjih jajcih (Raoult in sod. 2005). Osnovni molekularni kriterij za identifikacijo bakterij je bil DNK G+C delež (32–33 % za predstavnike skupine SFG in 29 % za predstavnike skupine TG) (Stockebrandt in sod. 2002; Fournier in Raoult 2007).

2.1.7.1.2 Antigensko in serološko določanje

Do sredine osemdesetih let prejšnjega stoletja sta bili test IF z uporabo poliklonskih protiteles in serotipizacija z monoklonskimi protitelesi referenčni metodi za identifikacijo novih rikecij (Philip in sod. 1978; Raoult in sod. 2005). Test IF s protitelesi iz akutne faze mišjega seruma je bil referenčna metoda za identifikacijo novih SFG rikecij. S testom zaznajo vrstno specifične epitope na površini S-plasti proteina (rOmpA, rOmpB ali Sca4) rikecije (Philip in sod. 1978). Kljub temu, da je ta metoda dokaj uporabna, vsebuje nekaj pomanjkljivosti, in sicer, nezmožnost ponovljivosti in nujnost primerjave vsakega novega izolata z vsemi prej opisanimi rikecijskimi vrstami (Fournier in Raoult 2007). Primerjava proteinov s poliakrilamidno gel elektroforezo v prisotnosti SDS-PAGE in metodo Western Blotting uporabljajo za pregled antigenskih značilnosti novih izolatov in za filogenetsko uvrstitev letih v primerjavi z že prej določenimi rikecijami. Tehnike zaznajo protein rOmpA in rOmpB, ki vsebujeta vrstno specifične epitope. Vendar pa je priprava testov dokaj težka in časovno zamudna in se lahko izvaja samo v laboratorijih tretje stopnje biološke varnosti. Potrebna je kultivacija rikecij, vzgoja poskusnih živali, velika plošča specifičnih antiserumov in seveda usposobljeni delavci za delo v laboratoriju te stopnje (Beati in sod. 1992; Bouyer in sod. 2001; Parola in Raoult 2001). Vse zgoraj opisane tehnike pa so taksonomsko klasifikacijo rikecij privedle do dvomljive situacije, v kateri so seve, serotipe in vrste genetsko povsem izenačili (Beati in sod. 1992).

Kljub razvoju molekularnih taksonomskih metod, se zgoraj opisane tehnike še vedno uporabljajo za pridobivanje pomembnih informacij o odnosih med rikecijami in novih vrstah (Beati in sod. 1992; Xu in sod. 1997; Xu in Raoult 1998). Z razvojem novih tehnik kultivacije, in s tem posledično zanesljivim virom antigenov za teste postajajo namreč zgoraj opisane tehnike ponovno uporabne (La Scola in Raoult 1997; Fang in Raoult 2003).

2.1.7.1.3 Molekularno – biološki testi

Genotipizacija je v primerjavi s serotipizacijo bolj objektivna (Parola in sod. 2005). Kriteriji za taksonomsko določitev novega izolata rikecije se še vedno dopolnjujejo (Raoult in Roux 1997).

Predvidevajo, da naj bi bile rikecije pod manjšim evolucijskim pritiskom kot ostale bakterijske vrste, predvsem zaradi majhnega genoma in znotrajceličnega načina življenja. Vse to se odraža v nizki stopnji mutacij in v 70 % DNK-DNK sorodnosti med posameznimi vrstami rikecij. Na podlagi tega kriterija bi lahko vse vrste rikecij iz skupine SFG uvrstili v eno vrsto, kljub temu, da imajo različno ekologijo in povzročajo različne bolezni (Fournier in sod. 2003; Renesto in sod. 2005).

Fournier in sod. (2003) so opisali nekaj objektivnih navodil za klasifikacijo novih rikecijskih izolatov na različnih taksonomskih stopnjah (rod, skupina, vrsta), katerih osnova so zaporedja izbranih genov – 16S rRNK, *gltA*, *ompA*, *ompB* in *sca4* (gen *D*) in metoda multi-locus sequence typing (MLST), narejena na podlagi primerjav 20-ih priznanih rikecijskih vrst s serotipizacijo (Fournier in Raoult 2007).

Gen 16S rRNK so uporabljali za razločevanje med bakterijskimi vrstami. Ker je med posameznimi rikecijskimi vrstami zelo malo razlik, je uporaba gena 16S rRNK nezadostna (Fox 1992; Roux in sod. 1997). Gen *gltA* mutira pogosteje kot ostali rikecijski geni in je zato bolj občutljiv in primernejši za filogenetsko analizo (Roux in sod. 1997). Zunanji protein rOmpA je specifičen za SFG skupino in se precej razlikuje med posameznimi rikecijami znotraj skupine (Fournier in sod. 1998). Zunanja proteina rOmpB (Roux in Raoult 2000) in Sca4 (Sekeyova in sod. 2001) se nahajata pri TG in SFG skupini in sta tudi uporabna pri taksonomskem določanju novih izolatov (La Scola in Raoult 1997; Fournier in sod. 2003). Če želimo določiti nov izolat, moramo sekvenirati najmanj pet genov (Fournier in sod. 2003).

Da lahko izolat uvrstimo v rod *Rickettsia* mora le-ta zagotoviti določenim pogojem:

- izolat naj bi bil v 98,1 % in 86,5 % enak z nukleotidnim zaporedjem 16S rRNK in genom *gltA* iz katerekoli vrste rikecij.

Predstavnik TG skupine mora zadostiti vsaj dvema od štirih pogojev:

- $\geq 99,4$ %, $\geq 96,6$ %, $\geq 92,4$ %, $\geq 91,6$ % podobnost nukleotidnih zaporedij s 16S rRNK, z *gltA*, *ompB* in *sca4* geni rikecij vrst *R. typhi* ali *R. prowazekii*.

Predstavnik SFG skupine naj bi vseboval ali gen *ompA* ali izpolnil vsaj dva od naslednjih pogojev:

- $\geq 98,8\%$, $\geq 92,7\%$, $\geq 85,8\%$ in $\geq 82,2\%$ podobnost nukleotidnih zaporedij s 16S rRNK, z *gltA*, *ompB* in *sca4* geni s katerikoli predstavnikom rikecij iz skupine SFG (Fournier in sod. 2003).

Izolat nove vrste rikecije naj ne bi vseboval več kot eno od naslednjih nukleotidnih podobnosti znotraj homolognih znanih vrst:

- $\geq 99,8\%$ in $\geq 99,9\%$ s 16S rRNK in *gltA* genom

in ravno tako ne več kot eno od naslednjih nukleotidnih podobnosti:

- $\geq 98,8\%$, $\geq 99,2\%$ in $\geq 99,3\%$ za *ompA*, *ompB* in *sca4* gene (Fournier in sod. 2003).

Izolate, ki ne sovpadajo z zgoraj opisanimi pogoji, se lahko obravnava kot podvrste, če imajo različne serotipske in epidemioklinične značilnosti. To je značilno za kompleks vrst (sevov), ki so sorodne vrsti *R. conorii*: »*R. conorii* subsp. *conorii* subsp. nov.«, *R. conorii* subsp. *indica* subsp. nov.«, »*R. conorii* subsp. *caspia* subsp. nov.« in »*R. conorii* subsp. *israelensis* subsp. nov.« (Phillip in sod. 1978; Parola in sod. 2005; Zhu in sod. 2005).

Pomembno je poudariti, da različne metode za identifikacijo rikecij dajejo enake rezultate, še posebej, ker temeljijo na analizi glavnih površinskih proteinov rikecij, rOmpA in rOmpB, ki sta udeležena v antigenih lastnostih različnih vrst in sevov kot tudi v obrambni imunski odziv vretenčarskega gostitelja (Anderson in sod. 1990; Ereemeeva in sod. 1994).

Razvili so tudi zelo občutljivo metodo »multi-spacer typing« (MST), ki znotraj posameznih rikecij ločuje tudi na nivoju sevov. Narejena je bila na predpostavki, da so »intergenic spacers«, ki so nekodirajoča zaporedja, izpostavljena manjšemu evolucijskemu pritisku kot geni in so zato bolj variabilni med sevi bakterije (Fournier in Raoult 2007). Z MST metodo so tako npr. indentificirali 27 genotipov med 39-imi sevi vrste *R. conorii* (Fournier in sod. 2004) in 4 genotipe med 15-imi sevi vrste *R. prowazekii* (Zhu in sod. 2005).

Z izboljševanjem metod za diagnosticiranje se je v zadnjih 20-ih letih število članov rodu *Rickettsia* zelo povečalo. Danes je uradno poznanih že 24 vrst. Število še neidentificiranih izolatov ali genotipov prav tako hitro narašča (Fournier in Raoult 2007).

2.1.7.2 Poimenovanje rikecij in rikecioz

Poimenovanje bakterij in tudi rikecij temelji na Linnejevem binalnem sistemu. Nova rodovna imena se piše z veliko začetnico, v latinščini in v pisavi *italics*. Sledi mu oznaka » gen. nov. «. Imena vrst so sestavljena iz rodovnega imena in pridevnika. Pridevnik se začne z majhno črko, je v latinščini in v pisavi *italics*. Lahko je izpeljan iz imena oseb, geografske lokacije. Za imenom nove vrste sledi napis » sp. nov. «. Ime podvrste je sestavljeno iz imena vrste, ki mu sledi oznaka » subsp. nov. «, ki mu sledi pridevnik, ki označuje podvrsto (Raoult in sod. 2005).

Rikecije, ki še niso kultivirane, vendar zadostijo vsem ostalim genetskim kriterijem za poimenovanje v vrsto, imenujejo *Candidatus*, ki mu sledi predlagano ime. *Candidatus* je zapisano v pisavi *italics*, predlagano ime pa v normalni pisavi (npr. *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*) (Raoult in sod. 2005).

Rikecije, ki so poimenovane kot sevi, se poimenuje z rodovnim imenom *Rickettsia* (pisava *italics*), temu sledi oznaka sp. strain (kar označuje sev), ki mu sledi ime seva (npr. *Rickettsia* sp.strain IRS3). Sev se lahko poimenuje po osebah, po prenašalcih rikecije, po laboratorijih, idr.

Pri poimenovanju rikecioz ne obstajajo tako natančna pravila. Rikecioze poimenujejo po geografski razširjenosti bolezni (npr. Queensland tick typhus), po prenašalcih (npr. flea-borne spotted fever), po kliničnih znakih bolezni (npr. TIBOLA, Tick-Borne Lymphadenopathy) in epidemioloških znakih (Raoult in sod. 2005).

2.2 KLOPI

2.2.1 Klopi in rikecije

Rikecije so evolucijsko vezane na prenašalce iz skupine členonožcev (Walker in sod. 2007). Iz skupine pršic (Acarina), so klopi najpogostejši prenašalci rikecij. Klopi iz družine Ixodidae so najpogostejši prenašalci rikecij iz skupine SFG, z dvema izjemama, rikecijo vrste *R. akari* in *R. felis* (Raoult in Roux 1997; Azad in Beard 1998). Pod določenimi pogoji lahko tudi predstavniki rikecij iz skupine TG (*R. prowazekii*) prenašajo klopi (Medina-Sanchez in sod. 2005). Klopi iz družine mehkih klopov, Argasidae, niso, oziroma so zelo redko prenašalci rikecij (Walker in sod. 2007). Pred kratkim so dokazali prisotnost rikecij v mehkih klopih vrste *Carios capensis* in *Ornithodoros moubata* (Kawabata in sod. 2006; Cutler in sod. 2006).

2.2.2 Klopi iz rodu *Haemaphysalis* in klop vrste *Haemaphysalis sulcata*

2.2.2.1 Klopi iz rodu *Haemaphysalis*

Klope iz rodu *Haemaphysalis* rikeciologi dolgo niso upoštevali kot pomembne pri prenašanju rikecij. Naštejemo lahko nekaj razlogov: a) klopi iz rodu *Haemaphysalis* zelo redko ubodejo ljudi in so posledično minimalno vključeni v prenašanje rikecioz, b) prenašalci za človeške rikecioze so že bili opisani in klope iz rodu *Haemaphysalis* niso testirali na njih in c) delno tudi zaradi tega, ker se na Ameriškem kontinentu nahajajo samo 4 vrste klopov iz rodu *Haemaphysalis*, ki prenašajo rikecije vrste *R. rickettsii* (npr. *Haemaphysalis leachi*) in *R. canada* (Walker in sod. 2007). Z opisom rikecije vrste *R. japonica* v klopih iz rodu *Haemaphysalis* (*Haemaphysalis flava*, *Haemaphysalis longicornis*) je vloga klopov iz tega rodu, kot prenašalcev in rezervoarjev rikecij, postala bolj pomembna in raziskana (Ishikura in sod. 2003; Lee in sod. 2003a). Klopi *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis japonica*, *Haemaphysalis wellingtoni* in *Haemaphysalis yeni* so prenašalci rikecije *R. sibirica* (Chen in sod. 1998). *Haemaphysalis concinna* in *Hae. japonica* prenašata rikecijo *R. hejlongjiangensis* (Meddianikov in sod. 2007), *Haemaphysalis novaeguineae* pa prenaša *Candidatus Rickettsia marmionii* (Graves in sod. 2006).

2.2.2.2 Klop vrste *Haemaphysalis sulcata*

V suličastih klopih (*Haemaphysalis sulcata*) nabranih na ovcah in kozah v Srednji Dalmaciji, so na osnovi molekularnih značilnosti opisali rikecijo podobno rikeciji *R. felis* (Duh in sod. 2006). V literaturi nismo zasledili podatkov o pojavljanju klopov vrste *Hae. sulcata* na območju Hrvaške (Mikačić 1965) ali Slovenije (Prirodoslovni muzej Slovenije – PMS, Trilar, ustno). V Sloveniji vrsta klopa *Hae. sulcata* ni prisotna (zbirka klopov – PMS, Trilar, ustno). Klop te vrste je razširjen na območju Sredozemlja, step in puščav. V Evropi so ga našli v različnih državah (Ciper, Grčija, Romunija, Jugoslavija, Madžarska, Italija, Francija, Španija), vedno na območju stepske vegetacije. V Severni Afriki so podatki iz območja Maroka, Alžirije, Tunizije in Libije, našli pa so jih tudi na območju Turčije, Izraela in Sirije. Pojavlja se tudi na območju Azije (Pakistan, Indija, Afganistan, Iran, Saudska Arabija, Irak, Jordanija). Klop vrste *Hae. sulcata* je pomemben zajedavec na živini na območju Sredozemlja. Odrasli klopi so aktivni jeseni in pozimi, med oktobrom in marcem, ličinke in nimfe pa predvsem v mesecu aprilu in juliju. Klop je trigostiteljski. Odrasli klopi se večinoma prehranjujejo na ovcah, ličinke in nimfe pa na plazilcih (Estrada-Pena in sod. 2004).

2.3 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Ixodidni klopi so najpomembnejši in najpogostejši prenašalci in rezervoarji SFG rikecij, znotraj katerih sta dve vrsti rikecij vezani na bolhe (*R. felis*) in uši (*R. acari*). Klopi iz rodu *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes* in *Amblyomma* so prenašalci različnih rikecij, vključno s humanimi patogeni (Azad in Beard 1998). Glede na podatke iz literature, postaja tudi rod *Haemaphysalis* vse bolj prepoznan (Chen in sod. 1998; Ishikura in sod. 2003; Lee in sod. 2003a; Graves in sod. 2006; Duh in sod. 2006; Meddianikov in sod. 2007). Klopi iz skupine Argasidae zelo redko prenašajo rikecije (Telford in Parola 2007). Pred kratkim so dokazali prisotnost rikecij v mehkih klopih vrste *C. capensis* in *O. moubata* (Kawabata in sod. 2006; Cutler in sod. 2006). Rikeciologija je razvijajoča se disciplina, zato je povsem pričakovano, da se število na novo odkritih rikecij povečuje. Rikecije iz skupine SFG postajajo vse bolj prepoznavne in pomembne pri pojavljanju rikecioz (Parola in sod. 2005). Po uveljavljenih kriterijih (Fournier in sod. 2003) je za opis nove vrste rikecije na osnovi molekularnih značilnosti potrebno analizirati odseke vsaj petih genov izmed genov: 16S rRNK, 17 kDa, *gltA*, *ompB*, *ompA*, *sca1*, *sca2*, *sca4* in *groEL*. Med pomembne biološke značilnosti pri opisu nove vrste rikecije prištevajo osamitev in kultivacijo rikecije, morfologijo in ultrastrukturo ter določitev patogenosti (Fournier in sod. 2007).

V Srednji Dalmaciji so preiskali različne vrste klopov, nabranih iz ovc, koz, psov in vegetacije in ugotavljali prisotnost rikecij v njih. V suličastih klopih (*Hae. sulcata*) so na osnovi molekularnih značilnosti opisali rikecijo podobno rikeciji *R. felis*. Prisotnost bakterije so dokazali pri več kot 26 % testiranih klopov v letih od 2000 do 2002. Podobnost rikecije z *R. felis* je bila ugotovljena v primeru gena *gltA* (97,5 %), v primeru gena za 17 kDa protein (95,2 %) in v primeru gena *ompB* (98 %). Gena *ompA* z obstoječimi začetnimi oligonukleotidi niso uspeli pomnožiti (Duh in sod. 2006). Iz pregleda literature o *R. felis* je razvidno, da je o tej rikeciji še veliko neznanega. Ker je rikecija humani patogen, in ker je njena razvrstitev nejasna, je zanimiva za številne raziskave. Iz predhodnih raziskav, v katerih opisujejo rikecijo podobno *R. felis*, ne morejo potrditi obstoja nove vrste, ker ni dovolj podatkov, da bi zadostili kriterijem.

Leta 2007 so v embrionalni celični liniji CCE3 (pri temperaturi 32–34°C) iz klopov vrste *C. capensis*, nabranih iz morskih ptic, rjavi pelikan (Georgia, USA), izolirali rikecijskega endosimbionta, *Candidatus Rickettsia hoogstraalii* (Mattila in sod. 2007). Tega endosimbionta so našli tudi v klopu vrste *O. moubata* iz morskih ptic na Japonskem otoku, v

Tanzaniji in Afriki (Cutler in sod. 2006). Zaporedje gena *gltA* in gena, ki kodira 17 kDa protein je bilo v vseh primerih 100 % identično zaporedju genov zgoraj omenjene nove rikecije, ki so jo odkrili v klopih vrste *Hae. sulcata*. Pri *Candidatus R. hoogstraalii* so uspešno pomnožili odsek gena *ompA* z na novo oblikovanimi začetnimi oligonukleotidi (Mattila in sod. 2007).

Na osnovi pregledane literature in dosedanjih raziskav je smiselno pravilno okarakterizirati novo rikecijo sorodno *R. felis*. Temu vprid lahko naštejemo več razlogov: a) podobnost z *R. felis*, ki je humani patogen, b) simptomi *R. felis* rikecioze so podobni *R. conorii* rikeciozi, ki je endemična na Hrvaškem, c) visok odstotek okuženih klopov, ki lahko parazitirajo na ljudeh, č) genetska podobnost rikeciji iz mehkih klopov iz drugega konca sveta in d) pojavljanje v endemičnem območju južne Hrvaške, ki je razvito turistično območje tudi za Slovence.

Za opis nove vrste moramo zadostiti opisanim kriterijem in zato smo si v okviru doktorske naloge zastavili več ciljev:

1. Osamitev in kultivacija nove rikecije.
2. Opis morfoloških lastnosti nove rikecije v klopih in gojene v celični kulturi.
3. Molekularna opredelitev dodatnih genov nove rikecije, to je *ompA* in 16S rRNK, izolirane direktno iz klopov in gojene na celični kulturi.
4. Opis patogenosti nove rikecije.

Glede na literaturo predpostavljamo, da bomo uspešno osamili in kultivirali novo rikecijo. Rikecijo *R. felis* so uspešno vzgojili na celični liniji komarjevih celic C6/36, pridobljenih iz ličinke tigrastega komarja (*Aedes albopictus*) (Horta in sod. 2006) in v celični kulturi XTC2 iz afriške žabe *Xenopus laevis* (Ogata in sod. 2005). Rikecije iz skupine SFG rastejo na celičnih kulturah navadno pri temperaturi nad 30°C, *R. felis* pa so na celični liniji C6/36 uspešno vzgojili pri temperaturi 25°C, kar je posebna značilnost te rikecije (Horta in sod. 2006). Zaradi velike podobnosti med *R. felis* in rikecijo podobno rikeciji *R. felis*, ki smo jo molekularno dokazali v klopih *Hae. sulcata*, predvidevamo, da bo nova rikecija uspešno rasla na komarjevih celicah C6/36, pod podobnimi pogoji kot *R. felis*.

Glede na izkušnost strokovnjakov iz področja elektronske mikroskopije, s katerimi bomo sodelovali, predvidevamo, da bomo z elektronsko mikroskopijo potrdili prisotnost rikecije v notranjih organih klopov *Hae. sulcata* (žleze slinavke, prebavnem sistemu in jajčnikih).

Prav tako sklepamo, da bomo uspešno pomnožili dodatne gene (*ompA* in 16S rRNK), če bomo uporabili nove, manj specifične začetne oligonukleotide.

Genetsko sorodna *Candidatus* R. hoogstraalii je bila patogena za celično linijo, zato obstaja možnost, da bo nova rikecija patogena tudi za poskusne živali.

3 MATERIALI

3.1 Nabiranje klopov

V nedavni raziskavi so na območju Srednje Dalmacije preiskali različne vrste klopov, med njimi tudi klope iz rodu *Haemaphysalis* in ugotavljali prisotnost rikecij. V suličastih klopih (*Hae. sulcata*) (Slika 3) so na osnovi molekularnih značilnosti opisali rikecijo, podobno *R. felis* (Duh in sod. 2006). Tudi v naši raziskavi smo uporabili klope iz zbirke iz Splita iz leta 2000–2002, shranjene na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) pri temperaturi -80°C (Tabela 2). Zaradi nadaljnjih bioloških in molekularnih raziskav, potrebnih za opis nove vrste rikecije, smo ponovili terensko delo v Severni in Srednji Dalmaciji (Split, Zadar) in nabrali nove klope. Izbrali smo lokacije, na katerih so predhodno že odkrili novo in isto rikecijo v klopih vrste *Hae. sulcata*. Na območju Splita (2006) smo nabrali samo enega samca klopa vrste *Hae. sulcata*, na območju Zadra (2007) dva samca in na območju Splita (2007) štiri samice in 14 samcev iste vrste. Klope smo najprej očistili v 70 % alkoholu in sterilni vodi in jih nato pripravili za opazovanje z elektronsko mikroskopijo.



Slika 3: Klop vrste *Hae. sulcata* (na levi sliki je samec, na desni napita samica) (Foto: T. Trilar).

Z metodo nabiranja klopov iz gostiteljev ovc (*Ovis aries*), koz (*Capra aegagrus hircus*) in psov (*Canis lupus familiaris*) (Slika 4 in 5) in z metodo vlečenja zastave po vegetaciji (Slika 6 in 7) smo na območju Splita – oktober 2006, Zadra – april 2007 in Splita – november 2007, nabrali 273 (Split 2006), 405 (Zadar 2007) in 265 (Split 2007) klopov. V Splitu (2006) smo nabrali tri vrste klopov, klope vrste *Hae. sulcata*, *Hae. punctata* in

D. marginatus, v Zadru (2007) smo nabrali sedem vrst klopov, in sicer klope vrste *Hae. sulcata*, *Hae. punctata*, *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Ixodes gibbosus* in *D. marginatus*, v Splitu (2007) pa samo dve vrsti klopov, klopa vrste *Hae. punctata* in *Hae. sulcata*. V prilogah A, B in C so podani natančnejši podatki lokalitet vzorčenja. Klope smo pregledali v Prirodoslovnem muzeju Slovenije in jih taksonomsko določili z uporabo določevalnega ključa (Trilar, neobjavljeno).



Slika 4: Nabiranje klopov iz ovce v Splitu, leta 2007 (Foto: M. Korva).



Slika 5: Povečan prikaz metode nabiranja klopov iz ovce v Zadru, leta 2007 (Foto: T. Trilar).



Slika 6: Nabiranje klopov z metodo zastave (Foto: T. Trilar).



Slika 7: Pobiranje klopov s krpe z ekshaustorjem (Foto: T. Trilar).

4 METODE IN REZULTATI

4.1 OSAMITEV IN KULTIVACIJA NOVE RIKECIJE

4.1.1 Priprava celične linije

Na osnovi literature smo se odločili, da bomo za kultivacijo rikecije izbrali celično linijo komarjevih celic z oznako C6/36. Celice so nam posredovali raziskovalci iz Galvestona, The University of Texas Medical Branch (UTMB). Celice C6/36 so pridobili iz celic ličink tigrastega komarja (*Aedes albopictus*). Za celice C6/36 je značilno, da so zelo rahlo pritrjene in da rastejo pri temperaturi 28°C, v okolju brez CO₂.

Preden smo celice C6/36 uporabili za kultivacijo rikecij, smo jih razmnožili do mere, da so prerasle 80–90 % površine stekleničke (V=25 cm³). Ta postopek je trajal 7–10 dni. Celicam smo za rast dodali sterilno gojišče Leibovitz 15 Glutamax (L-15) (Gibco®, Invitrogen), obogateno z 10 % telečjim serumom (FCS, Gibco®, Invitrogen). Pripravili smo več pasaj celic. Cepili smo jih v razmerju 1:3. Celice C6/36 so rahlo pritrjene na podlago, zato smo uporabljali sterilne steklene kroglice, s katerimi smo celice odluščili od podlage stekleničke. Celice smo gojili v odsotnosti antibiotikov, zato smo bili še posebej pozorni na sterilno delo. Vse postopke smo izvajali v mikrobiološki komori druge varnostne stopnje. Ves material, ki smo ga vnesli v komoro, smo pred tem obrisali s 70 % etanolom. Celice smo gojili v inkubatorju za čiste celične linije v okolju brez CO₂, pri temperaturi 28°C.

4.1.2 Kultivacija rikecij

Izbrali smo predhodno očiščene in zamrznjene klope. Nabrani so bili iz ovc, na katerih so predhodno že dokazali klope *Hae. sulcata*, okužene z novo rikecijo (Duh in sod. 2006). To je bilo mogoče, ker so bile ovce označene z identifikacijskimi številkami, zbranimi v seznamu zbirke klopov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo. Tabela 2 prikazuje podatke o klopih, ki smo jih uporabili za postopek kultivacije rikecij.

Tabela 2: Nova rikecija v klopih vrste *Hae. sulcata* na območju Splita leta 2000.

Številka ovce	Lokaliteta, datum	Vrsta klopa: <i>Hae. sulcata</i> ,		Številka skupine
		št. klopov		
0-239	Lečevica, 17.10.2000	1 ♀ nenapita	3 ♂	20
0-238	Lečevica, 17.10.2000	1 ♀ nenapita	2 ♂	33
0-265	Muč, 17.10.2000	3 ♂		42
Skupaj:		10 klopov		

4.1.2.1 Priprava klopov

Klopi imajo na površini številne mikroorganizme, ki bi pri kultiviranju na celičnih linijah brez antibiotikov/ antimikotikov motili izolacijo rikecij. Zato smo klope odtalili in jih dodatno 3-krat oprali s 5 % natrijevim hipokloridom ter 1-krat s 70 % etanolom. Pred uporabo smo jih še 3-krat oprali s sterilno vodo. Vseh deset klopov smo razpolovili s sterilnim skalpelom in eno polovico posebej shranili na -80°C. Ostale polovice smo združili v tri skupine z oznakami 20, 33 in 42 (Tabela 2). Vsako skupino smo ločeno in ročno homogenizirali v 150 µl sterilnega gojišča L-15. Po homogenizaciji smo dodali gojišče L-15 do končnega volumna 900 µl. Za vsako skupino smo nato homogenizat razdelili:

- 2 x 250 µl za kultivacijo rikecij,
- 200 µl za DNK in PCR analizo,
- 200 µl na -80°C.

4.1.2.2 Kultivacija rikecij na celični liniji komarjevih celic C6/36

Rikecije so počasi rastoče bakterije (Winkler 1990). Dokazali so, da je za izolacijo bakterij iz klopov ali drugega primarnega materiala najustreznejša metoda gojenje na 5 ml steklenicah (angl. Shell Vial) (Birg in sod. 1999).

Za uspešno gojenje celic iz celične linije v 5 ml steklenicah, potrebujemo od 40000 do 50000 celic (Strasinger 1985). Število celic v 1 µl gojišča celične linije C6/36 smo določili s citometrom. 30 µl mešanice gojišča celične linije in 0,5 % barvila TrypanBlue smo nanesli na Kova glasstic slide 10 z

mrežico. S svetlobnim mikroskopom smo pod 200 x povečavo prešteli celice v 10 mrežicah. Število celic v 1 μ l gojišča celične linije smo izračunali z naslednjo enačbo:

$$\text{št.celic/ } \mu\text{l} = (\text{št. celic}/10 \text{ mrežic}) \times 90 \text{ (faktor)} \times 10 \times 2 \quad (1)$$

Z naslednjim izračunom pa smo ugotovili, koliko μ l gojišča celične linije potrebujemo za uspešno rast celic na 5 ml steklenicah.

$$40\,000 \text{ celic/} (\text{št.celic}/\mu\text{l}) = x \mu\text{l gojišča celične linije} \quad (2)$$

V 5 ml steklenico smo dodali izračunano količino gojišča celične linije C6/36 in 1 ml gojišča L-15 z 10 % FCS in jih inkubirali čez noč na 28°C v okolju brez CO₂. Pripravili smo po dve steklenici za vsako skupino.

Ko je bilo na dnu steklenice pritrjenih 90–95 % komarjevih celic, smo steklenice inokulirali s homogenatom klosov po sledečem protokolu:

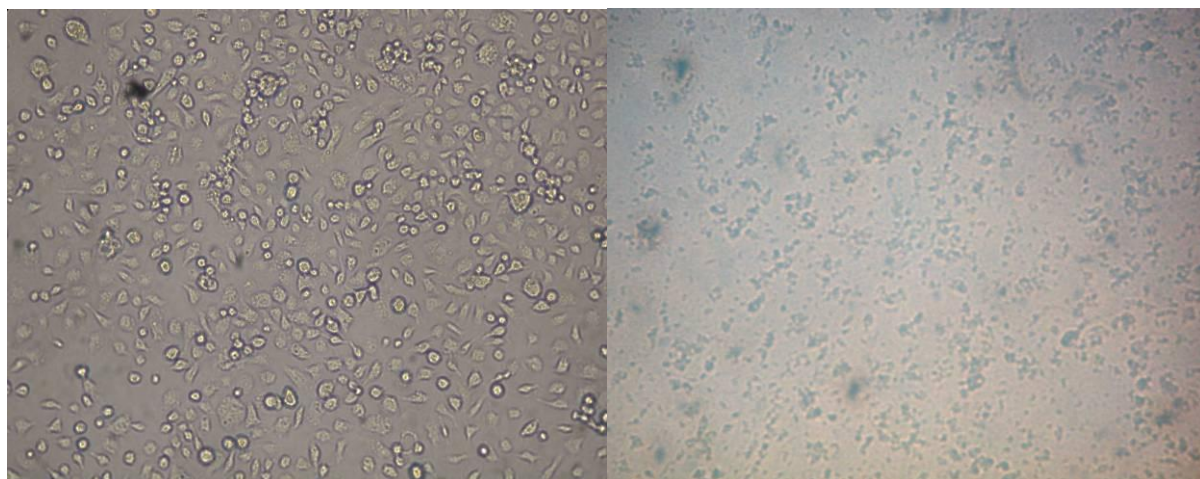
2 x 250 μ l homogenata iz iste skupine (glej Tabela 2) smo inokulirali v dve steklenici, pri čemer smo v eno steklenico dodali 1 ml gojišča L-15 s 5 % FCS brez antibiotikov in v drugo 1 ml gojišča L-15 s 5 % FCS z antibiotiki (penicilin, streptomycin). Steklenice smo inkubirali 3 dni na 26°C v okolju brez CO₂, v inkubatorju za okužene celične linije. Po treh dneh smo zamenjali gojišče in v obe steklenici dodali gojišče L-15 s 5 % FCS brez antibiotikov. Vsake tri dni smo postopek menjave gojišča ponovili in pripravili razmaz ter shranili 500 μ l odstranjenega gojišča za izolacijo DNK. Razmaze smo posušili in barvali s kompletom reagentov Diff-Quick. Metoda je hitra in enostavna oblika barvanja po Gemsi. Razmaz smo mikroskopirali pri 1000 x povečavi z imerzijskim objektivom. DNK smo izolirali s komercialno obstojnim kompletom reagentov Biosprint 15DNA BloodKit.

Ko smo opazili 80–90 % okuženost komarjevih celic, smo 1 ml okuženega gojišča iz steklenice prenesli na neokuženo celično linijo komarjevih celic C6/36 v plastično posodico V=25 cm³, iz katere smo prej odlili vse gojišče. Okužene celice v posodici smo eno uro mešali na termomikserju pri 300 rpm pri temperaturi 26°C in jo nato postavili v inkubator brez CO₂, na 26°C za eno uro, dodali 6 ml gojišča L-15 s 5 % FCS in ponovno postavili v inkubator brez CO₂, na 26°C. Vsak tretji dan smo dodajali čisto, prefiltrirano gojišče L-15 s 5 % FCS brez antibiotikov, pregledovali celični razmaz po metodi Diff-Quick in testirali gojišče na prisotnost nove rikecije z metodo PCR v realnem času ali z navadnim PCR, kjer smo pomnoževali del gena za 17 kDa protein.

Predstavljamo rezultate poskusov na klopih iz skupin 20, 33, in 42 (glej Tabela 2).

4.1.2.2.1 Poskus s skupino 20

Oznaka 20bAb predstavlja poskus s skupino, kjer smo celično linijo C6/36 v 5 ml steklenici okužili s homogenatom klopov iz ovce št. 0-239 iz Lečevice (glej Tabela 2) in dodali gojišče L-15 s 5 % FCS brez antibiotikov. Prva pasaža v 5 ml steklenicah je trajala 8 dni. Že drugi dan po okužbi celične linije na plastični posodici ($V=25\text{ cm}^3$), smo na celičnem razmazu opazili zelo uničene komarjeve celice C6/36 (Slika 8). Z rezultati sekveniranja z rikecijskimi začetnimi oligonukleotidi AZ46/AZ47 za 17 kDa protein smo potrdili prisotnost nove rikecije, vendar smo s sekveniranjem evbakterijskega genoma z začetnimi oligonukletidi E9/E12 za 16S rRNK potrdili prisotnost mikroorganizma, ki je bil v 99 % identičen z vrsto *Pseudomonas* sp. oziroma z vrsto *Burkholderia cepacia*. Te bakterije so prerastle in preprečile rast nove rikecije in uničile komarjeve celice C6/36 (Slika 8).



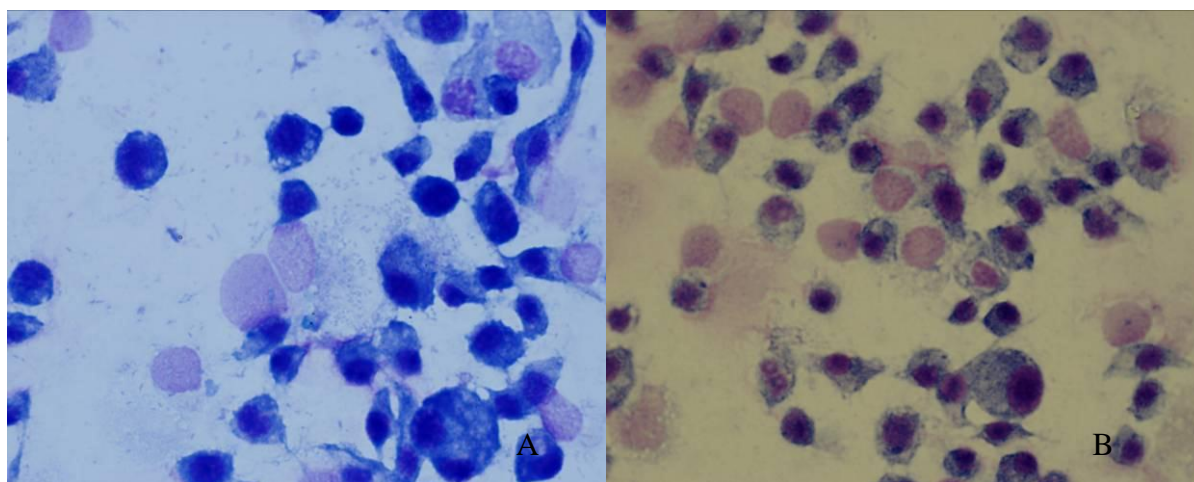
Slika 8: Slika neokužene celične linije komarjevih celic C6/36 (levo) in slika celične linije po okužbi z mikroorganizmi vrste *Pseudomonas* spp. oziroma *Burkholderia cepacia* strain (desno), kjer je prišlo do močnega citopatskega učinka.

Oznaka 20zAb predstavlja poskus s skupino, kjer smo celično linijo C6/36 v 5 ml steklenici okužili s homogenatom klopov iz ovce št. 0-239 iz Lečevice (glej Tabela 2) in dodali gojišče L-15 s 5 % FCS z antibiotiki. Na celičnem razmazu nismo opazili rikecij. Trinajsti dan smo v gojišču opazili glive in steklenice zavrgli. Pri okužbah z glivami, steklenice/ posodice nikoli ne odpiramo, temveč jo takoj zaprto zavržemo in avtoklaviramo.

4.1.2.2.1.2 Poskus s skupino 33

Oznaka 33bAb predstavlja poskus s skupino, kjer smo celično linijo C6/36 v 5 ml steklenici okužili s homogenatom klopov iz ovce št. 0-238 iz Lečevice (glej Tabela 2) in dodali gojišče L-15 s 5 % FCS brez antibiotikov. Gojenje nove rikecije iz te skupine klopov je bilo najbolj uspešno. Štiriindvajseti dan prve pasaže smo na celičnem razmazu opazili rikecije. Prva pasaža v 5 ml steklenici je trajala 32 dni, naslednje pasaže v stekleničkah ($V=25\text{ cm}^3/V=75\text{ cm}^3$) pa v povprečju do 15 dni, da je okuženost komarjevih celic dosegla 80 % ali več (Slika 10).

Z rezultati sekveniranja smo potrdili prisotnost nove rikecije, s 100 % identičnostjo z rikecijskim endosimbiontom v klopu vrste *Hae. sulcata*. Kljub okužbi s stafilokoki v drugi pasaži, smo štirinajsti dan tretje pasaže (p3d14) uspeli pridobiti čisti izolat nove rikecije (Slika 9, Slika 10). Stafilokoke smo uničili tako, da smo prve tri dni tretje pasaže v posodico dodali gojišče L-15 s 5 % FCS z antibiotiki. Kljub temu, da so antibiotiki poleg stafilokokov uničili tudi dobršen del rikecij, smo štirinajsti dan tretje pasaže uspeli pridobiti čisti izolat nove rikecije.



Slika 9: Celični razmaz (po tehniki Diff-quick) z novo rikecijo okuženih komarjevih celic C6/36 (A) in neokuženih komarjevih celic C6/36 (B) – poskus 33bAb, p3d14.

Shematski prikaz opisanega poteka poskusa s skupino 33bAb je predstavljen na sliki 10.

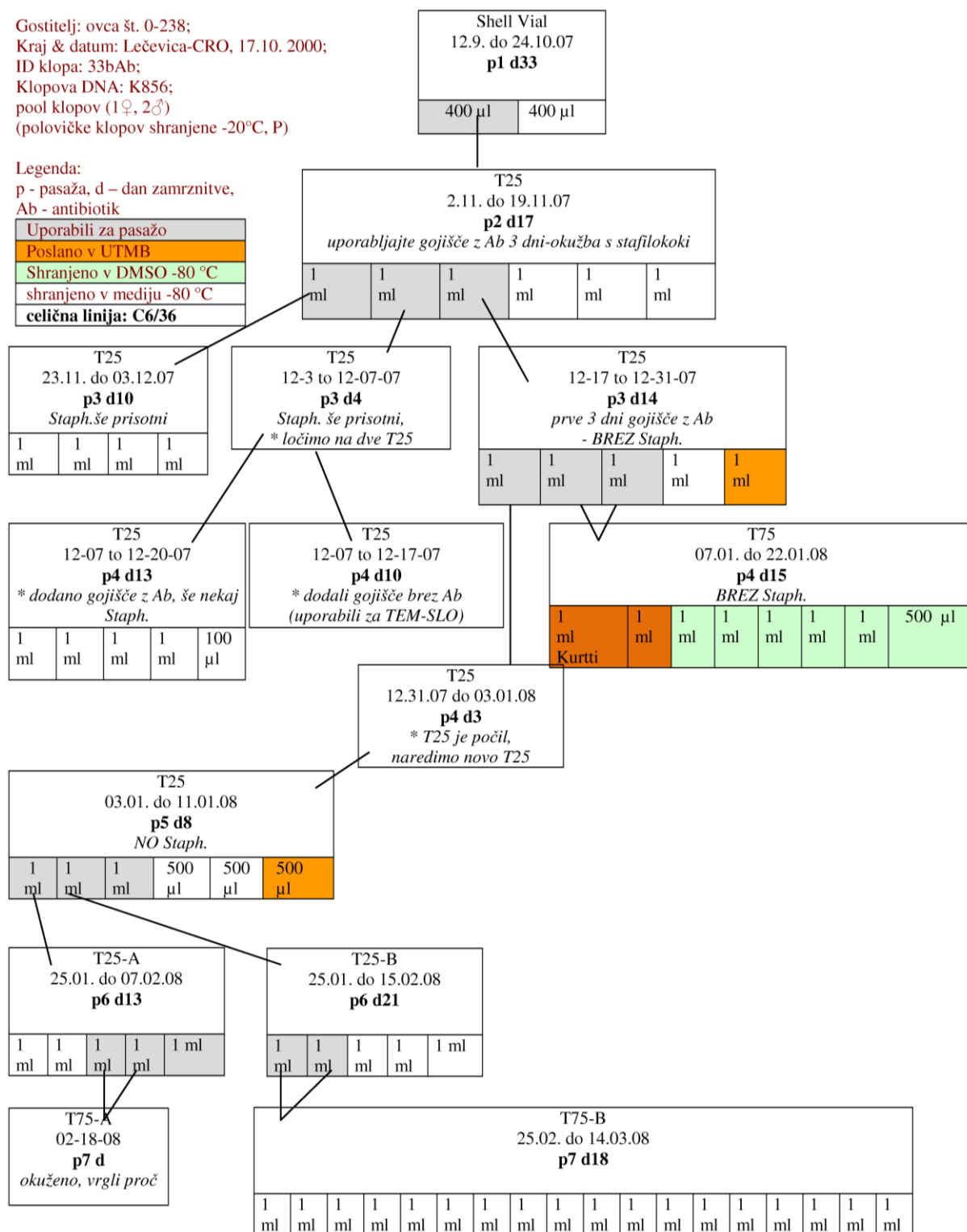
Podatki klopa:

Gostitelj: ovca št. 0-238;
 Kraj & datum: Lečevica-CRO, 17.10. 2000;
 ID klopa: 33bAb;
 Klopova DNA: K856;
 pool kloпов (1♀, 2♂)
 (polovičke kloпов shranjene -20°C, P)

Legenda:

p - pasaža, d – dan zamrzitve,
 Ab - antibiotik

Uporabili za pasažo
Poslano v UTMB
Shranjeno v DMSO -80 °C
shranjeno v mediju -80 °C
celična linija: C6/36



Slika 10: Shematski prikaz poteka poskusa s skupino 33bAb.

Oznaka 33zAb predstavlja poskus s skupino, kjer smo celično linijo C6/36 v 5 ml steklenici okužili s homogenatom klopov iz ovce št. 0-238 iz Lečevice (glej Tabela 2) in dodali gojišče L-15 s 5 % FCS z antibiotiki. Na celičnem razmazu nismo opazili rikecij, čeprav so bili rezultati PCR na prisotnost nove rikecije vseskozi pozitivni. Tudi z rezultati sekveniranja z rikecijskimi začetnimi oligonukleotidi AZ46/AZ47 za 17 kDa protein smo potrdili prisotnost nove rikecije s 100 % identičnostjo z rikecijskim endosimbiontom iz klopa vrste *Hae. sulcata*. Vsebino celične suspenzije smo shranili v 1 x 200 µl in 1 x 400 µl Nunc tubice na -80°C.

4.1.2.2.1.3 Poskus s skupino 42

Oznaka 42bAb predstavlja skupino poskusa, kjer smo celično linijo C6/36 v 5 ml steklenici okužili s homogenatom klopov iz ovce št. 0-265 iz Muča (glej Tabela 2) in dodali gojišče L-15 s 5 % FCS brez antibiotikov. Poskus ni uspel, saj so v plastični posodici zrastle glive. Posodico smo zavrgli in avtoklavirali.

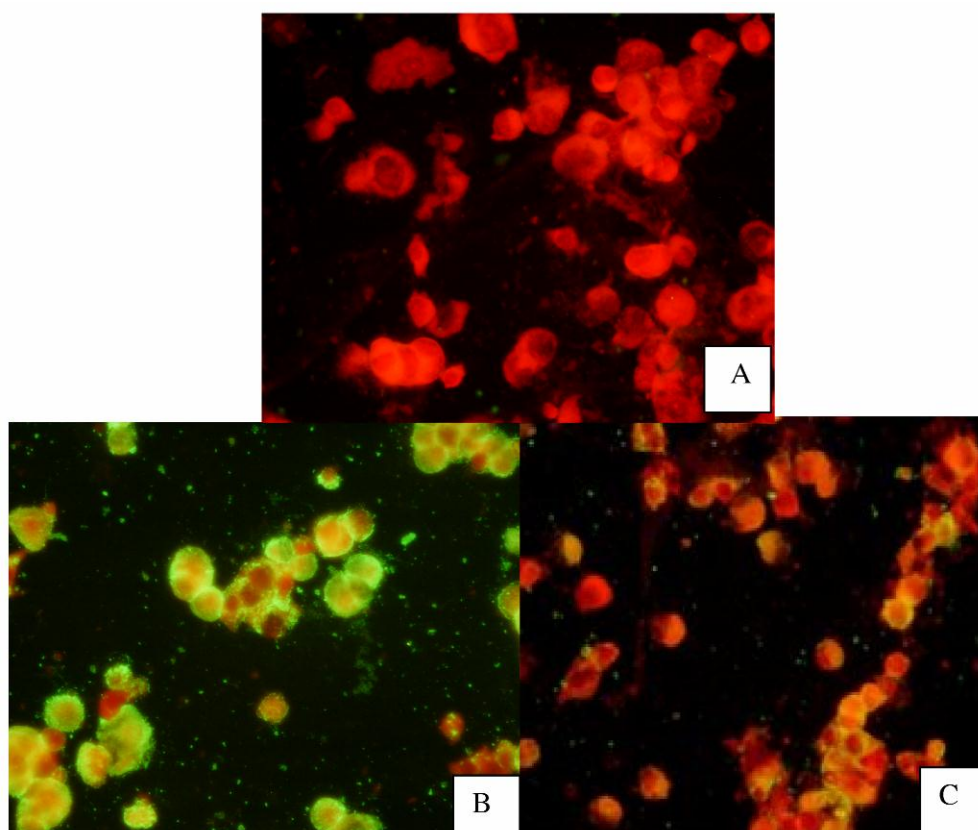
Oznaka 42zAb predstavlja poskus s skupino, kjer smo celično linijo C6/36 v 5 ml steklenici okužili s homogenatom klopov iz ovce št. 0-265 iz Muča (glej Tabela 2) in dodali gojišče L-15 s 5 % FCS z antibiotiki. Na celičnem razmazu prve pasaže nismo zaznali okužbe komarjevih celic z rikecijami, kljub temu, da so bili rezultati PCR na prisotnost rikecije pozitivni in smo z rezultati sekveniranja potrdili 100 % identičnost nove rikecije z rikecijskim endosimbiontom iz klopa vrste *Hae. sulcata*. Celično suspenzijo smo shranili v 1 x 300 µl in 1 x 400 µl Nunc tubice na -80°C. V kasnejših pasažah na plastični posodici je bila okužba z rikecijami zelo nizka, do 30 %. Vsebino gojišča druge in tretje pasaže smo shranili v 4 x 1 ml Nunc tubice na -80°C.

4.1.3 Priprava serološke metode IF

Antigen nove rikecije smo pripravili iz izolata nove rikecije iz petnajstega dneva četrte pasaže (p4d15) iz poskusa s skupino 33bAb (glej poglavje 4.1.2, Slika 10), po ustaljenem protokolu (Avšič-Županc in sod. 1999).

Homogeno vsebino okužene celične suspenzije komarjevih celic, DMSO (angl. Dimethyl Sulfoxide, DMSO) in prefiltriranega FCS smo nakapljali po eno kapljico na poprej z alkoholom očiščena prazna polja IF stekelc. IF stekelca smo pustili v laminariju, da so se posušila, nato pa smo jih zložili v banjico za fiksacijo, jih prelili z acetonom in pustili 10 minut na sobni temperaturi.

Stekelca smo posušili na staničevini. Serum – pozitivni serum za rikecijo vrste *R. conorii* (RiCO1) – smo v mikrotitracijski ploščici redčili s fosfatnim pufrom (angl. Phosphate Buffer Saline, PBS) v razmerju 1:10. Na vsako polje smo prenesli 20 µl razredčine vzorca in inkubirali v vlažni komori pri temperaturi 35–37°C, 30 minut. V tem času so se specifična protitelesa vezala na antigene na stekelcu. Po inkubaciji smo stekelce sprali s pufrom PBS in pri tem pazili, da curek ni tekel direktno na polja z antigenom in serumom. Spiranje stekelca je potekalo v treh fazah: a) s PBS, b) s PBS in postavili stekelca v kadičko, kjer smo ga inkubirali 5 min (to smo ponovili 3-krat), c) z destilirano vodo. Ko je bilo stekelce suho, smo na vsako polje dodali po 20 µl za uporabo že pripravljenega, s flourescinom označenega kozjega anti humanega IgG konjugata ter inkubirali v vlažni komori pri temperaturi 35–37°C, 30 minut. Ponovili smo postopek spiranja in stekelce posušili. Nato smo dodali nekaj kapljic reagenta Mounting Media in ga pokrili s krovnim stekelcem tako, da ni bilo ujetih zračnih mehurčkov. Pripravljeno stekelce IF smo pregledali s fluorescentnim mikroskopom pod 400 x povečavo. Rezultate testiranja smo izrazili s titrom protiteles (Slika 11).



Slika 11: Intenzivnost fluorescence s titrom protiteles nove rikecije – A) negativna kontrola, B) 1:80 in C) 1:320.

4.2. MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI NOVE RIKECIJE

Elektronsko mikroskopsko analizo smo izvajali v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo, The University of Texas Medical Branch – UTMB, Galveston, ZDA in v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo na Oddelku za biologijo, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Za fiksacijo in vklapljanje delov organov in celične linije v smole smo uporabili preizkušene metode. Elektronsko mikroskopijo smo uporabili za vizualizacijo rikecij v organih kloпов – in vivo in za vizualizacijo rikecij v celičnih kulturah – in vitro.

4.2.1 Elektronska mikroskopija nove rikecije iz notranjih organov kloпов

Uporabili smo enajst kloпов *Hae. sulcata* (8♂, 3♀) nabranih leta 2007 v Splitu (glej poglavje 3.1). Žive klope *Hae. sulcata* smo najprej očistili z absolutnim etanolom in sterilno vodo. Trebušno stran živega klopa smo pred seciranjem prilepili na samolepilni trak (Slika 12).



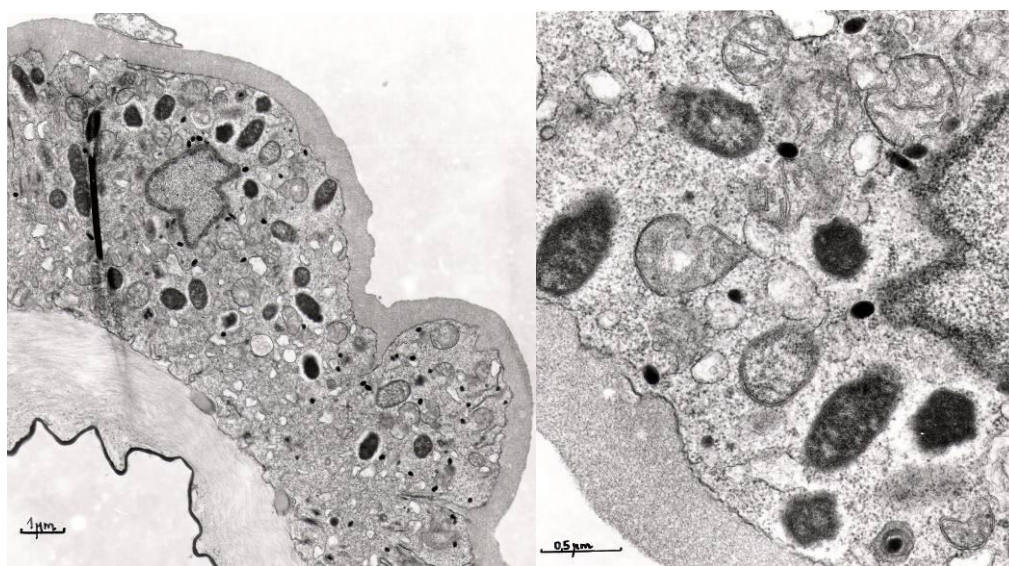
Slika 12: Seciranje klopa (trebušna stran klopa je prilepljena na samolepilni trak) (Foto: D. Duh).

Najprej smo odrezali hrbtno stran klopa in nato odstranili notranje organe – žleze slinavke, jajčnike in prebavilo. Posamezne izrezane organe smo fiksirali v PFGPA fiksativu (2,5 % formaldehid, 0,1 % glutaraldehyd, 0,03 % pikrinska kislina, 0,03 % CaCl₂ in 0,05 M kakodilatni pufer) in jih shranili na 4°C (Ito in Rikihisa, 1981). Ostanke kloпов smo uporabili za izolacijo DNK in PCR. Tkiva dveh kloпов, pri katerih smo dokazali DNK nove rikecije,

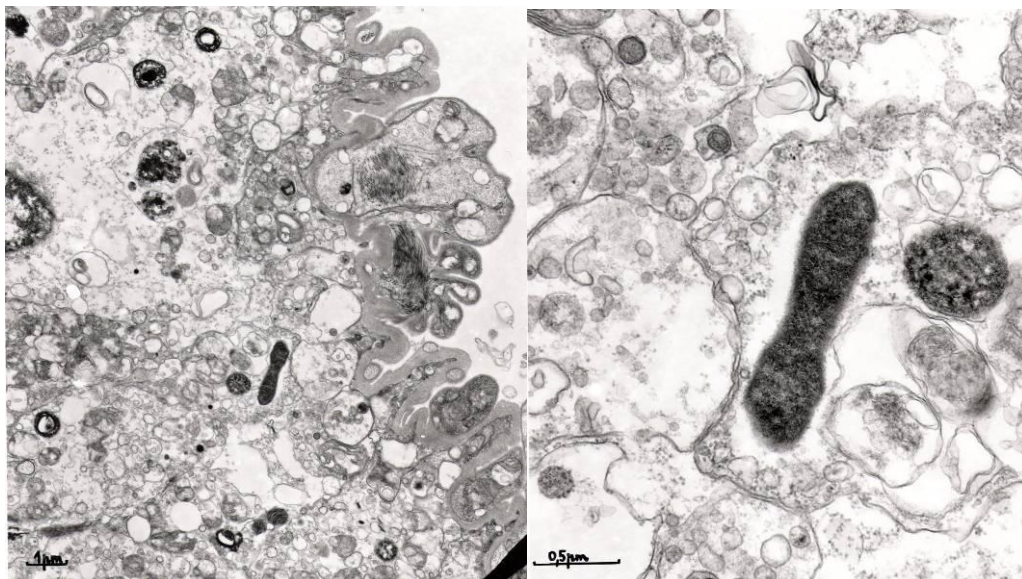
smo 3-krat sprali v 0,1 M kokodilatnem pufru in vzorce poslali v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo, UTMB, Galveston v Ameriko, kjer smo po ustaljenih protokolih pripravili ultratanke rezine organov (Popov in sod. 2007).

V laboratoriju za elektronsko mikroskopijo, UTMB, Galveston, Amerika smo vzorce sprali z 0,1 M maleatnim pufrom (pH 5,2) na sobni temperaturi. Postfiksacija je potekala 20 minut, na temperaturi 60°C, v 1 % UA (v 0,1 M maleatnem pufru). Sledilo je 4-kratno spiranje (vsakič po 10 minut) z 0,1 M maleatnim pufrom (pH 5,2) pri sobni temperaturi, enkratno spiranje (čez noč) z 0,1 M maleatnim pufrom, pri temperaturi 4°C, 2-kratno spiranje (vsakič po 10 minut) s 50 % etanolom in 2-kratno spiranje (vsakič po 30 minut) s 75 % etanolom. Vzorec smo nato postavili v mešanico 75 % etanol: LR White=1:2 za eno uro na sobno temperaturo, ga nato prenesli v LR White za eno uro na sobni temperaturi in ga v LR White pustili čez noč na 4°C. Naslednji dan smo ga ponovno prenesli v LR White na sobni temperaturi za eno uro. Vzorce smo vklopili v želatinaste kapsule. Polimerizacija je potekala 24 ur, na temperaturi 60°C (Popov in sod. 2007).

V klopu vrste *Hae. sulcata* (samica), označeni s številko 464/13, 680, ki smo jo nabrali iz ovce, na območju Splita leta 2007 (glej Prilogo C), smo v žlezah slinavkah in v srednjem črevesu z elektronsko mikroskopijo dokazali nove rikecije, ki so se prosto nahajale v citosolu endotelnih celic. V srednjem črevesu je bilo vidno manj rikecij kot v predelu žlez slinavk. V ovarijih nove rikecije nismo zasledili. Ultrastruktura nove rikecije predstavlja tipično morfologijo SFG rikecij – celična stena in plazmalema sta ločeni s periplazemskim prostorom. Rezultate prikazujemo na sliki 13 in 14 in v prilogi Č in D.



Slika 13: Prerez žlez slinavk klopa vrste *Hae. sulcata*, okužene z novo rikecijo.



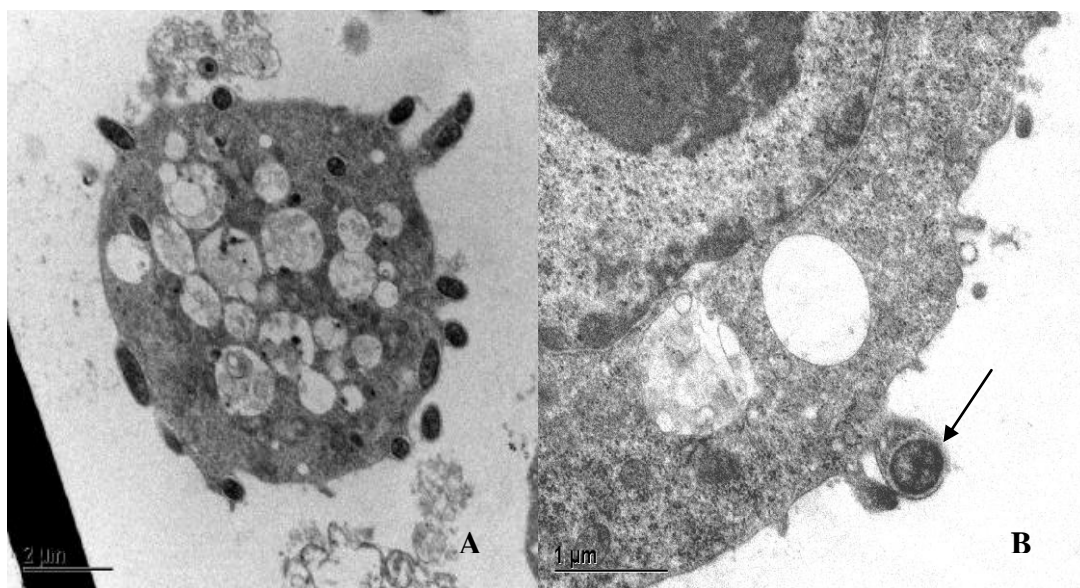
Slika 14: Prerez srednjega črevesa klopa vrste *Hae. sulcata*, okuženega z novo rikecijo.

4.2.2 Elektronska mikroskopija nove rikecije, gojene na celični liniji komarjevih celic C6/36

Elektronsko mikroskopijo ultratankih rezin okužene celične linije C6/36 smo izvajali na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Celični liniji C6/36, okuženi z novo rikecijo (33bAb, p4d10, Slika 10), smo najprej odvzeli $\frac{1}{2}$ gojišča (3 ml) L-15 brez antibiotikov in dodali 3 ml 6 % glutaraldehida (primarna fiksacija) v 0,1 M fosfatnem pufru (28 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 72 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,2) in vse skupaj postavili za 17 dni v hladilnik na temperaturo 4°C. S steklenimi kroglicami smo iz podlage ($V=25 \text{ cm}^3$) odstranili okuženo celično linijo, jo prestavili v epruvete Eppendorf in jih centrifugirali 10 minut pri 5000 rpm. Vzorce smo zamešali v 2 % agarozo. Ko so se agarozna in primešana okužena celice ohladile do gelaste oblike, smo jo narezali na majhne, do 1 mm^3 velike koščke in jih fiksirali 1,5 ure v 3 % glutaraldehidu (primarna fiksacija). Fiksativ smo spirali s fosfatnim pufom 3-krat po 10 minut, temu pa je sledila 2,5 urna sekundarna fiksacija z 1 % OsO_4 v fosfatnem pufru. Spiranju s fosfatnim pufrom je sledila dehidracija v vrsti alkoholov z naraščajočimi koncentracijami: 20 minut v 30 % etanolu, 20 min v 50 % etanolu, 20 min/čez noč v 70 % etanolu, 20 minut v 90 % etanolu, 2-krat po 20 minut v absolutnem etanolu, 20 minut v absolutnem etanolu:acetonu=1:1 in 2-krat po 20 minut v acetonu. Dehidrirane preparate smo za 2 uri inkubirali v mešanici aceton:agar100=1:1, nato pa prenesli v čisto smolo (Agar100). Po inkubaciji v čisti smoli smo vzorce vklopili v ploščate modele za polimerizacijo, ki je potekala 3 dni pri 65°C.

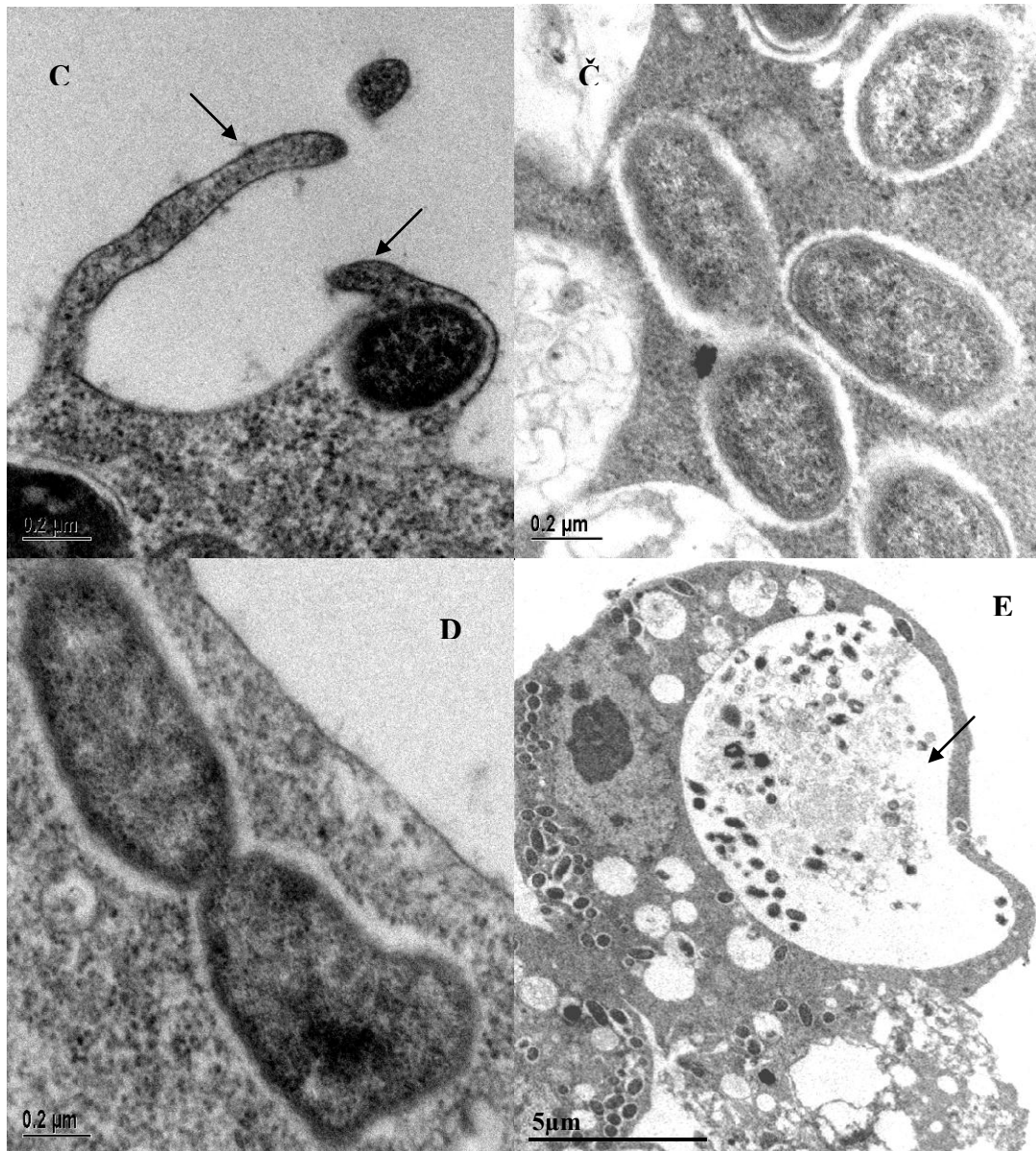
Ultratanke rezine smo pripravili s steklenimi in diamantnimi noži z ultramikrotonom (Reichert Ultracut S, Leica, Avstrija) in jih kontrastirali 10 minut pri sobni temperaturi v 3 % vodni raztopini uranil acetata $(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in 8–10 minut s svinčevim citratom $\text{Pb}_3 (\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)_2$. Preparate smo nato opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom (CM 100, Philips, Nizozemska) pri pospeševalni napetosti 80 kV in z uporabo CCD kamere (Bioscan Camera, Gatan) in programa Digital Micrograph.

Na sliki 15A in 15B je dobro vidna fagocitoza nove rikecije v komarjevo celico in tvorba psevdopodijev na površini komarjeve celice, ki obdajo rikecijo in jo s fagocitozo vključijo v celico (15C). Podobno kot v srednjem črevesu (Slika 14), se nahajajo rikecije prosto v citoplazmi komarjeve celice (Slika 15Č). Binarno delitev rikecij smo opazili pri obeh, pri okuženih komarjevih celicah C6/36 (15D) in v žlezah slinavkah klopa (Slika 13). Po določenem času se začne gostiteljska celica zaradi okužbe razgrajevati, kar je dobro vidno na sliki 15E.



Slika 15: A: Fagocitoza novih rikecij v komarjevo celico C6/36, B: Fagocitoza nove rikecije v komarjevo celico C6/36 (nadaljevanje slike na strani 50).

Nadaljevanje slike 15.



Slika 15: A: Fagocitoza novih rikecij v komarjevo celico C6/36; B: Fagocitoza nove rikecije v komarjevo celico C6/36; C: Tvorba psevdopodijev komarjeve celice C6/36 med fagocitozo nove rikecije; Č: Rikecije, razporejene v citoplazmi komarjeve celice C6/36; D: Delitev rikecije v citoplazmi komarjeve celice C6/36; E: Začetek razgradnje komarjeve celice C6/36.

4.3 MOLEKULARNO – BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI NOVE RIKECIJE

Fournier in sod. (2003) so opisali nekaj objektivnih navodil za klasifikacijo novih rikecijskih izolatov na različnih taksonomskih stopnjah (rod, skupina, vrsta), katerih osnova so zaporedja vsaj petih genov, ki zapisujejo protein (glej poglavje 2.1.7.1.3).

V naši raziskavi smo pomnoževali in dokazovali prisotnost nove rikecije s 5-imi geni, in sicer genom za 17 kDa, 16S rRNK, *gltA*, rOmpB in rOmpA protein. Pri tem smo uporabili naslednje začetne oligonukleotide: začetna oligonukleotida AZ46 (5'-GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3') in AZ47 (5'-CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG-3') pomnožujeta 434 bp dolg odsek DNK, ki nosi informacijo za 17 kDa velik protein in je komplementaren predel za vrste *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. prowazekii* in *R. typhi* (Anderson in Tzianabos 1989); začetna oligonukleotida EC9 (5'-AAGGATCCTACCTTGTACGACTT-3') in EC12 (5'-AATCTAGAGTTTGATCMTGG-3') smo uporabili za pomnožitev 1500 bp dolgega odseka 16S rRNK (Roux in sod. 1997); začetna oligonukleotida CS877 (5'-GGGGGCTGCTCACGGCGG-3') in CS1258 (5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3') pomnožujeta 381 bp dolg odsek DNK, ki nosi informacijo za citrat sintazni gen (*gltA*) (Roux in sod. 1997); začetna oligonukleotida BG 1-21 (5'-GGCAATTAATATCGCTGACGG-3') in BG 2-20 (5'-GCATCTGCACTAGCACTTTC-3'), pomnožujeta 650 bp (550 bp) dolg odsek zunanjega membranskega proteina rOmpB (120 kDa) (Roux in Raoult 2000) in začetna oligonukleotida Rr 190.70 (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3') in Rr 190.602 (5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT-3'), ki pomnožujeta 532 bp dolg odsek DNK zunanjega membranskega proteina rOmpA (190 kDa) (Fournier in sod. 1998).

4.3.1 Dokaz prisotnosti nove rikecije v vzorcu

Za dokazovanje prisotnosti rikecijske DNK (rod *Rickettsia*), smo pomnožili odsek za 17 kDa protein. Anderson in Tzianabos (1989) sta dokazala, da je 17 kDa protein dobro okarakteriziran pri različnih rikecijskih vrstah in je rodovno specifičen za prepoznavanje rikecij.

Protokol za navadni PCR za pomnoževanje 17 kDa proteina smo priredili v PCR v realnem času. PCR v realnem času smo uporabljali zaradi presejalnega testiranja in prepoznavanja rikecij v osnovnih vzorcih. Metoda je primerna, ker je hitrejša in bolj občutljiva in zaradi načina dokazovanja PCR produktov ne predstavlja nevarnosti kontaminacije.

Iz izbranih klosov in izolata (z novo rikecijo okužene komarjeve celice C6/36, glej poglavja 3.1.2, 3.2) smo izolirali rikecijsko DNK s kompletom reagentov po navodilih proizvajalca. Izolacija je potekala v aparaturi Kingerfisher, s programom BS15.DNA Blood100 in BS15.DNA Blood200. Za PCR v realnem času smo pripravili doma pripravljen protokol, ki temelji na nespecifičnem dokazovanju PCR produktov z barvilom SYBR Green – komplet reagentov Platinum Sybr Green qPCR SuperMix – UDG kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California).

Volumen reakcijske mešanice je 25 μ l, le ta pa je vseboval:

- 12,5 μ l 2x Platinum Sybr SuperMix
- 0,25 μ l začetnega oligonukleotida AZ46 (50 μ M)
- 0,25 μ l začetnega oligonukleotida AZ47 (50 μ M)
- 7 μ l sterilizirane in deionizirane vode
- 5 μ l rikecijske DNK

Reakcija je potekla po naslednjem vrstnem redu:

- 50°C, 2 min
- 95°C, 2 min

ter reakcija v 40 temperaturnih ciklih:

- 94°C, 15 sec
- 57°C, 20 sec
- 72°C, 30 sec

Po končani reakciji smo analizo rezultatov opravili na računalniku. Kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linijo fluorescenčnega praga (Ct). PCR v realnem času je potekala v aparaturi Rotorgene (Corbet Research).

4.3.2 Pomnožitev in dokaz nukleotidnega zaporedja nove rikecije iz klopa *Hae. sulcata*

Za pomnožitev in dokaz nukleotidnega zaporedja petih genov nove rikecije smo uporabili klope iz zbirke, shranjene na IMI, Split 2000. V nedavni raziskavi so direktno iz klosov *Hae. sulcata* že pomnožili in dokazali nukleotidno zaporedje genov za *gltA*, *rOmpB* in 17 kDa protein (Duh in sod. 2006). Ker je za dokaz nove vrste rikecije potrebno analizirati nukleotidna zaporedja vsaj petih genov, ki zapisujejo protein (Fouriner in sod. 2003), smo direktno iz klopa želeli pomnožiti in dokazati tudi nukleotidno zaporedje proteina *rOmpA* in 16S rRNK.

Za navadni PCR smo izbrali različne, že ustaljene temperaturne protokole, ki so bili pogojeni z izbiro začetnih oligonukleotidov. V vseh pozitivnih vzorcih kloпов (glej poglavje 4.3.1) smo pomnožili gen 16S rRNK. Navadne PCR produkte smo pregledali na 2 % agaroznem gelu (agaroza NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki so ustrezali dolžinam začetnih oligonukleotidov. Določene pozitivne vzorce smo uporabili za analizo nukleotidnega zaporedja. Pridelke PCR smo do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri 4°C.

Izbranim PCR produktom smo določili nukleotidno zaporedje DNK po Sangerjevi metodi s komercialnim kompletom reagentov BigDye[®] terminator cycle sequencing ready reaction kit (ABI Prism, PE Applied Biosystems, Foster City, California, ZDA). Sekvenčna reakcija je potekala v aparaturi Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA). PCR produkte smo pripravili tako, da smo jih očistili ostankov polimeraze Taq, začetnih oligonukleotidov in deoksiribonukleotidov, ki bi lahko ostali v reakcijski mešanici. Pri tem smo uporabljali komercialni komplet Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA), ki temelji na vezavi DNK na silikonske membrane. Za sekvenčno reakcijo smo izbrali iste začetne oligonukleotide kot za PCR in dodatne notranje začetne oligonukleotide, če so bili produkti večji od 400 bp. Pred avtomatskim sekveniranjem smo pridelke sekvenčne reakcije prečistili in odstranili neporabljene dideoksi terminatorje, začetne oligonukleotide in polimerazo FS. Uporabili smo komercialni komplet DyeEx[®] (Qiagen, Hilden, Nemčija), ki temelji na gelski filtraciji. Pridelke sekvenčne reakcije smo analizirali z avtomatskim sekvenatorjem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, ZDA), ki ločuje pomnožene odseke v kapilari (POP6) z laserskim čitalcem na osnovi značilnega fluorescentnega spektra. Podatke, ki smo jih dobili s sekveniranjem, smo računalniško obdelali s programskim paketom LaserGene (DnaStar, Wisconsin, ZDA), izdanim leta 1999. Paket vsebuje več programov, ki omogočajo popolno obdelavo podatkov: program za sestavljanje zaporedij (SeqMan), urejanje zaporedij (EditSeq) ter primerjavo in poravnavo ter prikaz sorodnosti v obliki filogramov (MegAlign). Nukleotidna zaporedja smo primerjali s podatki v genski banki preko medmrežnega servisa BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA). Filogenetska drevesa smo izrisali s programom TreeCon (Yves Van de Peer, Department of Biochemistry, University of Antwerp, Antwerpen, Belgium), ki omogoča statistično analizo dobljenih dendrogramov z metodo samovzorčenja (angl., bootstrap).

Ker gena *ompA* nove rikecije že v prejšnji raziskavi niso uspeli pomnožiti s PCR z znanimi začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za gen *ompA* (Duh in sod. 2006), smo z molekularnimi metodami sami analizirali zadosten del gena *ompA*, primerne za primerjavo z genom *ompA* z

drugimi SFG rikecijami. Tekom doktorske naloge je potekalo diplomsko delo, kjer je diplomant z metodo sprehod po genomu (angl. Genome Walking) pridobil nukleotidno zaporedje (Dolinšek 2002), na podlagi katerega smo izdelali začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili za pomnoževanje gena *ompA*.

Gen *ompA* zapisuje 190 kDa velik protein, vendar velikost proteina znotraj posameznih vrst rikecij variira (Vishwanath 1991). Nahaja se samo pri rikecijah iz skupine SFG in igra pomembno vlogo pri pritrjevanju rikecije na gostiteljevo celico. Vsebuje domeno iz različnega števila (od 6 do 15) identičnih tandemskih enot, kar narekuje genetsko diverziteteto SFG rikecij (Gilmore 1993; Stenos in Walker 2000). Razvrstitev in število ponavljajočih tandemskih enot so glavni vzrok za antigenske razlike med SFG rikecijami (Gilmore 1993).

Gen *ompA*, kot domnevno izginjajoči, predstavlja model za študij evolucije rodu (Zavala-Castro in sod. 2005).

Zaradi spreminjajoče se lastnosti gena *ompA*, smo DNK ekstrahirali iz treh klopov *Hae. sulcata*, iz zbirke klopov Split 2000, shranjeno na IMI (glej Tabela 4), saj smo želeli dokazati enakost gena *ompA* nove rikecije iz klopov na isti/ različni lokaciji (glej Tabela 4).

Kompletne *ompA* amplikone smo pridobili z dvema PCR reakcijama, s katerima smo pomnožili fragment A in B. Fragmenta A, ki ga opredelita začetna oligonukleotida FGW10/ FGW7 in fragment B, ki ga opredelita začetna oligonukleotida Rf190-1F/RGW5, sta bila narejena na podlagi poravnave že znanega rikecijskega zaporedja gena *ompA* in metode sprehoda po genomu. Fragmenta A in B, ki smo ju uspešno pomnožili v vseh DNK vzorcih, sta bila dolga približno 3000 in 4000 bp. Enega izmed *ompA* amplikonov smo klonirali s TOPO XL PCR Cloning Kit, po navodilih proizvajalca Invitrogen Life Technologies™. Na ta način smo pridobili en sam produkt znotraj vzorca in se tako izognili napaki, do katere bi lahko prišlo v primeru, če bi bil klop okužen z več vrstami rikecij. Izločen DNK plazmid smo uporabili za sekveniranje.

Z reagentom Trizol smo po navodilih proizvajalca Invitrogen Life Technologies™ iz zmrznjenega klopa izolirali RNK (Tabela 4). RNK smo prepisali in pomnožili s SuperScript III One-Step RT-PCR s Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen Life Technologies™).

Z metodo BigDye smo posekvenirali pet A in B amplikonov rikecijske in plazmidne DNK. Za sekveniranje fragmenta A smo potrebovali 18 začetnih oligonukleotidov. Z uporabo osmih začetnih

oligonukleotidov je bil posekveniran samo del fragmenta B (Tabela 3). Pridobljena zaporedja so bila poravnana in pregledana na podobnost med zaporedji (Tabela 4).

Tabela 3: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za sekveniranje fragmenta A in fragmenta B (obarvano črno) in začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na vektor, v katerega smo klonirali ompA produkt (obarvano rdeče).

Fragment A – FGW10/FGW7	Fragment B – Rf190-1Fw/RGW5
Rf190-R2	Rf190-1Fw
Rf190-R3	RGW5
Rf190-F4	SRF-1F
Rf190-F5	SRF-1R
Rf190-R5	SRF-2F
Rf190-F1.1	SRF-2R
Rf190-F1.3	SRF-1aR
Rf190-F1.4	SRF-2aF
FGW10	K903RFf
FGW3	K903RfR
FGW7	M13for
RGW2	M13rev
RGW4	
RGW5	
SRF3F	
SRF4F	
SRF4R	
M13for	
M13rev	

Tabela 4: Primerjava zaporedij gena *ompA* iz nove rikcije iz kloпов *Hae. sulcata* (Split 2000).

Št.gostitelja/ Lokaliteta	Št. klopa	DNK klopa (direktni PCR ompA)	Plazmidna DNK (kloniran ompA PCR)	Primerjava izbranih zaporedij/podobnost
Ovca 57				
Pribude-Muč Ovca 244	595	1A,1B-poz.	p1A,p1B-poz.	a)1A in p1A: 99,9 %
Lečevica-Dugobabe Ovca 238	136	2A,2B-poz.	ni narejeno	b)1A in 2A: 98,7 %
Lečevica-Dugobabe	89	3A,3B-poz.	ni narejeno	c) 2A in 3A:100 %

Zaporedja gena *ompA* nove rikcije iz klopa *Hae. sulcata* so na voljo v genski banki pod številkami: 1A – EU816562, 2A – 816563, 3A – EU816564 in p1A – EU816566. Zaporedje gena *ompA*, dolgo 3317–3329 bp smo primerjali a) med klopnim in plazmidnim DNK določenega klona, b) med dvema različnima klopnama DNK (klopa sta nabrana na različnih lokalitetah) in c) med dvema različnima klopnama DNK (klopa sta nabrana iz različne ovce na isti lokaliteti) in dobili naslednjo

podobnost: a) 99,9 %, b) 98,7 % in c) 100 % (Tabela 4). 0, 40 in 0 razlik v nukleotidnih je bilo zaznanih v primerih a, b in c. Razlike v nukleotidih so posledica mutacij.

Naredili smo filogenetsko analizo nove rikecije iz klopa *Hae. sulcata* z rikecijo izolata *Candidatus* R. hoogstraalii iz klopa vrste *C. capensis* na podlagi gena *ompA*. Primerjava je bila narejena na podlagi 1333 bp dolgega zaporedja gena *ompA*, ker je bila to maksimalna dolžina gena *ompA* rikecije izolata *Candidatus* R. hoogstraalii, dostopna v genski banki. Nova rikecija iz klopa *Hae. sulcata* vsebuje na podlagi analize odseka gena *ompA* 99,3 % podobnost z rikecijo izolata *Candidatus* R. hoogstraalii.

Pri primerjavi določenega zaporedja gena *ompA* nove rikecije iz *Hae. sulcata* z vsemi ostalimi SFG rikecijami je podobnost nekoliko manjša, in sicer 87,5 % z *R. rhipicephali*, 87,3 % z *R. aeschlimannii* in *R. massiliae*, 87 % z *R. peacockii*, 86,9 % z *R. rickettsii* in *R. slovaca*, 86,8 % z *R. africae*, 86,7 % z *R. honei*, 86,6 % z *R. parkeri*, 86,5 % z *R. conorii* in *R. japonica*, 86,4 % z *R. sibirica* in *R. montanensis* in 80,2 % z *R. australis* in *R. felis* (glej tudi Tabela 6).

4.3.3 Pomnožitev in dokaz nukleotidnega zaporedja nove rikecije iz celične linije komarjevih celic C6/36

Iz tretje pasaže čistega izolata nove rikecije smo pomnožili vseh pet genov – 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK, *ompB* in *ompA*, katerih nukleotidna zaporedja so shranjena v genski banki pod naslednjimi številskimi, FJ767736, FJ767737, FJ767735, FJ767738 in EU816565. Štirje od pomnoženih genov so bili identični z novo rikecijo iz klopov *Hae. sulcata* in z izolatom rikecije *Candidatus* R. hoogstraalii iz klopov *C. capensis*. Razlika je bila v genu *ompA*, vendar je bila sorodnost še vseeno zelo visoka, 99,8 % – med izolatom nove rikecije na komarjevih celicah C6/36 in klopno DNK nove rikecije iz *Hae. sulcata* (Tabela 5) in 99,3 % – med izolatom nove rikecije na komarjevih celicah C6/36 in izolatom rikecije *Candidatus* R. hoogstraalii iz *C. capensis* (Gračner in sod. 2009).

Amplikon za 16S rRNK z dolžino 766 bp je bil identičen med novo rikecijo iz klopov *Hae. sulcata* in iz izolata nove rikecije na komarjevih celic C6/36. Nukleotidnega zaporedja 16S rRNK rikecije izolata *Candidatus* R. hoogstraalii iz *C. capensis* ni dostopnega v genski banki, zato nismo naredili primerjave (Gračner in sod. 2009).

Podobnost med izolatom nove rikecije in ostalimi rikecijami se za 16S rRNK nahaja med 98,3–99,7 %, za gen *gltA* med 86,5–97,2 %, za 17 kDa protein med 84,5–97,1 % in za gen *ompA* med 80,2–87,5 %.

Tabela 5: Primerjava zaporedij gena *ompA* iz izolata nove rikecije na celični liniji komarjevih celic C6/36 (p3d14).

Št.gostitelja/ Lokaliteta Ovca 238	Št. klopa	DNK klopa (direktni PCR <i>ompA</i>)	Primerjava izbranih zaporedij/podobnost
Lečevica-Dugobabe	89	3A,3B-poz.	3A in izolat A:99,8 %
Tretja pasaža izolata rikecije	izolat	izolatA- poz. izolatB- poz.	

4.3.4 Uvrstitev nove rikecije v filogenetski sistem

Za ustrežnejšo uvrstitev rikecij v filogenetski sistem je priporočljiva analiza primerjav zaporedja večjega števila genov in poleg molekularnih, upoštevanje morfoloških, fizioloških in ekoloških značilnosti rikecije (Roux in Raoult 2000).

Na podlagi poravnave 239 bp gena za 17 kDa protein, 766 bp 16S rRNK, 1217 bp gena *gltA* in 3178 bp gena *ompA* izolata nove rikecije z zaporedji genov vseh ostalih veljavnih rikecij, smo predstavili podobnost med novo rikecijo z ostalimi rikecijami (Tabela 6) in izdelali štiri filogenetska drevesa (Slika 16, 17, 18 in 19). V analizo nismo vključili rikecij, katerih zapisov nukleotidnih zaporedij genov ni bilo v genski banki ali pa so bila le-ta prekratka.

Tabela 6: Filogenetska analiza nove rikecije z ostalimi veljavno priznanimi rikecijami, narejena na podlagi rikecijskih genov 16S rRNK, 17 kDa, *gltA* in *ompA*. Poravnava je bila narejena na podlagi razlik v nukleotidnih zaporedjih s programom ClustalW algorithm (Lasergene software package).

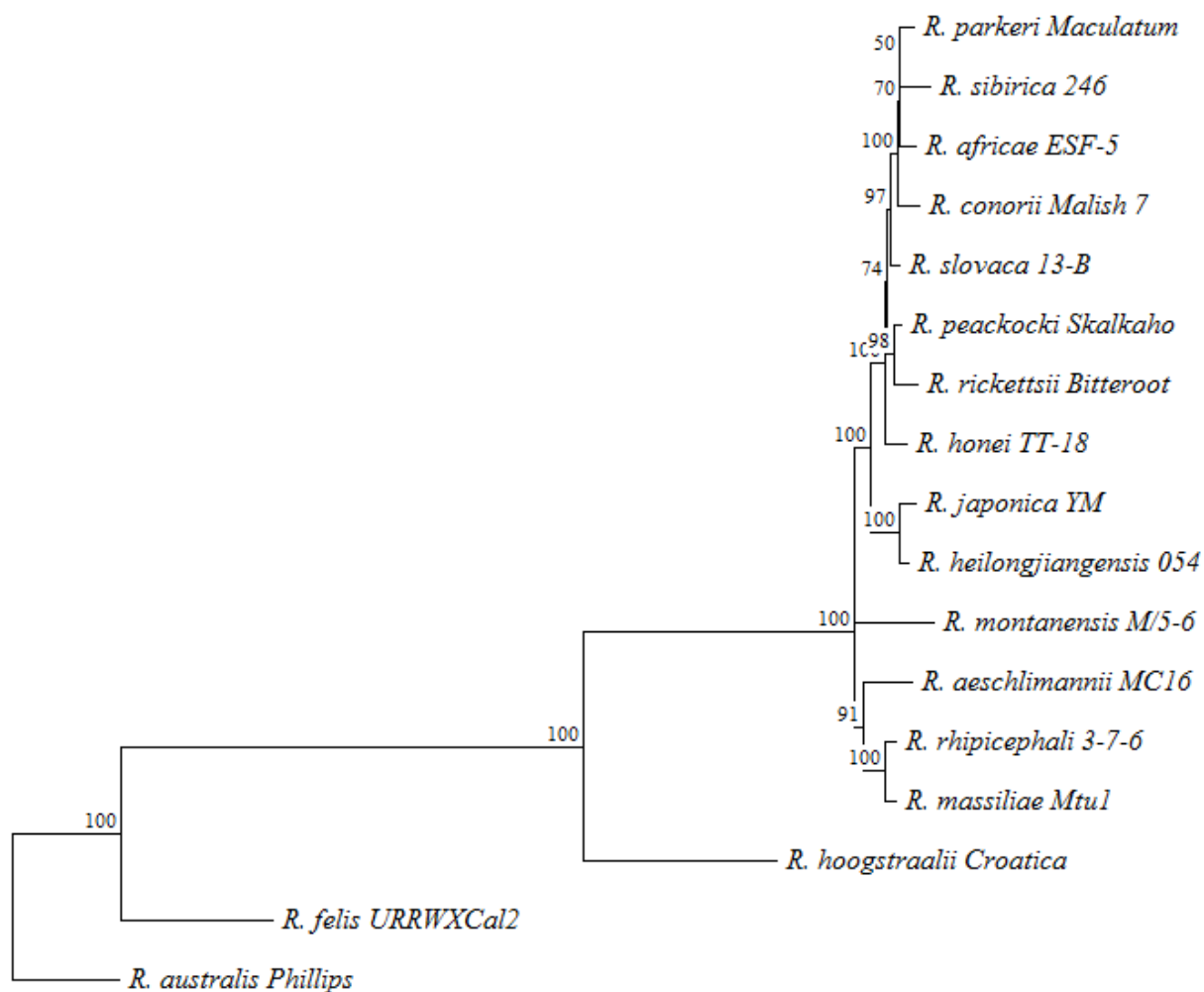
	Izolat nove rikecije			
	16S rDNA	<i>gltA</i>	17kDa	<i>ompA</i>
<i>R. rickettsii</i> , strain Bitterroot	99,5 %	93,5 %	96,2 %	86,9 %
<i>R. peacockii</i> , strain Skalkaho	99,3 %	/	96,2 %	87,0 %
<i>R. conorii</i> , strain Malish 7	99,7 %	93,6 %	96,2 %	86,5 %
<i>R. sibirica</i> , strain 246	99,6 %	93,8 %	96,2 %	86,4 %
<i>R. parkeri</i> , strain Maculatum	99,6 %	93,7 %	96,2 %	86,6 %
<i>R. slovaca</i> , strain 13-B	99,6 %	93,7 %	/	86,9 %
<i>R. africae</i> , strain ESF-5	99,6 %	93,5 %	/	86,8 %
<i>R. helvetica</i> , strain C9P9	99,6 %	93,5 %	/	/
<i>R. massiliae</i> , strain Mtu1	99,6 %	93,8 %	/	87,3 %
<i>R. montanensis</i> , strain M/5-6	99,2 %	94,1 %	96,7 %	86,4 %
<i>R. rhipicephali</i> , strain 3-7-6	99,6 %	93,3 %	96,7 %	87,5 %
<i>R. aeschlimannii</i> , strain MC16	99,5 %	94,0 %	/	87,3 %
<i>R. honei</i> , strain TT-118	99,5 %	93,6 %	96,2 %	86,7 %
<i>R. asiatica</i> , strain IO-1	99,0 %	/	95,0 %	NA
<i>R. tamurae</i> , strain AT-1	99,5 %	94,2 %	95,8 %	/
<i>R. japonica</i> , strain YM	99,5 %	93,3 %	96,2 %	86,5 %
<i>R. akari</i> , strain MK	99,1 %	93,8 %	95,0 %	/
<i>R. australis</i> , strain Phillips	99,3 %	94,4 %	97,1 %	80,2 %
<i>R. felis</i> , strain URRWXC2	99,7 %	97,2 %	93,7 %	80,2 %
<i>R. typhi</i> , strain Wilmington	98,7 %	89,9 %	88,7 %	NE
<i>R. prowazekii</i> , strain Brein1	98,8 %	90,2 %	87,9 %	NE
<i>R. canadensis</i> , strain 2678	98,3 %	90,0 %	84,5 %	/
<i>R. bellii</i> , strain 369442-1	99,1 %	86,5 %	94,1 %	/

Legenda:

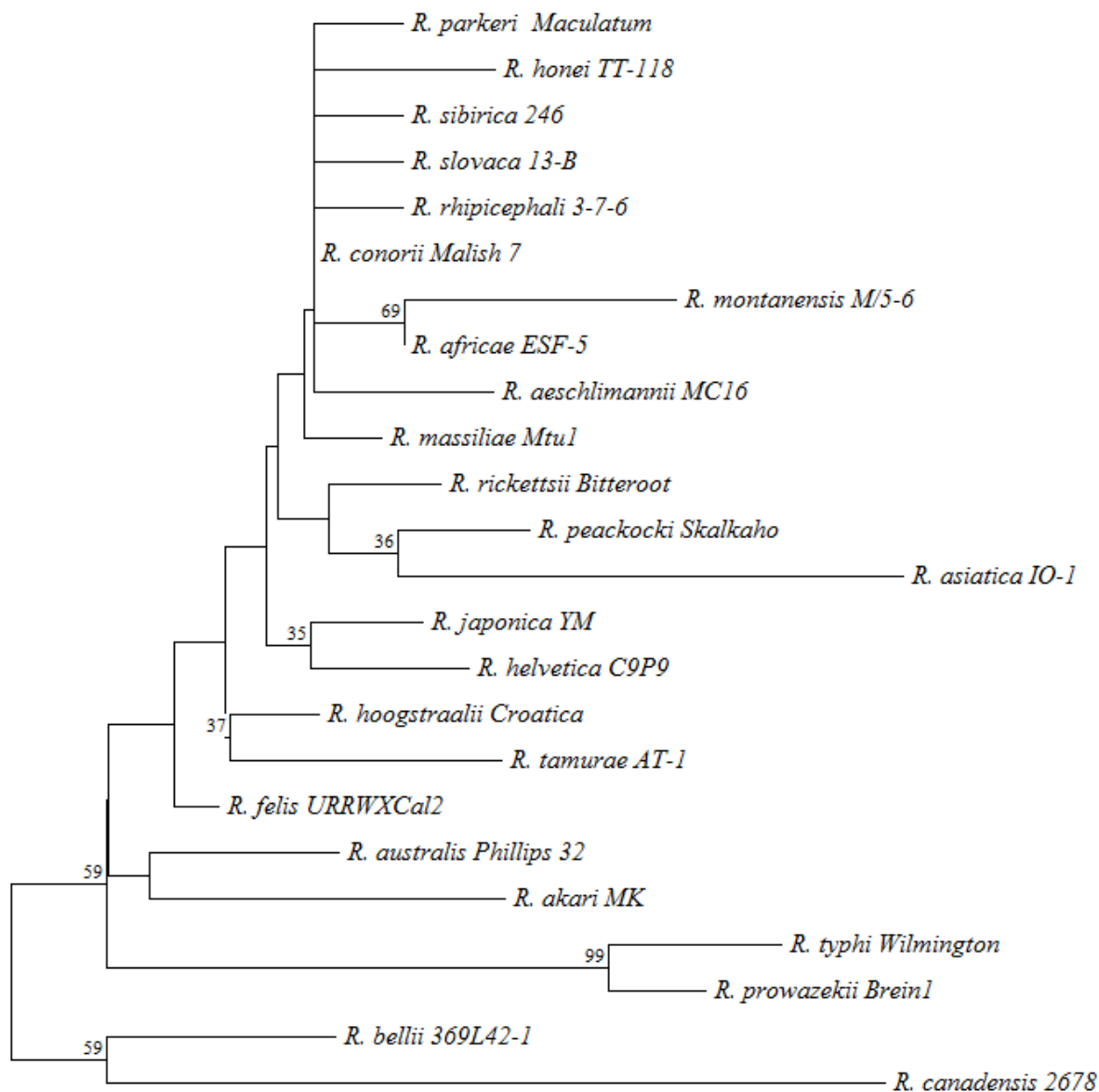
/ – nukleotidna zaporedja v genski banki niso bila dostopna ali pa so bila prekratka, da bi jih lahko vključili v analizo; NE – se ne nahaja v skupini TG; NA – ni pomnoženo

S filogenetskim drevesom smo shematsko prikazali uvrstitev nove rikecije v sistem.

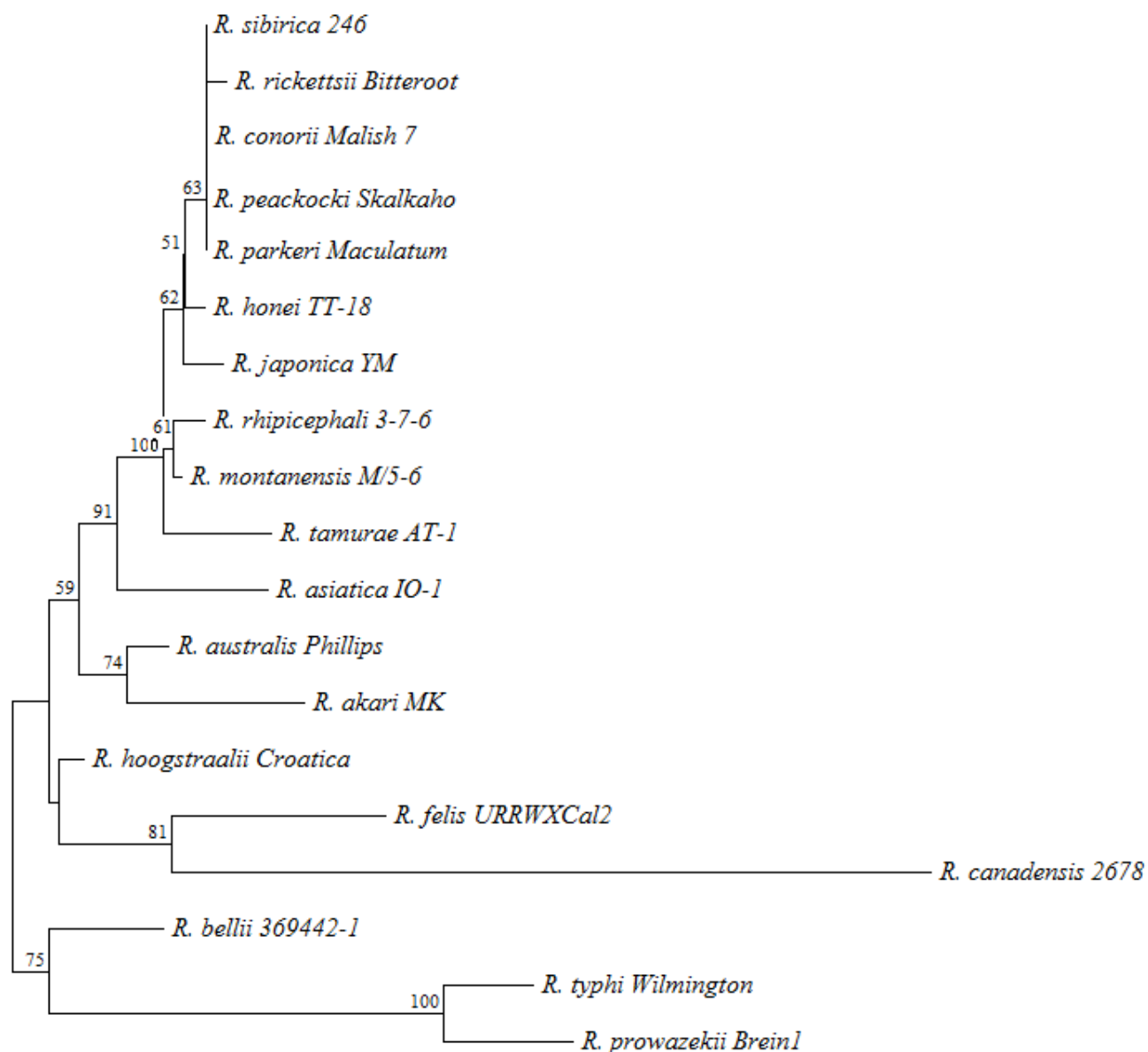
Filogenetska drevesa smo izrisali s programom TreeCon z modelom Kimura 80, ki omogoča statistično analizo dobljenih dendrogramov z metodo samovzorčenja 1000 (angl., bootstrap 1000). Na podlagi analize filogenetskih dreves smo izolat nove rikecije uvrstili skupaj z *R. felis*, v skupino SFG.



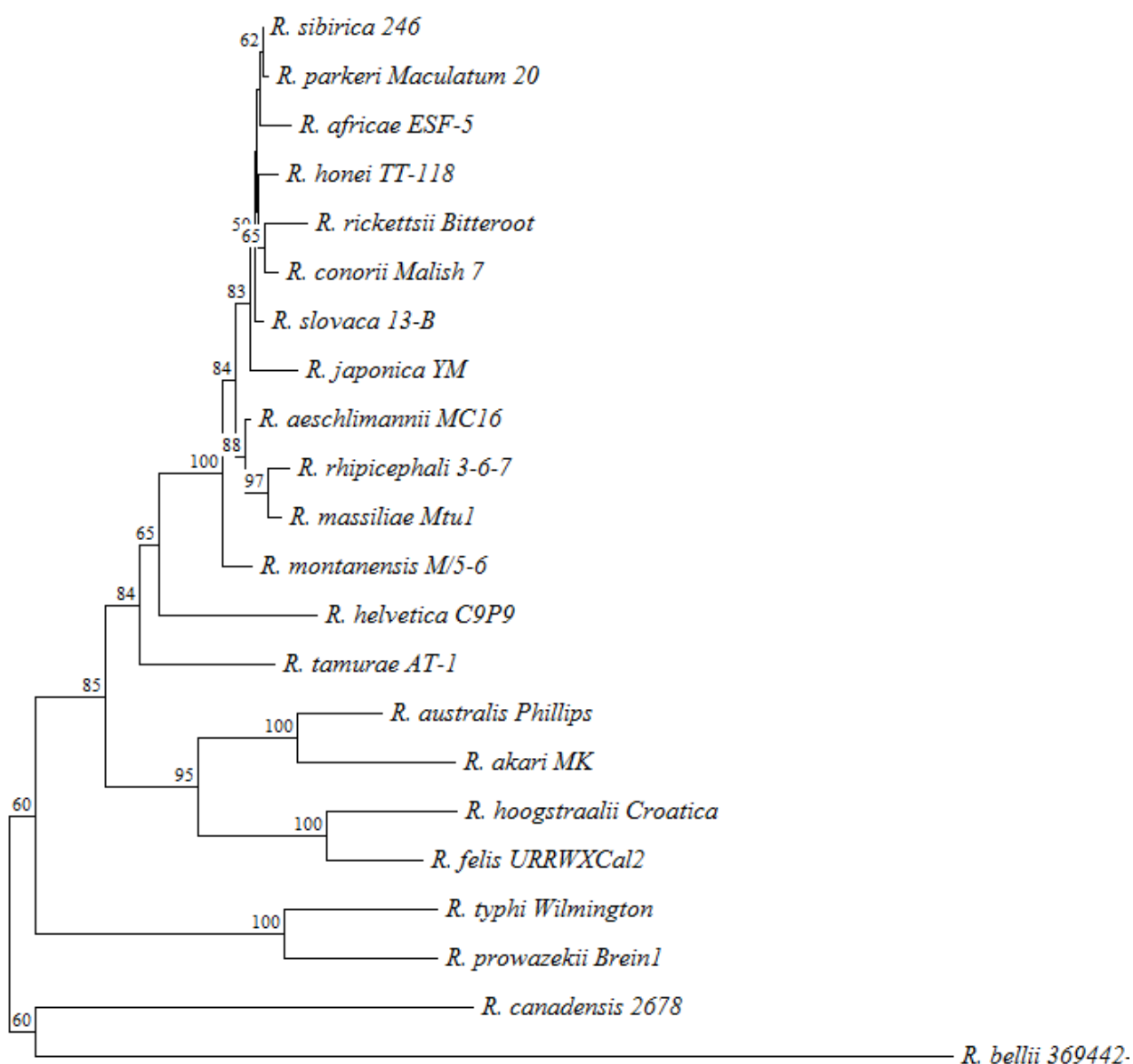
Slika 16: Filogenetsko drevo, narejeno na podlagi poravnave 3178 bp gena *ompA* (številke na vejah dreves pomenijo statistično moč razvrstitve in zanesljivost postavljenih vej drevesa). Dostopne številke rikacij: *R. aeschlimannii*-U83446, *R. africae*-U83436, *R. australis*-AF149108, *R. conorii*-U83448, *R. felis*-AF231136, *R. heilongjiangensis*-AY280710, *R. honoi*-U83456, *R. japonica*-U83442, *R. massiliae*-U83445, *R. montanensis*-U83447, *R. parkeri*-U83449, *R. rhipicephali*-U83450, *R. rickettsii*-U83451, *R. sibirica*-U83455, *R. slovaca*-U83454, *R. peacocki*-AY357764 and *R. hoogstraalii* Croatica (nova rikacija) – EU816565.



Slika 17: Filogenetsko drevo, narejeno na podlagi poravnave 766 bp gena 16S rRNA (številke na vejah dreves pomenijo statistično moč razvrstitve in zanesljivost postavljenih vej drevesa). Dostopne številke rikacij: *R. aeschlimannii*-U74757, *R. africae*-L36098, *R. akari*-L36099, *R. australis*-L36101, *R. canadensis*-L36104, *R. bellii*-L36103, *R. asiatica*-AF394906, *R. conorii*-AF541999, *R. felis*-L28944, *R. helvetica*-L36212, *R. honei*-L36220, *R. japonica*-L36213, *R. massiliae*-L36214, *R. montanensis*-L36215, *R. parkeri*-L36673, *R. prowazekii*-M21789, *R. rhipicephali*-L36216, *R. rickettsii*-L36217, *R. sibirica*-L36218, *R. slovaca*-L36224, *R. typhi*-L36221, *R. tamurae*-AY049981, *R. peacocki*-U55820 and *R. hoogstraalii* Croatica (nova rikacija) – FJ767735.



Slika 18: Filogenetsko drevo, narejeno na podlagi poravnave 239 bp 17 kDa gena (številke na vejah dreves pomenijo statistično moč razvrstitve in zanesljivost postavljenih vej drevesa). Dostopne številke rikecij: *R. montanensis*-U11017, *R. parkeri*-U17008, *R. prowazekii*-M28482, *R. rhipicephali*-U11020, *R. sibirica*-AF445384, *R. tamurae*-AB114825, *R. typhi*-M28481, *R. peacocki*-AY590153, *R. akari*-AF445383, *R. asiatica*-AB114798, *R. australis*-M74042, *R. bellii*-U11013, *R. canadensis*-M82879, *R. conorii*-M28480, *R. honei*-AF027124, *R. japonica*-D16515, *R. felis*-NC_007109 and *R. hoogstraalii* Croatica (nova rikecija) – FJ767736.



Slika 19: Filogenetsko drevo, narejeno na podlagi poravnave 1217 bp gena *gltA* (številke na vejah dreves pomenijo statistično moč razvrstitve in zanesljivost postavljenih vej drevesa). Dostopne številke rikecij: *R. aeschlimannii*-U59722, *R. akari*-U59717, *R. africae*-U59733, *R. australis*-U59718, *R. bellii*-U59716, *R. canadensis*-U59713, *R. conorii*-U59730, *R. felis*-AF210692, *R. helvetica*-U59723, *R. honei*-U59726, *R. japonica*-U59724, *R. massiliae*-U59719, *R. montanensis*-U74756, *R. parkeri*-U59732, *R. prowazekii*-M17149, *R. rhipicephali*-U59721, *R. rickettsii*-U59729, *R. sibirica*-U59734, *R. slovaca*-U59725, *R. typhi*-U59714, *R. tamurae*-AF394896 and *R. hoogstraalii Croatica* (nova rikecija) – FJ767737.

4.4 PREIZKUS PATOGENOSTI NOVE RIKECIJE

Raziskave testiranja patogenosti nove rikecije na poskusnih živalih – C3H/HeN in Balb/C miši – smo izvedli v sodelovanju z Laboratorijem za poskusne živali in raziskave rikecij in erlihij tretje varnostne stopnje, na UTMB, Galveston v ZDA. Sami poskusov patogenosti na živalih nismo mogli izvesti, ker nimamo ustreznega laboratorija za poskusne živali.

Za okužbo miši smo uporabili različne koncentracije čistega izolata nove rikecije iz skupine 33 bAb (glej Tabela 2) iz osmega dne pasaže pet (p5d8) in štirinajstega dne pasaže tri (p3d14) (glej Slika 10).

C3H/HeN in Balb/C miši, ki so dovzetne za rikecioze (Beati in sod. 1994a; Walker in sod. 1994), smo inokulirali z različnimi koncentracijami izolata nove rikecije (1:5, 1:50, 1:500, 1:5000). Kontrolne skupine miši nismo okužili. Poskus je na obeh tipih miši potekal vzporedno. Tretji dan po okužbi se je pri obeh tipih miši, ki smo jih okužili s koncentracijo 1:5 in 1:50, pojavilo otekanje trebuha. Miši so se umirile, vendar se je gibanje že peti dan po okužbi normaliziralo in trebuh ni bil več otečen. Pri miših tipa Balb/C smo opazili tudi grizenje repa. Kontrolne skupine obeh tipov miši niso kazale nobenih patogenih znakov in so se obnašale normalno. Tudi miši, ki smo jih okužili s koncentracijami 1:500 in 1:5000, niso kazale patogenih znakov.

To je bil prvi poskus, pri katerem nismo uspeli zadeti LD50, zato bo potrebno poskuse še ponoviti. Kljub temu smo uspeli dokazati zunanje patološke spremembe, ki so se pojavile pri okužbi miši s koncentracijamam 1:5 in 1:50.

4.5 DOSTOPNOST IZOLATA NOVE RIKECIJE V DVEH NEODVISNIH BANKAH

Izolat nove rikecije je dostopen v dveh zbirkah kultur. Dve tubici z 1 ml izolata nove rikecije v gojišču smo poslali v dve neodvisni zbirki, v ZDA in v Nemčijo. V ZDA smo se obrnili na raziskovalca dr. Donalda Bouyerja in prof. dr. Davida Walkerja iz UTMB – Galveston, ki imajo svojo zbirko celičnih kultur in rikecij. Ko so novo rikecijo tamkajšnji raziskovalci namnožili in potrdili istovetnost rikecije s pomnoževanjem gena za 17 kDa protein, so nam poslali potrdilo o dostopnosti izolata z identifikacijsko številko UTMB00003, ki ga prilagamo kot prilogo E. Drugo zbirko smo izbrali v Evropi, in sicer Nemško zbirko za mikroorganizme

in celične linije (nemško: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSMZ). Sodelovali smo z dr. Sabine Gronow, ki je prav tako uspešno namnožila novo rikecijo in jo potrdila z molekularnimi metodami. V nemški zbirki DSMZ je nova rikecija shranjena kot prva rikecija. Potrdilo o dostopnosti izolata z identifikacijsko številko DSM 22243 prilagamo kot prilogo F.

Naslov obeh zbirk je:

1. The University of Texas Medical Branch – UTMB
2. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSMZ.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rikeciologija je razvijajoča se veda, zato je povsem pričakovano, da se število na novo odkritih rikecij povečuje. Rikecije iz skupine SFG postajajo vse bolj prepoznavne in pomembne pri diagnosticiranju in pojavljanju rikecioz (Parola in sod. 2005). Včasih so za opis nove vrste rikecije upoštevali samo razlike v epidemioloških, seroloških in znotrajceličnih rastnih značilnostih rikecij (Walker 2007). Danes je po uveljavljenih kriterijih za opis nove vrste rikecije na osnovi molekularnih značilnosti potrebno analizirati odseke vsaj petih izmed sledečih rikecijskih genov: 16S rRNK, 17 kDA, *gltA*, *ompB*, *ompA*, *sca1*, *sca2*, *sca4* in *groEL* (Fournier in sod. 2003; glej poglavje 2.1.7). Čeprav so ta merila objektivna in zadostna za poimenovanje nove vrste rikecije, se avtorji strinjajo, da je molekularna analiza na podlagi analize odsekov genov nezadostna (Fournier in sod. 2003; Gevers in sod. 2005). Zato sodijo med pomembne značilnosti pri opisu nove vrste rikecije tudi biološke značilnosti, med katere prištevajo osamitev in kultivacijo rikecije, morfologijo in ultrastrukturo ter določitev patogenosti (Fournier in sod. 2007).

V nedavni raziskavi so na območju Srednje Dalmacije na Hrvaškem, v suličastih klopih (*Haemaphysalis sulcata*), nabranih na ovcah in kozah, odkrili novo rikecijo iz skupine SFG. Z novo rikecijo je bilo okuženih do 26 % klopov. Rikecijo so delno opredelili z molekularnimi metodami (Duh in sod. 2006). Na Hrvaškem so endemične tri rikecioze, in sicer: sredozemska vročica, ki jo povzroča *Rickettsia conorii* v obalnem predelu od Zadra do Dubrovnika (Punda in sod. 1984; Tartaglia 1939); endemična pegavica, ki jo povzroča *Rickettsia typhi* v južnem delu Hrvaške (Punda-Polic in sod. 2008) in rikecijske kože, ki jih povzroča *Rickettsia akari* v severnem delu Hrvaške (Radulovic in sod. 1996). Na območju Hrvaške so v klopih dokazali še dve, za človeka patogeni rikeciji, *Rickettsia slovaca* v klopu *Dermacentor marginatus* in *Rickettsia aeschlimannii* v klopu *Hyalomma marginatum*. Vendar teh dveh vrst rikecij na Hrvaškem do danes niso potrdili kot povzročiteljici okužb pri ljudeh (Duh in sod. 2003; Punda-Polic in sod. 2002).

Glede na omenjene podatke iz literature in številne patogene rikecije na Hrvaškem, smo v okviru doktorske naloge nadaljevali z raziskavami nove, nedavno odkrite rikecije.

Na podlagi delnih molekularnih analiz so novo rikecijo genetsko uvrstili najbližje bakteriji *Rickettsia felis* (Duh in sod. 2006; Perez-Osorio in sod. 2008). Zato smo za kultivacijo nove rikecije uporabili celično linijo komarjevih celic C6/36, na katerih so predhodno uspešno kultivirali *R. felis* pri 25°C (Horta in sod. 2006). To je posebnost te rikecije, saj rastejo rikecije iz SFG navadno pri temperaturah nad 30°C (Horta in sod. 2006). Tudi novo rikecijo smo na komarjevih celicah uspešno kultivirali in osamili pri temperaturi 26°C, v okolju brez CO₂. Za raziskavo smo uporabili predhodno očiščene in zamrznjene klope iz Splita, nabrane leta 2000 in shranjene na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (Tabela 2). Nabrani so bili iz ovc, na katerih so predhodno že dokazali klope *Hae. sulcata*, okužene z novo rikecijo (Duh in sod. 2006). Nova rikecija je okužila 80 do 90 % komarjevih celic C6/36 v petnajstih dneh. Kljub temu, da smo uspeli kultivirati novo rikecijo, je mnogokrat postopek izolacije in kultivacije rikecij neuspešen. Rikecije rastejo na celični liniji brez dodanih antibiotikov (Wood in Azad 2000), zato so okužbe celičnih linij z netarčnimi organizmi pogoste. Kljub natančnemu delu smo med gojenjem nove rikecije nehoti okužili komarjeve celice s stafilokoki (Slika 9, Slika 10). Čeprav stafilokoki niso motili rasti rikecij, smo jih odstranili z dodatkom antibiotikov. Antibiotiki so poleg stafilokokov uničili tudi velik del rikecij, vendar smo štirinajsti dan tretje pasaže uspeli pridobiti čisti izolat nove rikecije (Slika 10). Kultivacijo rikecij lahko moti tudi okužba z glivami (glej poglavje 4.1.2.2.1.2 in 4.1.2.2.1.3). Pri okužbah z glivami, steklenice/ posodice nismo odpirali, temveč smo jih takoj zaprte zavrgli in avtoklavirali. Kultivacija mikroorganizma direktno iz homogenata kloпов je težavna tudi zaradi tega, ker se v klopu poleg ciljnega mikroorganizma nahajajo tudi drugi mikroorganizmi, bodisi endosimbionti kloповega prebavnega sistema ali mikroorganizmi, ki se s sesanjem krvi naselijo v klopu in lahko motijo proces kultivacije željenega mikroorganizma. V enem izmed poskusov kultivacije, smo poleg nove rikecije, dokazali tudi prisotnost bakterije *Pseudomonas* sp. oziroma *Burkholderia cepacia*, ki so prerasle in preprečile rast nove rikecije in uničile komarjeve celice C6/36 (Slika 8). Berriatua in sod. (2001) so ugotovili, da povzročča kompleks izolatov *B. cepacia* vnetje vimen ovc, kar posledično vpliva na okuženost surovega mleka in sira. Tako se lahko okužba preko hrane prenese na človeka. Kompleks *B. cepacia* je patogen za človeka in lahko ogrozi življenje ljudi s cistično fibrozo, s kronično granulomatozno boleznijo in paciente po intenzivni negi. Omenjena bakterija sicer ni bila predmet naše raziskave, vendar bi bilo zanimivo raziskati okuženost ovc s kompleksom *B. cepacia* v obdobju laktacije.

Okužbe z rikecijami dokazujemo z različnimi serološkimi metodami, med katerimi se je test IF izkazal kot hiter, občutljiv in specifičen ter tudi cenovno primeren (Novaković in sod. 1991). Antigen nove rikecije smo pripravili iz izolata nove rikecije, ki smo jo gojili petnajst

dni v četrti pasaži (p4d15) iz prvotne skupine klopov 33 z oznako 33bAb (glej poglavje 4.1.2, Slika 10). Dokazali smo visoko reaktivnost s protitelesi seruma bolnika, okuženega z *R. conorii* (Slika 11). S serološkimi metodami lahko ločimo ne le protitelesa proti skupinam, ampak tudi proti posameznim vrstam rikecij, seveda pa se pri sorodnih vrstah lahko pojavi navzkrižna reaktivnost (La Scola in Raoult 1997). V našem primeru je prišlo do navzkrižne reaktivnosti med novo rikecijo in rikecijo *R. conorii*. Glede na to, da so ljudje na kmetijah na območju Dalmacije v stiku z domačimi živalmi, na katerih so lahko okuženi klopi, bi bil serološki pregled krvi ljudi iz kmetij, tokrat na protitelesa proti *R. conorii* in proti novi rikeciji, za katero smo izdelali referenčno kontrolo, smiseln. Pred leti so na območju Evrope testirali bolnike na protitelesa proti *R. conorii*, z visokimi titri. Ko pa so vzorce pregledali še z molekularnimi metodami, so ugotovili, da je okužbo povzročila rikecija *R. felis* in ne *R. conorii* (Richter in sod. 2002). *Rickettsia felis* je človeški patogen (Parola in sod. 2005a) in nova rikecija je genetsko zelo podobna rikeciji *R. felis* (Duh in sod. 2006). Tudi simptomi okužbe z rikecijo *R. felis* in z rikecijo *R. conorii*, ki povzroča sredozemsko mrzlico in je na območju Dalmacije endemična, (Sardelić in sod. 2003) so podobni (Richter in sod. 2002). Zato ne izključujemo možnosti, da bi nekatere od mnogih primerov sredozemske vročice lahko povzročila tudi nova rikecija in ne le bakterija *R. conorii*.

Elektronsko mikroskopsko analizo nove rikecije *in vitro* na celični kulturi komarjevih celic C6/36 smo izvajali v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo na Oddelku za Biologijo, Biotehniške fakultete v Ljubljani, elektronsko mikroskopsko analizo nove rikecije *in vivo* iz notranjih organov klopov *Hae. sulcata* pa v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo, The University of Texas Medical Branch – UTMB, Galveston, ZDA. Za fiksacijo in vklapljanje delov organov in celične linije v smole smo uporabili preizkušene metode (glej poglavje 4.2), ki so bile primerne tudi za naše vzorce. Za elektronsko mikroskopijo nove rikecije na celični kulturi smo uporabili tretjo pasažo izolata nove rikecije (p3d14) (Slika 10), za elektronsko mikroskopijo nove rikecije iz notranjih organov klopov pa klope iz Splita 2007 (glej poglavje 3.1). Pri zamrzovanju klopov se struktura celic poškoduje, zato smo za elektronsko mikroskopijo nove rikecije uporabili samo žive klope vrste *Hae. sulcata*. Rikecije so obvezne znotrajcelične bakterije, ki živijo v citoplazmi gostiteljske celice. Redko lahko rikecije iz skupine SFG najdemo v jedru (Silverman in Wisseman 1979; Silverman in sod. 1980). Nove rikecije v jedru nismo zasledili. Z elektronsko mikroskopsko analizo ultrastrukture nove rikecije smo predstavili tipično morfologijo SFG rikecij, kjer sta celična stena in plazmalema ločeni s perioplazemskim prostorom (Slika 13 in 14). Vstop rikecije v celico gostitelja poteka z

inducirano fagocitozo (pri nefagocitnih celicah) ali fagocitozo (pri fagocitnih celicah) (Whitworth in sod. 2005). Na sliki 15A in 15B je dobro vidna fagocitoza nove rikecije v komarjevo celico in tvorba psevdopodijev na površini komarjeve celice, ki obdajo rikecijo in jo s fagocitozo vključijo v celico (15C). Ko se rikecija iz fagosoma sprostí v citoplazmo, začne rasti in se razmnoževati (Teyssere in sod. 1995; Billings in sod. 2001). Za rikecijo se v citoplazmi nahajajo potrebna hranila, adenozin trifosfati, nukleotidi in aminokisljine, ki so potrebni za razmnoževanje (Renesto in sod. 2003; Whitworth in sod. 2005; Audia in Winkler 2006). Podobno kot v srednjem črevesu (Slika 14), se nahajajo rikecije prosto v citoplazmi komarjeve celice (Slika 15Č). Binarno delitev rikecij smo opazili pri obeh, pri okuženih komarjevih celicah C6/36 (15D) in v žlezah slinavkah klopa (Slika 13). Po določenem času se začne gostiteljska celica zaradi okužbe razgrajevati, kot prikazuje slika 15E. Novo rikecijo smo dokazali v žlezah slinavkah klosov (Slika 13), zato obstaja večja verjetnost, da je rikecija patogena, saj se lahko tako do gostitelja prenese preko sline, ko se klop hrani. V primeru, da zasledimo rikecije samo v ovarijih klopa, obstaja velika verjetnost, da je rikecija nepatogena in živi kot endosimbiont klopa (Raoult in Raoux 1997).

Ločimo za človeka patogene in nepatogene rikecije. Rikecijo, patogeno za človeka, moramo izolirati iz krvi ali tkiva bolnika v celični kulturi in/ ali dokazati njeno prisotnost z molekularnimi metodami. Večina rikecij, ki so danes na seznamu patogenih za ljudi, so odkrili že veliko let nazaj, kot nepatogene za ljudi. V primeru bakterije *R. parkeri* so 65 let po odkritju rikecije dokazali njeno patogenost za človeka. Zato je potrebna visoka stopnja zavedanja pri delu z rikecijami, saj ne moremo izključiti njene patogenosti za človeka, tudi če ni dokazana (Walker in sod. 2007).

Patogenost nove rikecije smo preizkusili na poskusnih živalih. Uporabili smo miši C3H/HeN in Balb/C, ki smo jih izbrali zaradi občutljivosti na okužbo z različnimi vrstami rikecij (Beati in sod. 1994a; Walker in sod. 1994). Delo z rikecijami je nevarno in gojenje rikecij na poskusnih živalih zahteva tretjo stopnjo mikrobiološke varnosti. Na inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) laboratorija za poskusne živali tretje varnostne stopnje ni, zato smo raziskave opravili v sodelovanju z Laboratorijem za poskusne živali in raziskave rikecij in erlihij tretje varnostne stopnje na UTMB, v Galvestonu v ZDA. Miši smo okužili z različnimi koncentracijami nove rikecije. Kljub temu, da smo pri miših, okuženih z nizkimi redčinami rikecije uspeli dokazati zunanje patološke spremembe, kot so otekanje trebuha, upočasnitev gibanja in grizenje repov, so si vse miši po določenem času popolnoma opomogle. To si lahko razlagamo z dejstvom, da nova rikecija ni visoko patogena in izzove le blažjo obliko bolezni. Pri tem pa ne smemo zanemariti rezultatov raziskave patogenosti

bakterije *R. rickettsii*. Le-ta na morskih prašičkih ni povzročila patoloških sprememb, za človeka pa je zelo patogena in celo smrtna (Raoult in Roux 1997). Druga možna razlaga je koncentracija rikecij v vzorcu, s katerim smo okužili miši. V kolikor je bila prenizka, nismo dosegli smrtne doze LD₅₀ in posledično so miši ozdravele. Poskus bi bilo smiselno ponoviti, da potrdimo oziroma ovržemo hipotezo o patogenosti nove rikecije. Pri raziskavah patogenosti določenega mikroorganizma se je potrebno zavedati, da se lahko mikroorganizem v človeku odzove popolnoma drugače kot v poskusni živali. Predlagajo poskuse na živalih, ki so evolucijsko čim bližje človeku (npr. opice) (Parola in Raoult 2001).

Odkrili smo le del življenjskega kroga nove rikecije. Novo rikecijo smo na območju Severne in Srednje Dalmacije našli v klopih *Hae. sulcata* na ovcah, vendar predvidevamo, da je rikecija vstopila v življenjski krog domačih živali preko divjih živali. Podobni dogodki so značilni za nekatere druge vrste rikecij. V ZDA so v bolhi vrste *Ctenocephalides felis* na oposumu odkrili rikeciji *R. felis* in *R. typhi*. Če se začnejo oposumi gibati okoli hiš, lahko rikeciji prestopita v nov življenjski krog med bolho in domačo mačko (Boostrom in sod. 2002). Tudi *R. conorii* kroži v naravi med domačimi in divjimi sesalci ter njihovimi klopi (Goldwasser in sod. 1974; Harris 1986). Nova rikecija je molekularno najbolj podobna bakteriji *R. felis*, katere glavni prenašalci so bolhe, zato bi bilo smiselno na prisotnost nove rikecije pregledati bolhe in klope malih sesalcev na območju Južne Hrvaške. Bolhe bi lahko predstavljale vmesni člen prenosa rikecije med domačimi in divjimi živalmi. Glede na to, da je klop vrste *Hae. sulcata* trigostiteljski, in da se ličinke in nimfe prehranjujejo na plazilcih (Estrada-Pena in sod. 2004), bi bilo smiselno pregledati tudi klope plazilcev, ki živijo na območju Dalmacije: grška kornjača (*Testudo hermanni*), močvirska sklednica (*Emys orbicularis*), pozidni gekon (*Tarentola mauritanica*), turški gekon (*Hemidactylus turcicus*), črnopikčasta kuščarica (*Algyroides nigropunctatus*), veliki zelenec (*Lacerta trilineata*), zahodnoevropski zelenec (*Lacerta bilineata*), pozidna kuščarica (*Podarcis muralis*), primorska kuščarica (*Podarcis siculus*), šiloglavka (*Dalmatolacerta oxycephala*), kraška kuščarica (*Podarcis melisellensis*), slepec (*Anguis fragilis*), zoltoplaz (*Pseudopus apodus*), južnoevropska zrva (*Malpolon insignitus*), vitka poljarica (*Platyceps najadum*), črnica (*Hierophis viridiflavus*), belica (*Hierophis gemonensis*), leopardovka (*Zamenis situla*), progasti gož (*Elaphe quatuorlineata*), navadni gož (*Zamenis longissim*), belouška (*Natrix natrix*), kobranka (*Natrix tessellata*), smokulja (*Coronella austriaca*), mačjeoka kača (*Telescopus fallax*) in modras (*Vipera ammodytes*) (Planinc, ustno; Kuljerić, ustno; Trilar, ustno). Rikecijo *Candidatus R. hoogstraalii*, ki je v treh genih identična novi rikeciji iz Hrvaške, so v ZDA našli tudi v klopih na morskih pticah (Mattila in sod.

2007; Kawabata in sod. 2006), zato ni izključeno, da bi lahko bile vmesni gostitelji klosov ali drugih zajedalcev (bolh?) med divjimi in domačimi živalmi na območju Dalmacije morske ptice. Smiselno bi bilo pregledati gnezda morskih ptic Dalmacije in dalmatinskih otokov: sredozemskega viharika (*Puffinus yelkouan*), vranjeka (*Phalacrocorax aristotelis*), sredozemskega galeba (*Larus audouinii*) in rumenonogega galeba (*Larus cachinnans*) (Trilar, ustno).

Potrebno je opozoriti, da so klopi iz družine trdih klosov (Ixodidae) najpogostejši prenašalci rikecij iz skupine SFG, z dvema izjemama, rikecije vrste *R. akari* in *R. felis* (Raoult in Roux 1997; Azad in Beard 1998). Tudi klop vrste *Hae. sulcata*, v katerih smo dokazali novo rikecijo, sodi v skupino trdih klosov. Klopi iz družine mehkih klosov (Argasidae) niso, oziroma so zelo redko prenašalci rikecij (Walker in sod. 2007). Pred kratkim so dokazali prisotnost rikecije *Candidatus Rickettsia hoogstraalii* v mehkih klopih vrste *Carios capensis* in *Ornithodoros moubata* (Kawabata in sod, 2006; Cutler in sod 2006). Pri raziskovanju rikecij se torej ne smemo omejiti samo na določene vrste, skupine klosov.

Fournier in sod. (2003) so opisali nekaj objektivnih navodil za klasifikacijo novih rikecijskih izolatov na različnih taksonomskih stopnjah (rod, skupina, vrsta), katerih osnova so nukleotidna zaporedja vsaj petih genov, ki zapisujejo različne beljakovine (glej poglavje 2.1.7.1.3). V naši raziskavi smo pomnoževali in dokazovali prisotnost nove rikecije – direktno iz klosov *Hae. sulcata* in iz čistega izolata – s petimi geni, in sicer genom za 17 kDa, 16S rRNK, *gltA*, *rOmpB* in *rOmpA* protein. Pri tem smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so jih predhodno objavili ali smo jih izdelali sami. Nukleotidno zaporedje gena za *rOmpA* protein se je namreč toliko razlikovalo od ostalih rikecij, da ga z obstoječimi začetnimi oligonukleotidi nismo uspeli pomnožiti.

Za dokazovanje prisotnosti rikecijske DNK (rod *Rickettsia*), smo pomnožili odsek gena za 17 kDa protein. Protokol za navadni PCR za pomnoževanje 17 kDa proteina smo priredili v PCR v realnem času, ki je predstavljen v poglavju 4.3.1. Metoda je primerna, ker je hitrejša in bolj občutljiva in zaradi načina dokazovanja PCR produktov ne predstavlja nevarnosti kontaminacije.

Z molekularnimi metodami smo uspešno pomnožili in določili nukleotidno zaporedje petih genov nove rikecije. Rikecijsko DNK smo izolirali direktno iz klosov vrste *Hae. sulcata* in iz rikecije, gojene v komarjevih celicah C6/36. Nukleotidna zaporedja genov 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK, *ompB* in *ompA* nove rikecije, ki smo jo izolirali direktno iz klopa vrste *Hae. sulcata*, so

dostopna v genski banki pod referenčnimi številkami: DQ081185, DQ081187, DQ081184, DQ081186 in EU816564, nukleotidna zaporedja petih genov 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK, *ompB* in *ompA* nove rikecije, gojene v komarjevih celicah C6/36, pa so dostopna v genski banki pod referenčnimi številkami: FJ767736, FJ767737, FJ767735, FJ767738 in EU816565. Nukleotidna zaporedja genov 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK in *ompB* rikecije iz klopov vrste *Hae. sulcata* so bila identična nukleotidnim zaporedjem teh genov nove rikecije, ki smo jo gojili na komarjevih celicah C6/36 in bakteriji *Candidatus* R. hoogstraalii, ki so jo izolirali iz klopov vrste *C. capensis* v ZDA. Omenjeni geni so značilni za rikecije iz skupine SFG in TG (Fournier in sod. 2003). Odsek gena za 17 kDa protein in gen za 16S rRNK sta primerna za uvrstitev rikecij v rod *Rickettsia* in sta manj podvržena pritiskom gostiteljevega imunskega odziva. Odsek gena za 17 kDa protein in gen za 16S rRNK ne prikažeta specifično značilnih povezav med rikecijami (Anderson in Tzianabos 1989). Gen *gltA* ne pokaže specifičnih povezav med rikecijami skupine SFG (Roux in sod. 1997). Gen *ompB* mutira pogosteje in je primeren za filogenetske analize (Roux in Raoult 2000), vendar ni specifičen gen za rikecije iz skupine SFG, kamor sodi nova rikecija. Nukleotidno zaporedje gena *ompA* se je med omenjenimi rikecijami razlikovalo. Gen *ompA* je specifičen za skupino SFG in se precej razlikuje med posameznimi rikecijami znotraj skupine in je zelo podvržen evolucijskim in okoljskim spremembam (Fournier in sod. 1998). Zaradi mutacij so nastale minimalne razlike med nukleotidnimi zaporedji gena *ompA* med rikecijami. Klopi vrste *Hae. sulcata* iz istih lokacij so bili okuženi z rikecijami, ki so imele identičen gen *ompA*. Klopi vrste *Hae. sulcata* iz različnih lokacij so bili okuženi z rikecijami, ki so imele v 98,7 % podoben gen *ompA*. Gen *ompA* rikecije iz klopa vrste *Hae. sulcata* in nove rikecije, ki smo jo gojili na komarjevih celicah C6/36, je bil podoben v 99,8 %. Gen *ompA* nove rikecije ter bakterije *Candidatus* R. hoogstraalii iz klopov vrste *C. capensis*, je bil podoben v 99,3 %. Potrebno je opozoriti, da v raziskavi nismo določili celotnega nukleotidnega zaporedja gena *ompA*. Določili smo dovolj dolgo nukleotidno zaporedje (3317–3329 bp) gena *ompA*, ki je zadoščalo za primerjavo gena nove rikecije z uradno priznanimi vrstami rikecij iz skupine SFG. V primeru nadaljnjih raziskav izdelave cepiva, bi bilo potrebno določiti celotno nukleotidno zaporedje gena *ompA*.

Med rikecije sodi 24 uradno priznanih vrst. Med rikecije, ki povzročajo pegavice (angl. Typhus Group – TG) sodita danes rikeciji vrste *R. typhi* in *R. prowazekii*, v skupino rikecij, ki povzročajo mrzlice (angl. Spotted Fever Group – SFG) pa: *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. africae*, *R. sibirica*, *R. slovaca*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. australis*, *R. akari*, *R. felis*, *R. aeschlimannii*,

R. helvetica, *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. montanensis*, *R. parkeri*, *R. heilongjiangensis*, *R. tamurae*, *R. asiatica* in *R. peacockii*. *Rickettsia bellii* in *Rickettsia canadensis* predstavljata tretjo, tako imenovano izvorno skupino. Obstaja še veliko izolatov rikecij, ki jih še niso uspeli povsem karakterizirati in opredeliti (Fournier in sod. 2003; Fournier in Raoult 2007). Natančnejše razvrščanje rikecij je mogoče s primerjavo zapisov za določene gene (Glej poglavje 2.1.3) (Slika 1) (Raoult in Roux 1997). Primerjava nukleotidnega zaporedja gena *ompA*, gena za 17kDa protein, gena *gltA* in gena za 16S rRNK nove rikecije z ostalimi uradno prizanimi vrstami rikecij iz skupine SFG in TG je pokazala 80,2–87,5 % (primerjava samo z rikecijami iz skupine SFG), 84,5–97,1 %; 86,5–97,2 % in 98,3–99,7 % podobnost. S filogenetsko analizo smo potrdili, da je nova rikecija nova vrsta znotraj skupine SFG rikecij. Uvrščamo jo skupaj z bakterijo *R. felis* oziroma v vejo med *R. felis* in ostalimi rikecijami iz skupine SFG.

Prvi opis predlagane nove vrste rikecije *Rickettsia hoogstraalii* je iz leta 2006, kjer so dokazali prisotnost te vrste rikecije v klopih *Hae. sulcata*, nabranih iz ovc in koz v Srednji Dalmaciji na Hrvaškem (Duh in sod. 2006). Rikecija je bila delno opisana z molekularnimi metodami. Klope *Hae. sulcata* smo nabirali še leta 2002, 2006 in 2007. Klopi so bili vedno visoko okuženi z novo rikecijo, v povprečju 22,8 %. Ime *Candidatus R. hoogstraalii* so predlagali znanstveniki, ki so rikecijo iz klopa *C. capensis* izolirali na klopni celični liniji CCE3 in ISE6 pri temperaturi 32–34°C in rezultate objavili leta 2007 (Mattila in sod. 2007). Analizirali so odsek zaporedja gena *gltA*, in odsek zaporedja gena, ki kodira 17 kDa protein. Uspešno so namnožili tudi odsek gena *ompA* z na novo oblikovanimi začetnimi olugonukleotidi (Mattila in sod. 2007). V doktorski nalogi smo dve leti kasneje z molekularnimi in biološkimi metodami potrdili, da gre sicer za isto in hkrati novo vrsto rikecije znotraj skupine SFG.

Po uspešno pridobljenih podatkih, ki so potrebni za opis nove vrste rikecije, smo rezultate dela objavili v mednarodni reviji *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, ki določa in vodi uradno poimenovanje novih vrst rikecij. Pogoj za objavo v reviji je dostopnost izolata nove vrste rikecije v dveh neodvisnih zbirkah kultur (glej Priloga E in F) (Fournier in sod. 2003). Podajamo opis nove vrste rikecije, *R. hoogstraalii*, kot je predstavljen v mednarodni reviji *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Opis rikecije *Rickettsia hoogstraalii* sp.nov.

Rickettsia hoogstraalii (hoog.straal`i.i N.L. gen.masc. n. *hoogstraalii*, po Hoogstraal, imenovano v čast Dr. Harry Hoogstraalu, ki je prispeval veliko znanja o klopih).

Rickettsia hoogstraalii je obvezna znotrajcelična bakterija, ki raste na celični liniji komarjevih celic C6/36 pri temperaturi 26°C, v okolju brez CO₂. Celicam smo za rast dodali sterilno gojišče Leibovitz 15 Glutamax, obogateno s 5 % telečjim serumom. Mattila in sod. (2007) so jo uspešno vzgajali tudi na klopni celični liniji CCE3 in ISE6 pri temperaturi 32–34°C. Morfologija *R. hoogstraalii* je značilna za rikecije iz skupine SFG. Gram negativno celično steno in plazmalemo ločuje periplazemski prostor, ki smo ga opisali (identificirali) s transmisijsko elektronsko mikroskopijo. Rikecije v okuženih komarjevih celicah, pobarvanih z metodo Diff-Quick, izgledajo kot majhni, vijolično obarvani kokobacili. Rikecija je bila do zdaj izolirana samo iz dveh vrst klosov, in sicer iz *Hae. sulcata* in *C. capensis* (Mattila in sod. 2007). *Rickettsia hoogstraalii* kaže citopatski učinek na celicah C6/36, CCE3 in IJS6. Bakterija *R. hoogstraalii* je geografsko široko razširjena, saj so jo dokazali na Hrvaškem, v Španiji in v ZDA (Duh in sod. 2006, Mattila in sod. 2007; Portillo in sod. 2008). Zaporedja genov za 16S rRNK, 17 kDa, gltA, rOmpA in rOmpB proteine so potrdila, da je *R. hoogstraalii* nova vrsta iz skupine SFG. Znotraj skupine SFG je najbolj sorodna humani patogeni bakteriji *R. felis* (Duh in sod. 2006; Gračner in sod. 2009).

Prototip bakterije *R. hoogstraalii* je sev Croatica, ki smo ga izolirali iz klosov *Hae. sulcata*, nabranih leta 2000 na Hrvaškem. Bakterija *Rickettsia hoogstraalii*, sev Croatica, je dostopna v dveh neodvisnih zbirkah kultur v dveh državah: DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany (identifikacijska številka DSM 22243) in zbirka UTMB – Galveston, Texas, ZDA (identifikacijska številka UTMB00003).

5.2 SKLEPI

- Bakterijo *Rickettsia hoogstraalii*, sev Croatica, smo uspešno osamili in kultivirali na celični liniji komarjevih celic C6/36, pri temperaturi 26°C in v okolju brez CO₂, iz kloпов vrste *Haemaphysalis sulcata*.
- V teh razmerah potrebuje *Rickettsia hoogstraalii*, sev Croatica, do 15 dni, da okuži 80–90 % komarjevih celic C6/36.
- Okužbo celic in rikecijo dokažemo v barvanem razmazu celic, kjer s 1000 x povečavo opazimo kratke paličaste bakterije v citoplazmi celic. Vrsto rikecije potrdimo s pomnoževanjem in določitvijo nukleotidnega zaporedja specifičnega dela gena za 17kDa.
- Antigen bakterije *R. hoogstraalii*, sev Croatica, ki smo ga pripravili iz rikecije, gojene 15 dni na komarjevih celicah, je primeren in uporaben za pripravo imunofluorescenčnega testa za dokazovanje protiteles proti rikacijam iz skupine SFG.
- Bakterijo *R. hoogstraalii*, sev Croatica, smo dokazali s transmissijsko elektronsko mikroskopijo *in vivo* v notranjih organih kloпов vrste *Hae. sulcata*.
- V žlezah slinavkah in v endotelnih celicah srednjega črevesa kloпов kaže *R. hoogstraalii*, sev Croatica, značilno obliko rikacij iz skupine SFG. Celična stena in plazmalema sta vidno ločeni s periplazemskim prostorom (Slika 12 in 13).
- Bakterijo *R. hoogstraalii*, sev Croatica, smo dokazali s transmissijsko elektronsko mikroskopijo tudi *in vitro* v komarjevih celicah C6/36.
- Poleg značilne oblike bakterije je lepo viden vstop, fagocitoza rikecije v komarjevo celico C6/36 s tvorbo psevdopodijev, binarna delitev v citoplazmi in razpad komarjeve celice C6/36, kot posledica okužbe z rikecijo (Slika 14).
- Z molekularnimi metodami smo uspešno pomnožili in določili nukleotidno zaporedje petih genov bakterije *R. hoogstraalii*, sev Croatica. Rikacijsko DNK smo izolirali direktno iz kloпов vrste *Hae. sulcata* in iz rikecije, gojene v komarjevih celicah C6/36.
- Nukleotidna zaporedja genov za 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK, *ompB* in *ompA* *R. hoogstraalii*, sev Croatica, ki smo jo izolirali direktno iz klopa vrste *Hae. sulcata*, so dostopna v genski banki pod referenčnimi številkami: DQ081185, DQ081187, DQ081184, DQ081186 in EU816564.

- Nukleotidna zaporedja petih genov za 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK, *ompB* in *ompA* *R. hoogstraalii*, sev Croatica, gojene v komarjevih celicah C6/36, so dostopna v genski banki pod referenčnimi številkami: FJ767736, FJ767737, FJ767735, FJ767738 in EU816565.
- Nukleotidna zaporedja genov za 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK in *ompB* rikecije iz kloпов vrste *Hae. sulcata* so bila identična nukleotidnim zaporedjem teh genov *R. hoogstraalii*, sev Croatica, ki smo jo gojili na komarjevih celicah C6/36 in bakteriji *Candidatus R. hoogstraalii*, ki so jo izolirali iz kloпов vrste *Carios capensis* v ZDA.
- Nukleotidno zaporedje gena *ompA* se je med omenjenimi rikecijami razlikovalo. Klopi vrste *Hae. sulcata* iz istih lokacij so bili okuženi z rikecijami, ki so imele identičen gen *ompA*. Klopi vrste *Hae. sulcata* iz različnih lokacij so bili okuženi z rikecijami, ki so imele v 98,7 % podoben gen *ompA*. Gen *ompA* rikecije iz klopa vrste *Hae. sulcata* in *R. hoogstraalii*, sev Croatica, ki smo jo gojili na komarjevih celicah C6/36, je bil podoben v 99,8 % in gen *ompA* *R. hoogstraalii*, sev Croatica ter bakterije *Candidatus R. hoogstraalii* iz kloпов vrste *C. capensis*, je bil podoben v 99,3 %.
- Primerjava nukleotidnega zaporedja gena *ompA* *R. hoogstraalii*, sev Croatica, z ostalimi uradno priznanimi vrstami rikecij iz skupine SFG, je pokazala 80,2–87,5 % podobnost.
- Primerjava nukleotidnega zaporedja gena za 17 kDa protein *R. hoogstraalii*, sev Croatica, z ostalimi uradno priznanimi vrstami rikecij iz skupine SFG in TG, je pokazala 84,5–97,1 % podobnost.
- Primerjava nukleotidnega zaporedja gena *gltA* *R. hoogstraalii*, sev Croatica, z ostalimi uradno priznanimi vrstami rikecij iz skupine SFG in TG, je pokazala 86,5–97,2 % podobnost.
- Primerjava nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNK *R. hoogstraalii*, sev Croatica, z ostalimi uradno priznanimi vrstami rikecij iz skupine SFG in TG, je pokazala 98,3–99,7 % podobnost.
- S filogenetsko analizo smo potrdili, da je bakterija *R. hoogstraalii*, sev Croatica, nova vrsta znotraj skupine SFG rikecij. Uvrščamo jo skupaj z bakterijo *Rickettsia felis* oziroma v vejo med *R. felis* in ostalimi rikecijami iz skupine SFG.

- Bakterija *R. hoogstraalii*, sev Croatica, je potencialno patogena za miši C3H/HeN in Balb/C. Slednje dokazujejo zunanje patološke spremembe, kot so otekanje trebuha, upočasnitev gibanja in grizenje repov, ki so se pojavile pri okuženih miših.
- *Rickettsia hoogstraalii* je bila do danes izolirana iz dveh vrst klopov, in sicer iz *Hae. sulcata* in *C. capensis* in je geografsko zelo razširjena, saj so jo z molekularnimi metodami dokazali na Hrvaškem, v Španiji in v državi Georgia, ZDA.
- Sev Croatica nove bakterije *Rickettsia hoogstraalii*, ki smo ga z molekularnimi in biološkimi metodami opisali v doktorski nalogi, velja za prototipni sev nove rikecije.
- Bakterija *R. hoogstraalii*, sev Croatica, je dostopna v dveh neodvisnih zbirkah kultur, v Nemčiji in ZDA, in sicer v DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, pod identifikacijsko številko DSM 22243 in v zbirki UTMB – Galveston, Texas, pod identifikacijsko številko UTMB00003.

6.1 POVZETEK

Prvi opis predlagane nove vrste rikecije *Rickettsia hoogstraalii* je iz leta 2006, kjer so dokazali prisotnost te vrste rikecije v klopih *Haemaphysalis sulcata*, nabranih iz ovc in koz v Srednji Dalmaciji na Hrvaškem (Duh in sod. 2006). Rikecijo so delno opisali z molekularnimi metodami. Klope *Hae. sulcata* smo nabirali še leta 2002, 2006 in 2007. Klopi so bili vedno visoko okuženi z novo rikecijo, v povprečju 22,8 %. V doktorski nalogi smo novo rikecijo uspešno osamili na celični liniji komarjevih celic C6/36 pri temperaturi 26°C, v okolju brez CO₂. Nova rikecija je v petnajstih dneh okužila 80 do 90 % komarjevih celic C6/36. Štirinajsti dan tretje pasaže smo uspeli pridobiti čisti izolat nove rikecije. Iz izolata nove rikecije smo pripravili antigen nove rikecije. Dokazali smo visoko reaktivnost s protitelesi seruma bolnika, okuženega z *R. conorii*. Z elektronsko mikroskopsko analizo ultrastrukture nove rikecije smo predstavili tipično morfologijo SFG rikecij, fagocitozo, tvorbo psevdopodijev, binarno delitev in razpad komarjeve celice. Rikecijo smo dokazali prosto v citosolu endotelnih celic v srednjem črevesu in v citoplazmi komarjevih celic. Patogenost nove rikecije smo preizkusili na poskusnih živalih, miših C3H/HeN in Balb/C. Nova rikecija ni visoko patogena, izražala je le blažjo obliko bolezni. Možno je tudi, da je bila koncentracija rikecij v vzorcu, s katerim smo okužili miši, prenizka in nismo dosegli smrtne doze LD₅₀. Z molekularnimi metodami smo uspešno pomnožili in določili nukleotidno zaporedje petim genom nove rikecije. Nukleotidna zaporedja genov 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK, *ompB* in *ompA* nove rikecije, ki smo jo izolirali direktno iz klopa vrste *Hae. sulcata*, so dostopna v genski banki pod referenčnimi številkami: DQ081185, DQ081187, DQ081184, DQ081186 in EU816564, nukleotidna zaporedja petih genov 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK, *ompB* in *ompA* nove rikecije, gojene v komarjevih celicah C6/36, pa so dostopna v genski banki pod referenčnimi številkami: FJ767736, FJ767737, FJ767735, FJ767738 in EU816565. Nukleotidna zaporedja genov 17 kDa, *gltA*, 16S rRNK in *ompB* rikecije iz klopov vrste *Hae. sulcata* so bila identična nukleotidnim zaporedjem teh genov nove rikecije, ki smo jo gojili na komarjevih celicah C6/36 in bakteriji *Candidatus R. hoogstraalii*, ki so jo izolirali iz klopov vrste *C. capensis* v ZDA. Nukleotidno zaporedje gena *ompA* se je med omenjenimi rikecijami razlikovalo. Klopi vrste *Hae. sulcata* iz istih lokacij so bili okuženi z rikecijami, ki so imele identičen gen *ompA*. Klopi vrste *Hae. sulcata* iz različnih lokacij so bili okuženi z rikecijami, ki so imele v 98,7 % podoben gen *ompA*. Gen *ompA* rikecije iz klopa vrste *Hae. sulcata* in nove rikecije, ki smo jo gojili na komarjevih celicah C6/36, je bil podoben v 99,8 %. Gen *ompA* nove rikecije ter bakterije

Candidatus R. hoogstraalii iz kloпов vrste *C. capensis*, je bil podoben v 99,3 %. Primerjava nukleotidnega zaporedja gena *ompA* (80,2 do 87,5 %; primerjava samo z rikecijami iz skupine SFG), gena za 17kDa protein (84,5 do 97,1 %), gena *gltA* (86,5 do 97,2 %) in gena za 16S rRNK (98,3 do 99,7 %) nove rikecije z ostalimi uradno priznanimi vrstami rikecij iz skupine SFG in TG je pokazala podano podobnost. S filogenetsko analizo smo potrdili, da je nova rikecija nova vrsta znotraj skupine SFG rikecij. Uvrščamo jo skupaj z bakterijo *R. felis* oziroma v vejo med *R. felis* in ostale rikecije iz skupine SFG.

Podajamo opis nove vrste rikecije, *R. hoogstraalii*, kot je predstavljen v mednarodni reviji *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Opis rikecije *Rickettsia hoogstraalii* sp.nov.

Rickettsia hoogstraalii (hoog.straal'i.i N.L. gen.masc. n. *hoogstraalii*, po Hoogstraal, imenovano v čast Dr. Harry Hoogstraalu, ki je prispeval veliko znanja o klopih).

Rickettsia hoogstraalii je obvezna znotrajcelična bakterija, ki raste na celični liniji komarjevih celic C6/36 pri temperaturi 26°C, v okolju brez CO₂. Celicam smo za rast dodali sterilno gojišče Leibovitz 15 Glutamax, obogateno s 5 % telečjim serumom. Mattila in sod. (2007) so jo uspešno vzgojili tudi na klopi celični liniji CCE3 in ISE6 pri temperaturi 32–34°C. Morfologija *R. hoogstraalii* je značilna za rikecije iz skupine SFG. Gram negativno celično steno in plazmalemo ločuje periplazemski prostor, ki smo ga opisali (identificirali) s transmisijsko elektronsko mikroskopijo. Rikecije v okuženih komarjevih celicah, pobarvanih z metodo Diff-Quick, izgledajo kot majhni, vijolično obarvani kokobacili. Rikecija je bila do zdaj izolirana samo iz dveh vrst kloпов, in sicer iz *Hae. sulcata* in *C. capensis* (Mattila in sod. 2007). *Rickettsia hoogstraalii* kaže citopatski učinek na celicah C6/36, CCE3 in IJS6. Bakterija *R. hoogstraalii* je geografsko široko razširjena, saj so jo dokazali na Hrvaškem, v Španiji in v ZDA (Duh in sod. 2006, Mattila in sod. 2007 in Portillo in sod. 2008). Zaporedja genov za 16S rRNK, 17 kDa, *gltA*, *rOmpA* in *rOmpB* proteine so potrdila, da je *R. hoogstraalii* nova vrsta iz skupine SFG. Znotraj skupine SFG je najbolj sorodna humani patogeni bakteriji *R. felis* (Duh in sod. 2006; Gračner in sod. 2009).

Prototip bakterije *R. hoogstraalii* je sev Croatica, ki smo ga izolirali iz kloпов *Hae. sulcata*, nabranih leta 2000 na Hrvaškem. Bakterija *Rickettsia hoogstraalii*, sev Croatica, je dostopna v dveh neodvisnih zbirkah kultur v dveh državah: DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany (identifikacijska številka DSM 22243) in zbirka UTMB – Galveston, Texas, ZDA (identifikacijska številka UTMB00003).

6.2 SUMMARY

Rickettsia hoogstraalii, the proposed new species of rickettsiae, was first described in 2006 when research provided evidence for the existence of this species of rickettsiae in *Haemaphysalis sulcata* ticks collected from sheep and goats in the Dalmatia in Croatia (Duh et al. 2006). The rickettsiae were partly described by means of molecular identification. *Haemaphysalis sulcata* ticks were also collected in 2002, 2006 and 2007. The ticks would always harbour a high level of infection with the new rickettsiae, a level of approximately 22.8 %. For the purposes of the thesis we successfully isolated the new rickettsiae on a cell line of a mosquito's C6/36 cells at the temperature of 26 degrees Celsius, in an environment free of carbon dioxide (CO₂). It took the new rickettsiae 15 days to infect 80 to 90 % of the mosquito's C6/36 cells. The 14th day of the third cell passage brought us a pure isolate of the new rickettsiae. Using the isolate of the new rickettsiae, we prepared an antigen of the new rickettsiae. We proved that it reacts strongly to the antibodies in the serum of a patient infected with *R. conori*. Observing the ultrastructure of the new rickettsiae by electron microscopy, we presented the typical morphology of SFG rickettsiae, their phagocytosis, their formation of pseudopodia, binary fission and disintegration of the ticks's cell. We proved the presence of rickettsiae in the cytosol of endothelial cells located in the middle intestine and in the cytoplasm of the mosquito's cells. The pathogenic nature of the new rickettsiae was tested on test animals, C3H/HeN and Balb/C mice. The new rickettsiae are not highly pathogenic and only cause a mild bout of disease, or the concentration of rickettsiae in the sample that we used to infect the mice was too low and we failed to reach the LD₅₀ fatal dose, consequently enabling the mice to get better. Employing molecular methods, we successfully amplified and determined the nucleotide sequence of five rickettsial genes. The nucleotide sequences of the genes 17 kDa, *gltA*, 16S rRNA, *ompB* and *ompA* of the new rickettsiae that were isolated directly from the *Hae. sulcata* tick, are available in the gene bank under the following reference numbers: DQ081185, DQ081187, DQ081184, DQ081186 and EU816564. The nucleotide sequences of the five genes 17 kDa, *gltA*, 16S rRNA, *ompB* and *ompA* of the new rickettsiae that were cultivated in the mosquito's C6/36 cells are available in the gene bank under the following reference numbers: FJ767736, FJ767737, FJ767735, FJ767738 and EU816565. The nucleotide sequences of the rickettsial genes 17 kDa, *gltA*, 16S rRNA, *ompB* and *ompA* taken from

Hae. sulcata ticks were identical to the nucleotide sequences of these genes of the new rickettsiae that were cultivated on the mosquito's C6/36 cells and the *Candidatus R. hoogstraalii* bacteria that were isolated from *C. capensis* ticks in the USA. The nucleotide sequence of the gene *ompA* varied. *Haemaphysalis sulcata* ticks taken from the same locations were infected with rickettsiae with the identical *ompA* gene. *Haemaphysalis sulcata* ticks taken from different locations were infected with rickettsiae that had the *ompA* gene amounting to a 98,7 % similarity. The rickettsial *ompA* gene from the *Hae. sulcata* tick and from the new rickettsiae that were cultivated on the mosquito's C6/36 cells, amounted to a 99,8 % similarity. The *ompA* gene of the new rickettsiae and of the new bacteria *Candidatus R. hoogstraalii* from *C. capensis* ticks amounted to a 99,3 % similarity. The comparison of the nucleotide sequences for the *ompA* gene and the gene for the 17kDa protein, the *gltA* gene and the gene for 16S rRNA of the new rickettsiae, including other officially acknowledged species of the SFG and TG groups, showed a similarity of 80,2 to 87,5 % (compared only to the SFG rickettsiae), 84,5–97,1 %, 86,5–97,2 % and 98,3–99,7 %. Phylogenetic analysis confirmed that the new rickettsiae were a new species within the group of SFG rickettsiae. It is placed together with the *R. felis* bacteria, or rather between the *R. felis* bacteria other rickettsiae from the SFG group.

We enclose the description of the new rickettsiae, *R. hoogstraalii*, as it was presented in the international journal *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Rickettsia hoogstraalii (hoog.straal'i.i N.L. gen. masc. n. *hoogstraalii* of Hoogstraal, named in honour of Dr. Harry Hoogstraal who contributed significantly to the general knowledge on ticks).

Rickettsia hoogstraalii is an obligately intracellular bacterium which can be grown in mosquito cell line C6/36 at 26°C with L-15 Leibovitz supplemented with 5 % FCS, in an environment free of carbon dioxide (CO₂). It also grows in tick CCE3 and ISE6 cell lines (Mattila et al. 2007). The morphology of *R. hoogstraalii* is typical of SFG rickettsiae. Its gram-negative cell wall and cytoplasmic membrane are separated by a narrow periplasmic space as determined by TEM. The rickettsiae-infected cells can be stained with Diff-Quik, which reveals a small coccobacillary appearance of *R. hoogstraalii*. This *Rickettsia* was so far isolated only from two species of ticks, *Haemaphysalis sulcata* and *Carios capensis* (Mattila et al. 2007). *Rickettsia hoogstraalii* showed cytopathic effect in CCE3 and ISE6 cells. *Rickettsia hoogstraalii* is geographically widely distributed, having been detected in Croatia,

Spain and Georgia, USA (Duh et al. 2006; Mattila et al. 2007; Portillo et al. 2008). The 16S rRNA, 17kDa, *gltA*, *ompA* and *ompB* gene sequence analyses indicate that *R. hoogstraalii* is a unique species different from other SFG rickettsiae. It is most closely related to *R. felis* (Duh et al. 2006; Gračner et al. 2009).

The prototype strain of *R. hoogstraalii* is strain Croatica isolated from *Hae. sulcata* ticks collected in Croatia in 2000. The prototype strain has been deposited in two recognized culture collections in two different countries: DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany (identification number DSM 22243) and UTMB collection – Galveston, Texas, USA (identification number 00003).

7 VIRI

- Aharanowitz G., Koton S., Segal, Anis E. in Green M. 1999. Epidemiological characteristics of spotted fever in Israel over 26 years. *Clinical Infectious Diseases*. 29: 1321–1322.
- Amano KI., Hatakeyama H., Okuta M., Suto T. in Mahara F. 1992. Serological studies of antigenic similarity between Japanese spotted fever rickettsiae and Weil-Felix test antigens. *J Clin Microbiol*. 30:2441–2444.
- Anacker R.L., McCaul TF, Burgdorfer W. in Gerlaf R.K. 1980. Properties of selected *Rickettsiae* of spotted fever group. *Infect Immun*. 27(2): 468–474.
- Anderson BE., MacDonald GA., Jones DC. in Regnery RL. 1990. A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near-identical sequences. *Infect Immun*. 58: 2760–2769.
- Anderson BE.. in Tzianabos T. 1989. Comparative sequence analysis of a genus – common rickettsial antigen gene. *J Bacteriol*. 171: 5199–5201.
- Andersson S.G.E. in Kurland C.G. 1998. Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol*. 6: 263–268.
- Andersson S.G.E., Zomorodipour J.O., Andersson T. Sicheritz-Ponten, Alsmark U.C.M., Podowski R.M, Nauslund A.K., Eriksson A.S., Winkler H.H. in Kurland C.G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*. 396: 113–140.
- Andersson J. in Andersson S. 1999. Genome degradation is an ongoing process in *Rickettsia*. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 1178–1191.
- Anton E., Font B., Muffoz T., Sanfeliu I. in Segura F. 2003. Clinical and laboratory characteristics of 144 patients with Mediterranean spotted fever. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 22: 126–128.

- Araki M., Takatsuka K., Kawamura J. in Kanno Y. 2002. Japanese spotted fever involving the central nervous system: two case reports and a literature review. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3874–3876.
- Audia J.P. in Winkler H.H. 2006. Study of the five *Rickettsia prowazekii* proteins annotated as ATP/ADP translocases (Tlc): only Tlc1 transports ATP/ADP, while Tlc4 and Tlc5 transport other ribonucleotides. *J Bacteriol*. 188: 6261–6268.
- Avšič-Županc T., Petrovec M., Furlan P., Kaps R., Elgh F. in Lundkvist A. 1999. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia – a 10 year survey. *Clin Infect Dis*. 28: 860–865.
- Avšič-Županc T. 2002. Rikecije. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M. in Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi.
- Azad AF. 1990. Epidemiology of murine typhus. *Annu Rev Entomol*. 35: 535–569.
- Azad AF., Sacci JB., Nelson WM., Dasch GA., Schmidtman ET. in Carl M. 1992. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 43–46.
- Azad A. in Beard C. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious Diseases*. 4: 179–186.
- Azad AF. in Radulovic S. 2003. Pathogenic rickettsiae as bioterrorism agents. *Ann. N.Y.Acad.Sci*. 990: 734–738.
- Bacellar F., Beati L., Franca A., Pocas J., Regnery R. in Filipe A. 1999. Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human disease in Portugal. *Emerging Infectious Diseases*. 5: 835–836.
- Baird R., Lloyd M., Stenos J., Ross B., Stewart R. in Dwyer B. 1992. Characterization and comparison of Australian human spotted fever group rickettsiae. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 2896–2902.

- Baird R., Stenos R., Stewart R., Hudson B., Lloyd M., Aiuto S. in Dwyer B. 1996. Genetic variation in Australian spotted fever group rickettsiae. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 1526–1530.
- Baldrige G., Burkhardt N., Simser J., Kurtti T. in Munderloh U. 2004. Sequence and expression analysis of the *ompA* gene of *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 6628–6636.
- Beati L., Finidori J., Gilot B. in Raoult D. 1992. Comparison of serologic typing, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis protein analysis, and genetic restriction fragment length polymorphism analysis for identification of rickettsiae: characterization of two new rickettsial strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 1922–1930.
- Beati L., Peter O., Burgdorfer W., Aeschlimann A. in Raoult D. 1993. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol*. 43: 521–526.
- Beati L. in Raoult D. 1993. *Rickettsia massillae* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43: 839–840.
- Beati L., Humair P., Aeschlimann A. in Raoult D. 1994. Identification of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51: 138–148.
- Beati L., Kelly PJ., Mason PR. in Raoult D. 1994a. Species-specific Balb/C mouse antibodies to rickettsiae by western blotting. *FEMS Microbiol Lett*. 119(3): 339–44.
- Beati L., Roux V., Ortuno A., Castella J., Segura Porta F. in Raoult D. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group rickettsiae isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(11): 2688–2694.
- Bell EJ. in Stoenner HG. 1960. Immunologic relationships among the spotted fever group of rickettsias determined by toxin neutralisation tests in mice with convalescent animal serums. *J Immunol*. 84: 171–182.

- Beninati T., Lo N., Noda H., Esposito F., Rizzoli A., Favia G. in Genchi C. 2002. First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9): 983–986.
- Bernabeu-Wittel M., Villanueva-Marcos J., de Alarcon-Gonzalez A. in Pachon J. 1998. Septic shock and multiorgan failure in murine typhus. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 17: 131–132.
- Berriatua E., Ziluaga I., Miguel-Virto C., Uribarren P., Juste R., Laevens S., Vandamme in Govan R.W. 2001. Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. *Journal of clinical microbiology*. 39(3). 990–994.
- Billings AN., Feng HM., Olano JP. in Walker D.H. 2001. Rickettsial infection in murine models activates an early anti-rickettsial effect mediated by NK cells and associated with production of gamma interferon. *Am J Trop Med Hyg*. 65: 52–56.
- Birg M.L., La Scola B., Roux V., Brouqui P in Raoult D. 1999. Isolation of *Rickettsia prowazekii* from blood by Shell Vial Cell Culture. *J Clin Microbiol*. 37(11):3722–3724.
- Blanc G., Ngwamidiba M., Ogata H., Fournier P-E., Claverie JM. in Raoult D. 2005. Molecular evolution of rickettsia surface antigens: evidence of positive selection. *Mol Biol Evol*. 22: 2073-2083.
- Boostrom A., Beier M., Macahuso J., Sprengar D., Hayes J., Radulovic S. in Azad A. 2002. Geographic association of *Rickettsia felis* infected opossums with human murine typhus, Texas. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 549–554.
- Bouyer D., Stenos J., Crocquet-Valdes P., Moron C., Popov V., Zavala-Velazquez J., Foil L., Stothard D., Azad A. in Walker D. 2001. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 339–347.
- Burgdorfer W., Sexton DJ., Gerlaff RK., Anacker RL. in Philip RN. 1975. *Rhipicephalus sanguineus*: vector of a new spotted fever group rickettsia in the United States. *Infect Immun*. 12(1): 205–210.

- Carl M., Dobson M. E., Ching W.M. in Dasch G.A. 1990. Characterization of the gene encoding the protective paracrystalline-surface-layer protein of *Rickettsia prowazekii*: presence of a truncated identical homolog in *R. typhi*. Proc Natl Acad Sci USA. 87: 8237–8241.
- Chen M., Fan MY., Bi DZ., Zhang JZ. in Huang YP. 1998. Detection of *Rickettsia sibirica* in ticks and small mammals collected in three different regions in China. Acta Virol. 42: 61–64.
- Ching WM., Dasch GA., Carl M. in Dobson ME. 1990. Structural analyses of the 12 kDa serotype protein antigens of typhus group rickettsiae: comparison with other S-layer proteins. Ann NY Acad Sci. 590: 334–351.
- Choi Y., Jang W., Kim J., Ryu J., Lee S., Park K., Paik H., Koh Y., Choi M. in Kim I. 2005. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. Emerging Infectious Diseases. 11: 237–244.
- Choi YJ., Lee EM., Park JM., Lee KM, Han SH., Kim JK., Lee SH., Song HJ., Choi MS., Kim IS., Park KH. in Jang WJ. 2007. Molecular detection of various rickettsiae in mites (Acari: Trombiculidae) in southern Jeolla province, Korea. Microbiol Immunol. 51: 307–312.
- Clifton D.R., Rydkina E., Freeman R.S. in Sahni S.K. 2005. NF- κ B activation during *Rickettsia rickettsii* infection of endothelial cells involves the activation of catalytic I κ B kinases IKK α and IKK β and phosphorylation-proteolysis of the inhibitor protein I κ B α . Infect Immun. 73: 155–165.
- Comer J., Tzianabos T., Flynn C., Vlahov D. in Childs J. 1999. Serologic evidence of rickettsialpox (*Rickettsia akari*) infection among intravenous drug users in inner-city Baltimore, Maryland. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 60: 894–898.
- Cutler S., Browning P. in Scott J.C. 2006. *Ornithodoros moubata*, a soft tick vector for Rickettsiae in East Africa. Ann. NY. Acad. Sci. 1078: 373–377.

- De Sousa R., Fournier EP., Santos-Silva M., Amaro F., Bacellar F. in Raoult D. 2006. Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* and two genotypes closely related to *Bartonella elizabethae*. *Ann J Trop Med Hyg.* 75: 727–731.
- Diaz-Montero C.M., Feng H-M., Crocquet-Valdes P.A. in Walker D.H. 2001. Identification of protective components of two major outer membrane proteins of spotted fever group rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg.* 65(4): 371–378.
- Dolinsek J. 2002. Določitev nukleotidnega zaporedja gena za protein rOmpA neznane bakterije iz rodu *Rickettsia*. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Biokemija.
- Duh D., Petrovec M., Trilar T., Punda-Polić V., Bradarić N., Klismanić in Avšič-Županc T. 2003. A follow-up study on newly recognized spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Ann N Y Acad Sci.* 990: 149-151.
- Duh D., Punda-Polić V., Trilar T., Petrovec M., Bradarić N. in Avšič-Županc T. 2006. Molecular identification of *Rickettsia felis*-like bacteria in *Haemaphysalis sulcata* ticks collected from domestic animals in southern Croatia. *NYAS.* 1078:437–51.
- Dumler JS., Barbet AF., Bekker CPJ., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. in Rurangirwa F.R. 2001. Reorganisation of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 2145–2165.
- Emelyanov V. 2003. Mitochondrial connection to the origin of the eucaryotic cell. *European Journal of Biochemistry.* 270: 1599–1618.
- Eremeeva M., Yu X. in Raoult D. 1994. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J Clin Microbiol.* 32: 803–810.

- Espejo E., Fant B., Bella F. in Segura F. 1983. Climatic factors in resurgence of Mediterranean spotted fever. *Lancet*. 7: 19–33.
- Estrada-Pena A., Bovattour A., Camicas J.L. in Walker A.R. 2004. A guide to identification of species: Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. University of Zaragoza, Spain.
- Fang R. in Raoult D. 2003. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10: 221–228.
- Farhang-Azad AF., Traub S. in Bagar S. 1985. Transovarial transmission of murine typhus rickettsiae in *Xenopsylla cheopis* fleas. *Science*. 227: 543–545.
- Feng H.M., Wen J. in Walker D.H. 1993. *Rickettsia australis* infection: a murine model of a highly invasive vasculopathic rickettsiosis. *Am J Pathol*. 142: 1471–1482.
- Fernandez-Soto P., Encinas-Grandes A. in Perez-Sanchez R. 2003. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 889–890.
- Fournier E-P., Roux V. in Raoult D. 1998. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol*. 48: 839–849.
- Fournier PE., Beytout J. in Raoult D. 1999. Tick-transmitted infections in transvaal: Consider *Rickettsia africae*. *Emerging Infectious Diseases*. 5(1): 178–181.
- Fournier P., Grunnenberger F., Jaulhae B., Gastinger G. in Raoult D. 2000. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerging Infectious Diseases*. 6: 389–391.
- Fournier P., Fujita H., Takada N. in Raoult D. 2002. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 2176–2181.
- Fournier EP., Dumler J., Greub G., Zhang J., Wu Y. in Raoult D. 2003. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp.nov. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 5456–5465.

- Fournier EP., Zhu Y., Ogata H. in Raoult D. 2004. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. J Clin Microbiol. 42: 5757–5766.
- Fournier P., Takada N., Fujita H. in Raoult D. 2006. *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 1673–1675.
- Fournier E-P. in Raoult D. 2007. Rickettsia and human rickettsiosis. Bacteriology, taxonomy and phylogeny of Rickettsia. V. Rickettsial diseases. Raoult D. and Parola P. (ur.). NY: 1–13.
- Fox J.E., Wisotzkey J.D. in Jurtschuk P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int J Syst Bacteriol. 42: 166–170.
- Fuentes L. 1986. Ecological study of Rocky Mountain spotted fever in Costa Rica. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 35: 192–196.
- Galvao M., Dumler J., Mafra C., Calic S., Chamone C., Filho G., Olano J. in Walker D. 2003. Fatal spotted fever rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 9: 1402–1404.
- Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackbrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L. in Swings J. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. Nat Rev Microbiol. 3: 733–739.
- Giammanco G., Mansueto S., Ammatuna P. in Vitale G. 2003. Israeli spotted fever Rickettsia in Sicilian *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Emerging Infectious Diseases. 9: 892–893.
- Gilmore RD. 1993. Comparison of the *ompA* gene repeat regions of Rickettsiae reveals species-specific arrangement of individual repeating units. Gene. 125: 97–102.
- Gimenez DF. 1964. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. Stain-Technol. 39: 135–140.

- Goldwasser RA., Steiman Y., Klingberg W., Swartz TA. in Klingberg MA. 1974. The isolation of strains of rickettsiae of the spotted fever group in Israel and their differentiation from other members of the group by immunofluorescence methods. *Scand J Infect Dis.* 6: 53–62.
- Gouin E., Egile C., Dehoux P., Villiers V., Adams J., Gertler F., Li R. in Cossart P. 2004. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature.* 427: 457–461.
- Gračner M., Avšič-Županc T., Punda-Polić V., Dolinšek J., Bouyer D., Walker D.H., Zavala-Castro J. E., Bradarić N., Crocquet-Valdes P.A. in Duh D. 2009. Comparative *ompA* gene sequence analysis of *Rickettsia felis*-like bacteria detected in *Haemaphysalis sulcata* ticks and isolated in mosquito C6/36 cell line. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Mar 13. [Epub ahead of print]
- Graves S. in Stenos J. 2003. *Rickettsia honei* a spotted fever group rickettsia on three continents. *Annals of the New York Academy of Science.* 990: 62–66.
- Graves S., Unsworth N. in Stenos J. 2006. Rickettsioses in Australia. *Annals of the New York Academy of Science.* 1078: 74–79.
- Harris RL. 1986. Boutonneuse fever in American travelers. *J Infect Dis.* 153: 126–127.
- Harrison P. in Gerstein M. 2002. Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution. *Journal of Molecular Evolution.* 318: 1155–1174.
- Hayes SF., Burgdorfer W. in Aeschlimann A. 1980. Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infect Immun.* 27: 638–642.
- Heinzen J.A., Grieshaber S.S., Van Kirk L.S. in Devin C.J. 1999. Dynamics of actin-based movement by *Rickettsia rickettsii* in Vero cells. *Infect Immun.* 67: 4201–4207.
- Higgins J.A., Radulovic S., Schriefer M.E. in Azad A.F. 1996. *Rickettsia felis*: a New species of pathogenic rickettsia isolated from cat fleas. *Journal of clinical Microbiology.* 34(3): 671–674.

- Horta M., Labruna M., Sangioni L., Vianna M., Gennari S., Galvao M., Mafra C., Vidotto O., Schumaker T. in Walker D. 2004. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71: 93–97.
- Horta MC., Labruna MB., Durigon EL. in Schumaker TTS. 2006. Isolation of *Rickettsia felis* in the mosquito cell line C6/36. *Appl Environ Microbiol*. 72(2): 1705–1707.
- Horta MC., Chiebao DP., de Souza DB., Ferreira F., Pinheiro SR., Labruna MB. in Schumaker TTS. 2006a. Prevalence of *Rickettsia felis* in the fleas *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from two Indian villages in Sao Paulo Municipality, Brazil. *Ann NY Acad Sci*. 1089: 361–363.
- Houhamdi L., Fournier P-E., Fang R., Lepidi H. in Raoult D. 2002. An experimental model of human body louse infection with *Rickettsia prowazekii*. *J Infect Dis*. 186: 1639–1646.
- Houhamdi L., Fournier P-E., Fang R. in Raoult D. 2003. An experimental model of human body louse infection with *Rickettsia typhi*. *Ann NY Acad Sci*. 990: 617–627.
- Ishikura M., Ando S., Shinagawa Y., Matsuura H., Hasegawa S., Nakayama T., Fujita H. in Watanabe M. 2003. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae based on *gltA*, 17 kDa, and *opmA* genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. *Microbiology and Immunology*. 47: 823–832.
- Ito S. in Rikihisa Y. 1981. Techniques for electron microscopy of rickettsiae. V. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. Burgdorfer W. and Anacker RL. (ur.). Academic Press, NY: 213–240.
- Jeng R.L., Goley E.D., Dalessio J.A., Chaga O.Y., Svitkina T.M., Borisy G.G., Heinzen R.A. in Welch M.D. 2004. A *Rickettsia* WASP-like protein activates the Arp 2/3 complex and mediates actin-based motility. *Cell Microbiol*. 6: 761–769.

- Jensenius M., Fournier P., Kelly P., Myrvang B. in Raoult D. 2003. African tick bite fever. *The Lancet Infectious Diseases*. 42: 557–564.
- Jiang J., Soeatmadji DW., Henry KM., Ratiwayanto S., Bangs MJ. in Richards AL. 2006. *Rickettsia felis* in *Xenopsylla cheopis*, Java, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1281–1283.
- Kawabata H., Ando S., Kishimoto T., Kurane I., Takano A., Nogami S., Fujita H., Tsurumi M., Nakamura N., Sato F., Takahashi M., Ushijima Y., Fukunaga M. in Watanabe H. 2006. First detection of *Rickettsia* in soft-bodied ticks associated with seabirds, Japan. *Microbiol. Immunol.* 50: 403–406
- Kelly J.P., Raoult D. in Mason R.P. 1991. Isolation of spotted fever group rickettsias from triturated ticks using a modification of the centrifugation – Shell Vial technique. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 85: 397–398.
- Kelly P., Mathewman L., Beati L., Raoult D., Mason P., Dreary M. in Makombe R. 1992. African tick-bite fever: a new spotted fever group rickettsiosis under an old name. *The Lancet.* 340: 982–983.
- Kelly P., Beati L., Mason P., Mathewman L., Roux V. in Raoult D. 1996. *Rickettsia africae* sp.nov., the etiological agent of African tick bite fever. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 46: 611–614.
- Kelly P., Meads N., Theobald A., Fournier P. in Raoult D. 2004. *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae*, New Zealand. *Emerging Infectious Diseases.* 10: 967–968.
- Kelly P. 2006. *Rickettsia africae* in the West Indies. *Emerging Infectious Diseases.* 12: 224–226.
- Kollars T.M.Jr. 1996. Interspecific differences between small mammals as hosts of immature *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae) and a model for detection of high risk areas of Rocky mountain spotted fever. *J Parasitol.* 82 (5): 707–710.

- La Scola B. in Raoult D. 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnoses of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2715–2727.
- La Scola B., Meconi S., Fenollar F., Rolain J., Roux V. in Raoult D. 2002. Emended description of *Rickettsia felis*, a temperature-dependent cultured bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 2035–2041.
- Lee J., Park H., Jang W., Koh S., Kim J., Shim S., Park M., Kim Y., Kim B., Kook Y., Park K. in Lee S. 2003. Differentiation of rickettsiae by *groEL* gene analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 2952–2960.
- Lee J.H., Park H.S., Jung K.D., Jang W.J., Koh S.E., Kang S.S., Lee I.Y., Lee W.Y., Kim B.J., Kook Y.H., Park K.H. in Lee S.H. 2003a. Identification of the spotted fever group rickettsiae detected from *Haemaphysalis longicornis* in Korea. *Microbiol. Immunol.* 47: 301–304.
- Lewin M., Bouyer D., Walker D. in Musher D. 2003. *Rickettsia sibirica* infection in members of scientific expeditions to northern Asia. *The Lancet*. 362: 1201–1202.
- Li H. in Walker D.H. 1992. Characterization of rickettsial attachment to host cells by flow cytometry. *Infect Immun.* 60: 2030–5.
- Li H. in Walker D.H. 1998. rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. *Microbial Pathogenesis*. 24: 289–298.
- Mattila JT., Burkhardt NY., Hutcheson HJ., Munderloh UG. in Kurtti TJ. 2007. Isolation of cell lines and a rickettsial endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). *Journal of medical entomology*. 44(6):1091–101
- Mahara F. 1997. Japanese spotted fever: Report of 31 cases and review of the literature. *Emerging Infectious diseases*. 3 (2): 105–111.
- Martinez J.J., Seveau S., Veiga E., Matsuyama S. in Cossart P. 2005. Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell*. 123: 1013–1023.

- Martinez J.J. in Cossart P. 2004. Early signaling events involved in the entry of *Rickettsia conorii* into mammalian cells. *Cell*. 117: 5097–5106.
- Matsumoto K., Parola P., Broqui P. in Raoult D. 2004. *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma* ticks from Corsica. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 23: 732–734.
- McLeod M.P., Qin X., Karpathy S.E., Giola J., Highlander S.K., Fox G.E., McNeill T.Z., Jiang H., Muzny D., Jacob L.S., Hawes A.C., Sodergren E., Gill R., Hume J., Morgan M., Fan G., Amin A.G., Gibbs R.A., Hong C., Yu X.J., Walker D.H. in Weinstock G.M. 2004. Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other rickettsiae. *J Bacteriol*. 186: 5842–5855.
- Mediannikov OY., Parola P. in Raoult D. 2007. Other Tick-Borne Rickettsioses. V. Rickettsial diseases. Raoult D. and Parola P. (ur.). NY: 139–162.
- Medina-Sanchez A., Bouyer D.H., Alcantara-Rodriguez V., Mafra C., Zavala-Castro J., Whitworth T., Popov VL., Fernandez-Salas I. in Walker DH. 2005. Detection of a typhus group rickettsia in *Amblyomma* ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Ann NY Acad Sci*. 1063: 327–332.
- Mikačić D. 1965. Krpelji primorskog pojasa Jugoslavije. III. Rasprostranjenost i dinamika pojedinig vrsta u toku godine. *Veterinarski arhiv, knjiga XXXV, Svezak 7–8, Zagreb*.
- Ngwamidiba M., Blanc G., Ogata H., Raoult D. in Fournier PE. 2005. Phylogenetic study of *Rickettsia* species using sequences of the autotransporter protein-encoding gene *sca2*. *Ann NY Acad Sci*. 1063: 94–99.
- Ngwamidiba M., Blanc G., Raoult D. in Fournier P-E. 2006. *Sca1*, a previously undescribed paralog from autotransporter protein-encoding genes that may serve as identification and phylogenetic tool in *Rickettsia* species. *BMC Microbiol*. 6:12.
- Niebylski M., Schrumpf M., Burgdorfer W., Fischer E., Gage K. in Schwan T. 1997. *Rickettsia peacockii* sp. nov., a new species infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, in western Montana. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 446–452.

- Nillson K., Lindquist O. in Pahlson C. 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *The Lancet*. 354: 1169–1173.
- Novaković S., Morović M. in Dželalija B. 1991. Comparison of serologic methods for the diagnosis of Mediterranean Spotted Fever. *Acta Virol*. 35: 587-592.
- Ogata H., Renesto P., Audic S. 2005. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. *Plos Biol*. 3: 248.
- Ogata H., Robert C., Audic S., Robineau S., Blanc G., Fournier P.E., Renesto P., Claverie J.M. in Raoult D. 2005a. *Rickettsia felis* from culture to genome sequencing. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 1063:26–34.
- Olano J.P. 2005. Rickettsial infections. *Ann N Y Acad Sci*. 1063: 187–196.
- Oliveira R. P., Galvao M.A., Mafra C.L., Chamone C.B., Calic S.B., Silva S.U. in Walker D.H. 2002. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas. Brazil. *Emerg. Infect. Dis*. 8: 317–319.
- Oteo J., Ibarra V., Blanco J., Martinez de Artola V., Marquez F., Portillo A., Raoult D. in Anda P. 2004. Dermacentor-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. *Clinical Microbiology and Infection*. 10: 327–331.
- Paddock C., Sumner J., Comer J., Zaki S., Goldsmith C., Goddard J., McLellan S., Tamminga C. in Ohl C. 2004. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 38: 805–811.
- Parola P., Beati L., Cambon M. in Raoult D. 1998. First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 17: 95–100.
- Parola P., Inokuma H., Camicas J., Broqui P. in Raoult D. 2001. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae and ehrlichiae in African ticks. *Emerging Infectious Diseases*. 7: 1014–1017.

- Parola P. in Raoult D. 2001. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*. 32: 897–928.
- Parola P., Paddock C. in Raoult D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 719–756.
- Parola P., Davoust B. in Raoult D. 2005a. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res*. 36 (3): 469–92.
- Perez-Osorio C.E., Zavala-Velazquez J.E., Leon J.J. in Zavala-Castro J.E. 2008. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerg. Infect. Dis*. 14(7): 1019–1023.
- Philip R., Casper E., Burgdorfer W., Gerloff R., Hughes L. in Bell E. 1978. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. *Journal of Immunology*. 121: 1961–1968.
- Popov VL., Korenberg EL., Nefedova VV., Han VC., Wen JW., Kovalevskii YV., Gorelova NB. in Walker DH. 2007. Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with rickettsia, borrelia and a flavivirus. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 7: 699–716.
- Portillo A., Santibanez P., Perez-Martinez L. in Oteo J.A. 2008. Detection of *Rickettsia* spp. in *Haemaphysalis* ticks collected in La Rioja, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 8: 653–658.
- Pretorius A. in Birtles R. 2002. *Rickettsia aeschlimannii*: a new pathogenic spotted fever group rickettsia, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 874.
- Punda V., Milas I., Bradarić N., Kacic A. in Klismanic Z. 1984. Mediteranska pjegava groznica u Jugoslaviji. *Lijec. Vjesnik*. 106: 286–288.
- Punda-Polić V., Petrovec M., Trilar T., Duh D., Bradarić N., Klismanic Z. in Avšič-Županc T. 2002. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Exp. Appl. Acarol*. 28(1–4): 169–76.

- Punda-Polić V., Luksić B. in Capkun V. 2008. Epidemiological features of Mediterranean spotted fever, murine typhus and Q fever in Split-Dalmatia Country (Croatia), 1982–2002. *Epidemiol Infect.* 136(7): 972–9.
- Ramm L.E. in Winkler H.H. 1973. Rickettsial hemolysis: effect of metabolic inhibitors upon hemolysis and adsorption. *Infect Immun.* 7: 550–5.
- Ramm L.E. in Winkler H.H. 1976. Identification of cholesterol in the receptor site for rickettsiae on sheep erythrocyte membranes. *Infect Immun.* 13: 120–6.
- Radulovic S., Higgins J.A., Jaworski D.C. in Azad A.F. 1995. In vitro and in vivo antibiotic susceptibilities of ELB rickettsiae. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 39 (11): 2564–2566.
- Radulovic S., Higgins J.A., Jaworski D.C., Dasch G.A. in Azad A.F. 1995a. Isolation, cultivation and partial characterization of the ELB agent associated with cat fleas. *Infection and Immunity.* 63 (12): 4826–4829.
- Radulovic S., Feng H.M., Morovic M., Djelalija B., Popov V., Crocquet-Valdes P. in Walker D.H. 1996. Isolation of *Rickettsia akari* from a patient in a region where Mediterranean spotted fever is endemic. *Clinical Infectious Diseases.* 22: 216–20.
- Radulovic S., Price P.W., Beier M.S., Gaywee J., Macaluso J.A. in Azad A. 2002. Rickettsia-macrophage interactions: host cell responses to *Rickettsia akari* and *Rickettsia typhi*. *Infection and Immunity.* 70(5): 2576–2582.
- Raoult D., Roux V., Ndiokubwayo J., Bise G., Bandon D., Martet G. in Birtles R. 1997. Jil fever (epidemic typhus) outbreak in Burundi. *Emerging Infectious Diseases.* 3: 357–360.
- Raoult D., Berbis P., Roux V., Xu W. in Maurin M. 1997a. A new tick transmitted disease due to *Rickettsia slovaca*. *The Lancet.* 350: 112–113.
- Raoult D. in Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews.* 10: 694–719.

- Raoult D., Fournier P. E., Fenollar F., Jensenius M., Prioe T., De Pina J. J., Caruso G., Jones N., Laferl H., Rosenblatt J. E. in Marrie T. J. 2001. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. *N Engl J Med.* 344(20): 1504–1510.
- Raoult D., Fournier P., Abboud P. in Caron F. 2002. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. *Emerging Infectious Diseases.* 8: 748–749.
- Raoult D., Lakos A., Fenollar F., Beytout J., Brouqui P. in Fournier P. 2002a. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with Dermacentor ticks. *Clinical Infectious Diseases.* 34: 1331–1336.
- Raoult D. 2004. A new rickettsial disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases.* 38: 812–813.
- Raoult D., Fournier PE., Eremeeva M., Graves S., Kelly P., Oteo J., Sekeyova Z., Tamura A., Tarasevich I. in Zhang L. 2005. Naming of rickettsiae and rickettsial diseases. *Annals of the New York Academy of Science.* 1063: 1–12.
- Renesto P., Dehoux P., Gouin E., Touqui L., Cossart P. in Raoult D. 2003. Identification and characterization of a phospholipase D-super-family gene in rickettsiae. *J Infect Dis.* 188: 1276–1283.
- Renesto P., Ogata H., Andic S., Claverie J. in Raoult D. 2005. Some lessons from *Rickettsia* genomics. *FEMS Microbiology Reviews.* 29: 99–117.
- Reynolds M., Krebs J., Comer J., Sumner J., Rushton T., Lopez C., Nicholson W., Rooney J., Lance-Parker S., McQuiston J., Paddock C. in Childs J. 2003. Flying squirrel-associated typhus, United States. *Emerging Infectious Diseases.* 9: 1341–1343.
- Richter J., Fournier P., Petridou J., Haussinger D. in Raoult D. 2002. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerging Infectious Diseases.* 8: 207–208.
- Roux V., Fournier P. in Raoult D. 1996. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of

PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 2058–2065.

- Roux V., Rydkina E., Ereemeeva M. in Raoult D. 1997. Citrate syntase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis and its application for the rickettsiae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 252–261.
- Roux V. in Raoult D. 1999. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 596–599.
- Roux V. in Raoult D. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol*. 50: 1449–1455.
- Rutherford J., Macaluso K., Smith N., Zaki S., Paddock C., Davis J., Peterson N., Azad A. in Rosenberg R. 2004. Fatal spotted fever rickettsiosis, Kenya. *Emerging Infectious Diseases*. 10: 910–913.
- Rydkina E., Roux V., Fetisova N., Rudakov N., Gafarova M., Tarasevich I. in Raoult D. 1999. New rickettsiae in ticks collected in territories of the Former Soviet Union. *Emerging Infectious Diseases*. 5 (6): 811–814.
- Rydkina E., Sahni SK., Santucci LA., Turpin LC., Baggs RB. in Silverman DJ. 2004. Selective modulation of antioxidant enzyme activities in host tissues during *Rickettsia conorii* infection. *Microb Pathog*. 36: 293–301.
- Rydkina E., Sahni A., Silverman D.J. in Sahni S.K. 2007. Comparative analysis of host-cell signaling mechanisms activated in response to infection with *Rickettsia conorii* and *Rickettsia typhi*. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 896–906.
- Sahni S.K. 2007. Endothelial cell infection and hemostasis. *Thromb Res*. 119: 531–549.
- Sardelić S., Fournier PE., Punda Polić V., Bradarić N., Grgić D., Ivić I., Ledina D., Luksić S., Milas I. in Raoult D. 2003. First isolation of *Rickettsia conorii* from human blood in Croatia. *Croat.Med.J*. 44(5): 630–4.

- Satoh H., Tsuneki A., Inokuma H., Kumazawa N., Jahana Y., Kiyuuna T., Okabayashi T., Muramatsu Y., Ueno H. in Morita C. 2001. Seroprevalence of antibodies against spotted fever group rickettsia among dogs and humans in Okinawa, Japan. *Microbiology and Immunology*. 45: 85–87.
- Satoh H., Motoi Y., Camer G., Inokuma H., Izawa M., Kiyuuma T., Kumazawa N., Muramatsu Y., Ueno H. in Morita C. 2002. Characterization of spotted fever group rickettsiae detected in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiology and Immunology*. 46: 257–263.
- Schoeler G., Moron C., Richards A., Blair P. in Olson J. 2005. Human spotted fever rickettsial infections. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 622–624.
- Schriefer M., Sacci J., Dumler J., Bullen M. in Azad A. 1994. Identification of a novel rickettsial infection in a patient with murine typhus. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 949–954.
- Sekeyova Z., Roux V. in Raoult D. 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of gene *D* which encodes an intracytoplasmic protein. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51:1353–1360.
- Sexton D., King G. in Dwyer B. 1990. Fatal Queensland tick-typhus. *The Journal of Infectious Diseases*. 162: 779–780.
- Shpynov S., Fournier P., Rudakov N., Tankibaev M., Tarasevich I. in Raoult D. 2004. Detection of a rickettsia closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 2221–2223.
- Silverman D. in Wisserman C. 1978. Comparative ultrastructural study on the cell envelopes of *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infection and Immunity*. 21: 1020–1023.

- Silverman D.J. in Wisseman C.L. 1979. In vitro studies of rickettsia-host interactions: ultrastructural changes induced by *Rickettsia rickettsii* infection of chicken embryo fibroblasts. *Infect Immun.* 26: 714–727.
- Silverman D.J., Wisseman C.L. in Waddell A. 1980. In vitro studies of rickettsia-host cell interactions: ultrastructural study of *Rickettsia prowazekii*-infected chicken embryo fibroblasts. *Infect Immun.* 29: 778–790.
- Simser J., Palmer A., Munderloh U. in Kurtti T. 2001. Isolation of a spotted fever group rickettsia, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersani*, cell line. *Applied and Environmental Microbiology.* 67: 546–552.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont A.D., Kampfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C. in Whitman W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 52: 1043–1047.
- Stenos J. in Walker D. 2000. The rickettsial outer protein A and B genes of *Rickettsia australis*, the most divergent rickettsia of the spotted fever group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50: 1775–1779.
- Stenos J., Graves S. in Unsworth N. 2005. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of Spotted fever and Typhus group rickettsiae. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 73: 1083–1085.
- Stenos J., Ross B., Feng H.M., Crocquet-Valdes P. in Walker D. 1997. Protein characterization of Australian spotted fever group rickettsiae and monoclonal antibody typing of *Rickettsia honei*. *Journal of Clinical Microbiology.* 35(1): 261–263.
- Stevenson H.I., Marcelo B.L., Montenieri J.A., Kosoy M.Y., Gage K.L. in Walker D.H. 2005. Detection of *Rickettsia felis* in a new world flea species *Anomiopsyllus nudata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae). *J. Med. Entomolog.* 42(2): 163–167.

- Stewart R. 1991. Flinders island spotted fever: a newly recognised endemic focus of tick typhus in Bass Strait. Part 1. The Medical Journal of Australia. 154: 94–99.
- Strasinger S.K. 1985. Urinalysis and Body Fluids. F.A. Davis, Philadelphia.
- Tamura A., Ohashi N., Urakami H. in Miyamura S. 1995. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 45: 589–591.
- Tarasevich I.V., Makarova N.F., Fetisova N.F., Stepanov A., Miskarova E.D., Balayeva N.M. in Raoult D. 1991. Astrakhan fever: new spotted fever group rickettsiosis. Lancet. 337: 172–3.
- Tarman K. 2003. Pajkovci – Arachnida.-V: Sket B. (ur.), Gogala M. (ur.), Kuštor V. (ur.). Živalstvo Slovenije. Tehniška založba Slovenije: 161–185.
- Tartaglia P. 1939. Eksantematična krpeljna groznica-fievre boutonneuse. Glasnik Centralnog Higijenskog Zavoda. 22: 306–313.
- Telford SM. in Parola P. 2007. Arthropods and Rickettsiae. V. Rickettsial diseases. Raoult D. in Parola P. (ur.). NY: 27–36.
- Teysseire N. in Raoult D. 1992. Comparison of Western immunoblotting and microimmunofluorescence for diagnosis of Mediterranean Spotted Fever. J. Clin Microbiol. 30(2): 455–460.
- Teysseire N., Chiche-Portiche C. in Raoult D. 1992. Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* based on actin polymerization. Res Microbiol. 143: 821–829.
- Teysseire N., Boudier J. A. in Raoult D. 1995. *Rickettsia conorii* entry into Vero cells. Infection and Immunity. 63(1): 366–374.
- Traub S., Wisseman CL. in Azad AF. 1978. The ecology of murine typhus – a critical review. Trop Dis Bull. 75: 237–317.

- Trilar T. 1995. Ektoparaziti v gnezdih polha (*Glis glis*) in mestne lastovke (*Delichon urbica*) ter njihova vektorska vloga.- Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani. Ljubljana. 1–144.
- Tselentis Y. in Gikas A. 2007. Murine typhus. V. Rickettsial diseases. Raoult D. and Parola P. (ur.). NY: 37–49.
- Uchida T., Yan Y. in Kitaoka S. 1995. Detection of *Rickettsia japonica* in *Haemaphysalis longicornis* ticks by restriction fragment length polymorphism of PRC product. J Clin Microbiol. 33: 824–8.
- Uchiyama T. 2003. Adherence to and invasion of Vero cells by recombinant *Escherichia coli* expressing the outer membrane protein rOmpB of *Rickettsia japonica*. Ann NY Acad Sci. 990: 585–590.
- Valbuena G., Feng HM. in Walker DH. 2002. Mechanisms of immunity against rickettsiae: new perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasite. Microbes Infect. 4 : 625–633.
- Van Kirk L.S., Hayes S.F. in Heinzen R.A. 2000. Ultrastructure of *Rickettsia rickettsii* actin tails and localization of cytoskeletal proteins. Infect Immun. 68: 4706–4713.
- Viswarath S. 1991. Antigenic relationships among the rickettsiae of the spotted fever and typhus group. FEMS Microbiol Lett. 65: 341–344.
- Vitale G., Mansueto S., Rolain J. in Raoult D. 2005. *Rickettsia massiliae* human isolation. Emerging Infectious Diseases. 12: 174–175.
- Walker DH., Popov VL., Wen J. in Feng HM. 1994. *Rickettsia conorii* infection of C3H/HeN mice. A model of endothelial-target rickettsiosis. Lab Invest. 70(3): 358–68.
- Walker D.H., Feng H.M. in Popov-Vsevolod L. 2001. Rickettsial phospholipase A2, as a pathogenic mechanism in a model of cell injury by typhus and spotted fever group rickettsiae. Am J Trop Med Hyg. 65(6): 936–942.
- Walker DH. 2003. Principles of the malicious use of infectious agents to create terror. Ann.N.Y.Acad.Sci. 990: 739–742.

- Walker D. 2004. Ricketts creates rickettsiology, the study of vector-borne obligately intracellular bacteria. *Journal of infectious diseases*. 189: 938–942.
- Walker D., Ismail N., Olano JP., Valbuena G. in McBride J. 2007. Pathogenesis, immunity, pathology and pathophysiology in rickettsial diseases. V. *Rickettsial diseases*. Raoult D. and Parola P. (ur.). NY:15–26.
- Walker DH. in Ismail N. 2008. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nature Rev Microbiology*, May 6: 375.
- Weisburg W., Woese C., Dobson M. in Weiss E. 1985. A common origin of rickettsiae and certain plant pathogens. *Science*. 230: 556–558.
- Weisburg W.G., Dobson M.E., Samuel J.E., Dasch G.A., Mallavia L.P., Baca O., Mandelco L., Sechrest J.E., Weiss E. in Woese C.R. 1989. Phylogenetic diversity of the rickettsiae. *J Bacteriol*. 171: 4202–4206.
- Weiss E. 1988. History of rickettsiology.- V: DH Walker ed. *Biology of rickettsial diseases*, Vol 1. CRC Press, Inc., Boca Raton: 15–32.
- Weiss K. 1988. The role of rickettsioses in history.- V: DH Walker ed. *Biology of rickettsial diseases*, Vol 1. CRC Press, Inc., Boca Raton: 1–14.
- Weller S.J., Baldrige G.D., Munderloh U.G., Noda H., Simser J. in Kurtti T.J. 1998. Phylogenetic placement of rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (5): 1305–1317.
- Whitworth T., Popov-Vsevolod L., Yu X.J., Walker D.H. in Bouyer D.H. 2005. Expression of the *Rickettsia prowazekii* pld or tly C gene in *Salmonella enterica* serovar typhimurium mediates phagosomal escape. *Infection and Immunity*. 73 (10): 6668–6673.
- Williams S., Sacci J., Schriefer M., Anderson E., Fujioka K., Sorvillo F., Barr R. in Azad A. 1992. Typhus and typhus-like rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles Country, California. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 1758–1762.

- Wilson K., Blitchington R. in Greene R. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 1942–1946.
- Wilson J., Schurr M., Le Blanc C., Ramamurthy R., Buchanan K. in Nickerson C. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal*. 78: 216–224.
- Winkler H. 1990. *Rickettsia* species (as organisms). *Annual Review of Microbiology*. 44: 131–153.
- Wood D. in Azad F. 2000. Genetic manipulation of rickettsiae: a preview. *Infection and Immunity*. 68: 6091–6093.
- Xu W., Beati L. in Raoult D. 1997. Characterization and application of monoclonal antibodies against *Rickettsia africae*, a newly recognized species of spotted fever group rickettsia. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 64–70.
- Xu W. in Raoult D. 1998. Taxonomic relationships among spotted fever group rickettsiae as revealed by antigenic analysis with monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 887–896.
- Yano Y., Fujita H. in Takada N. 2004. Ultrastructure of a Japanese rickettsial strain genetically identified as *Rickettsia helvetica* which was originally found in Europe. *Microbiology and Immunology*. 48: 535–539.
- Yoshiie K., Kim H.Y., Mott J. in Rikihisa Y. 2000. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. *Infect Immun*. 68: 1125–1133.
- Zavala-Castro JE., Small M., Keng C., Bouyer DH., Zavala-Velazquez J. in Walker DH. 2005. Transcription of the *Rickettsia felis ompA* gene in naturally infected fleas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 73(4):662–6.
- Zavala-Velazquez J., Ruiz-Sosu J., Sanchez-Elias R., Becerra-Carmona G. in Walker D. 2000. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yukatan. *The Lancet*. 356: 1079–1080.

- Zhang J., Fan M., Wu Y., Fournier P., Roux V. in Raoult D. 2000. Genetic classification of *Rickettsia heilongjiangii* and *Rickettsia hulinii*, two Chinese spotted fever group rickettsiae. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3498–3501.
- Zhu Y., Fournier PE., Ogata H. in Raoult D. 2005. Multispacer typing of *Rickettsia prowazekii* enabling epidemiological studies of epidemic typhus. *J Clin Microbiol*. 43: 4708–4712.

ZAHVALA

Zahvaljujem se moji mentorici, znan. sod. dr. Darji Duh, ker me je z veliko potrpežljivosti naučila veliko o mikrobiološkem svetu. Zahvaljujem se ji za pomoč na terenu, nasvete in popravke.

Hvala dr. Tomiju Trilarju, ker me je navdušil za delo s klopi in ostalimi paraziti. Hvala za pomoč na terenu in pri identifikaciji klopov. Hvala za vse napotke, popravke in ideje.

Prof. dr. Tatjani Avšič Županc se zahvaljujem, ker mi je omogočila, da sem mikrobiološki del eksperimentalnega dela naloge opravila v laboratoriju na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Hvala za vse nasvete in popravke.

Zahvaljujem se tudi Mateji Jelovšek in Miši Korva iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo za pomoč na terenu in v laboratoriju.

Prof. dr. Jasni Štrus se zahvaljujem, ker mi je omogočila, da sem transmisijsko elektronsko mikroskopijo opravila na Biotehniški fakulteti, na oddelku za biologijo. Hvala tudi za vsa navodila, nasvete in popravke. Hvala Magdi Tušek Žnidarič za veliko potrpežljivost in pomoč pri učenju elektronskega mikroskopiranja.

Zahvaljujem se prof. dr. Davidu Walkerju in dr. Vladimirju Popovu za pomoč pri izvedbi transmisijske elektronske mikroskopije in izvedbo testov patogenosti na University of Texas Medical Branch, Galveston, ZDA.

Zahvaljujem se dr. Eleni Kocianovi in dr. Mirku Slovaku za učenje seciranja klopov na oddelku za virologijo in zoologijo v Bratislavi, Slovaška.

Dr. Donaldu Boueryu in dr. Davidu Walkerju iz University of Texas Medical Branch, Galveston, ZDA se zahvaljujem za sprejetje izolata *Rickettsia hoogstraalii* sev Croatica v njihovo zbirko.

Dr. Sabine Gronow se zahvaljujem za sprejetje izolata *Rickettsia hoogstraalii* sev Croatica v njihovo zbirko v Nemčiji.

Za pomoč na terenu se zahvaljujem še prof. dr. Nikoli Bradariću in prof. dr. Volgi Punda Polić iz Medicinske fakultete v Splitu, prof. dr. Borisu Djelaliju iz Medicinske fakultete v Zadru, veterinarjem iz veterinarskih postaj območij Zadar in Split in vsem domačinom iz kmetij Zadarskega in Splitskega območja. Hvala tudi Martini Ploj za pomoč na terenu.

Griši Planincu in Mariji Kuljerić se zahvaljujem za posredovane podatke o plazilcih na območju Dalmacije.

Še posebej pa se zahvaljujem staršem in sestri, ki že vseskozi potujejo z mano.

Brez vas vseh, me ne bi bilo tukaj!



...hvala tudi vsem klopom, ki so se nasesali na ovce in bili rezervoarji/prenašalci nove vrste rikecije ☺

PRILOGE

PRILOGA A

Priloga A : Podatki o gostiteljih in zunanjih zajedalcih nabranih v Splitu leta 2006 (oktober)

ID	Vrsta zunanjega zajedalca na gostiteljih a, b,c ..	Število in stadij	Vrsta gostitelja	Lokaliteta	Datum
660	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	11♀9♂	koza	HR: Ercegovci, Dicmo	18.10.2006
661	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Haemaphysalis sulcata</i>	25♀27♂ 1♂	ovca ovca	HR: Krušvar, Dicmo HR: Krušvar, Dicmo	18.10.2006 18.10.2006
661	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	2Ny	vegetacija	HR: Krušvar, Dicmo	18.10.2006
662	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	9♀16♂	ovca	HR: Sinj, Gala	18.10.2006
663	brez	-	ovca	HR: Sinj, Glavice	18.10.2006
664	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	33♀36♂	ovca	HR: Muč, Neorič	19.10.2006
664	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀4Ny	vegetacija	HR: Muč, Neorič	19.10.2006
665	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Dermacentor marginatus</i>	24♀32♂ 2♂	ovca ovca	HR: Muč Donji HR: Muč Donji	19.10.2006 19.10.2006
665	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	vegetacija	HR: Muč Donji	19.10.2006
666	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	16♀5♂	ovca	HR: Muč, Bidnič	19.10.2006
667	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	10♀9♂	ovca	HR: Lečenica, Dugobabe	19.10.2006

PRILOGA B

Priloga B: Podatki o gostiteljih in zunanjih zajedalcih nabranih v Zadru leta 2007 (april)

ID	Vrsta zunanjega zajedavca na gostiteljih a,b,c ...	Število in stadij	Vrsta gostitelja	Namestitev klopa na gostitelju	Lokaliteta	Atlas *	Datum	Lastnik kmetije
1	a) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♂1♀	ovca	trebuh	ZD,Murvica Gornja	137-A1	17.4.07	Marija Pastovič
2	a) <i>Rhipicephalus bursa</i>	2♂	ovca	trebuh	ZD,Murvica Gornja	137-A1	17.4.07	Marija Pastovič
3	brez		ovca	trebuh	ZD,Murvica Gornja	137-A1	17.4.07	Marija Pastovič
4	a) <i>Rhipicephalus bursa</i>	2♂2♀	ovca	trebuh	ZD,Murvica Gornja	137-A1	17.4.07	Marija Pastovič
5	a) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♀	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
	b) <i>Ixodes gibbosus</i>	1♀	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2		
	c) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂3♀	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2		
6	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	oven	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
	b) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♂3♀	oven	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2		
7	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♀	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
8	a) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♂	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
	b) <i>Ixodes gibbosus</i>	1♀	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2		
	c) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2		
9	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♂	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
	b) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♂	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2		
	c) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♂	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2		
10	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♂3♀1Ny	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
	b) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2		
11	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂1♀	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
12	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♂1♀1Ny	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
13	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♂4♀	ovca	trebuh, uho	ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
14	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	5Ny	ovca	trebuh, uho	Nin, Poljica	137-A1	17.4.07	Šime Beram
	b) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♂	ovca	trebuh, uho	Nin, Poljica	137-A1		
15	a) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♂	ovca	trebuh, uho	Nin, Poljica	137-A1	17.4.07	Šime Beram
	b) <i>Haemaphysalis punctata</i>	4Ny	ovca	trebuh, uho	Nin, Poljica	137-A1		
16	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	5Ny	ovca	trebuh, uho	Nin, Poljica	137-A1	17.4.07	Šime Beram

17	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Ixodes gibbosus</i>	2Ny 1♀	ovca ovca	trebuh, uho trebuh, uho	Nin, Poljica Nin, Poljica	137-A1 137-A1	17.4.07	Šime Beram
18	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂	ovca	povsod	Nin, Poljica	137-A1	17.4.07	Šime Beram
19	a) <i>Rhipicephalus bursa</i> b) <i>Haemaphysalis sulcata</i> c) <i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂2♀ 1♂ 23♂3♀1Ny	ovca ovca ovca	povsod povsod povsod	Nin, Poljica Nin, Poljica Nin, Poljica	137-A1 137-A1 137-A1	17.4.07	Šime Beram
20	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Ixodes gibbosus</i> c) <i>Rhipicephalus bursa</i>	29♂1♀ 1♀ 1♂	ovca ovca ovca	povsod povsod povsod	Nin, Poljica Nin, Poljica Nin, Poljica	137-A1 137-A1 137-A1	17.4.07	Šime Beram
21	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	4Ny	ovca	povsod	Nin, Poljica	137-A1	17.4.07	Šime Beram
22	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	3♀1♂	ovca	povsod	Nin, Poljica	137-A1	17.4.07	Šime Beram
23	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♂3Ny 1♀	vegetacija vegetacija		ZD, Žodani ZD, Žodani	137-A2 137-A2	17.4.07	Veterinarska postaja Zadar
24	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	5♂2♀1Ny	ovca	trebuh, rep	ZD, Murvica Donja	137-A1	18.4.07	Romano Surač
25	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i> b) <i>Haemaphysalis punctata</i> c) <i>Haemaphysalis sulcata</i>	2♂2♀ 3♂1♀ 1♂	ovca ovca ovca	trebuh, rep trebuh, rep trebuh, rep	ZD, Murvica Donja ZD, Murvica Donja ZD, Murvica Donja	137-A1 137-A1 137-A1	18.4.07	Romano Surač
26	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♂1♀	ovca	trebuh, rep	ZD, Murvica Donja	137-A1	18.4.07	Romano Surač
27	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i> b) <i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂2♀ 5♂2♀	ovca ovca	trebuh, rep trebuh, rep	ZD, Murvica Donja ZD, Murvica Donja	137-A1 137-A1	18.4.07	Romano Surač
28	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i> b) <i>Haemaphysalis punctata</i>	3♀1♂ 7♂1♀1Ny	ovca ovca	trebuh, rep trebuh, rep	ZD, Murvica Donja ZD, Murvica Donja	137-A1 137-A1	18.4.07	Romano Surač
29	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i> b) <i>Haemaphysalis punctata</i>	6♂2♀ 2♂3♀	ovca ovca	trebuh, rep trebuh, rep	ZD, Murvica Donja ZD, Murvica Donja	137-A1 137-A1	18.4.07	Romano Surač
30	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀2Ny	ovca	ušesa, vrat, rep	ZD, Briševo	137-A2	18.4.07	Zorka Jurlina
31	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♀	ovca	ušesa, vrat, rep	ZD, Briševo	137-A2	18.4.07	Zorka Jurlina
32	brez		ovca		ZD, Briševo	137-A2	18.4.07	Zorka Jurlina
33	a) <i>Rhipicephalus bursa</i> b) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♀ 1♂	ovca ovca	povsod povsod	Nin, Ninski stanovi Nin, Ninski stanovi	136-C1 136-C1	18.4.07	Rade Prorokovič
34	a) <i>Rhipicephalus bursa</i> b) <i>Haemaphysalis punctata</i> c) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♀ 1♀1Ny 1♂3♀	ovca ovca ovca	povsod povsod povsod	Nin, Ninski stanovi Nin, Ninski stanovi Nin, Ninski stanovi	136-C1 136-C1 136-C1	18.4.07	Rade Prorokovič
35	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♂1♀	ovca	povsod	Nin, Ninski stanovi	136-C1	18.4.07	Rade Prorokovič
36	a) <i>Dermacentor marginatus</i>	2♀	ovca	povsod	Nin, Ninski stanovi	136-C1	18.4.07	

	b) <i>Rhipicephalus turanicus</i> c) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀ 1♂	ovca ovca	povsod povsod	Nin,Ninski stanovi Nin,Ninski stanovi	136-C1 136-C1		
37	a) <i>Rhipicephalus bursa</i> b) <i>Haemaphysalis punctata</i> c) <i>Rhipicephalis turanicus</i>	1♀ 1♀ 3♀4Ny	ovca ovca ovca	povsod povsod povsod	Nin,Ninski stanovi Nin,Ninski stanovi Nin,Ninski stanovi	136-C1 136-C1 136-C1	18.4.07	Rade Prorokovič
38	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♂3♀	ovca	povsod	Nin,Ninski stanovi	136-C1	18.4.07	Rade Prorokovič
39	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i> b) <i>Haemaphysalis punctata</i> c) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♂ 1♀ 1♀	ovca ovca ovca	povsod povsod povsod	Nin,Ninski stanovi Nin,Ninski stanovi Nin,Ninski stanovi	136-C1 136-C1 136-C1	18.4.07	Rade Prorokovič
40	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂1♀	ovca	povsod	Nin,Ninski stanovi	136-C1	18.4.07	Rade Prorokovič
41	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Rhipicephalus bursa</i>	4♂7♀ 2♂	ovca ovca	trebuh trebuh	Nin, Žerava Nin, Žerava	137-A1 137-A1	18.4.07	Nikda Beram
42	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Rhipicephalus bursa</i> c) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂1♀ 4♂ 1♀	ovca ovca ovca	trebuh trebuh trebuh	Nin, Žerava Nin, Žerava Nin, Žerava	137-A1 137-A1 137-A1	18.4.07	Nikda Beram
43	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	3♂1♀	ovca	trebuh	Nin, Žerava	137-A1	18.4.07	Nikda Beram
44	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Rhipicephalus bursa</i> c) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂5♀1Ny 2♂1♀ 2♀	ovca ovca ovca	glava, trebuh glava, trebuh glava, trebuh	Nin, Žerava Nin, Žerava Nin, Žerava	137-A1 137-A1 137-A1	18.4.07	Nikda Beram
45	a) <i>Dermacentor marginatus</i> b) <i>Rhipicephalus bursa</i> c) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀ 1♂1♀ 2♀	ovca ovca ovca	glava, trebuh glava, trebuh glava, trebuh	Nin, Žerava Nin, Žerava Nin, Žerava	137-A1 137-A1 137-A1	18.4.07	Nikda Beram
46	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♂3♀ 1♂	ovca ovca	glava, trebuh glava, trebuh	Nin, Žerava Nin, Žerava	137-A1 137-A1	18.4.07	Nikda Beram
47	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Rhipicephalus bursa</i>	2♂ 1♀	ovca ovca	glava, trebuh glava, trebuh	Nin, Žerava Nin, Žerava	137-A1 137-A1	18.4.07	Nikda Beram
48	brez		vegetacija		Nin, Žerava	137-A1	18.4.07	
49	a) <i>Haemaphysalis punctata</i> b) <i>Rhipicephalus bursa</i> c) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♀ 1♀ 2♂1♀	ovca ovca ovca	uho, rep, trebuh uho, rep, trebuh uho, rep, trebuh	ZD, Briševo ZD, Briševo ZD, Briševo	137-A2 137-A2 137-A2	18.4.07	Venaj Žilič
50	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♂	ovca	uho, rep, trebuh	ZD, Briševo	137-A2	18.4.07	Venaj Žilič
51	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♀	ovca	uho, rep, trebuh	ZD, Briševo	137-A2	18.4.07	Venaj Žilič
52	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♀	ovca	povsod	ZD, Briševo	137-A2	18.4.07	Venaj Žilič
53	a) <i>Ixodes gibbosus</i>	1♀	ovca	povsod	ZD, Briševo	137-A2	18.4.07	Venaj Žilič

54	brez		ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
55	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	3♂1♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
56	a) <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1♂	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
	b) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	7♂5♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1		
57	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂2♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
58	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	3♂2♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
59	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
60	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	3♂4♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
61	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	2♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
	b) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♂	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1		
62	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	3♂4♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
63	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
	b) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀	ovca	povsod	Biograd, Sikolo	144-C1		
64	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	3♂1♀	pes		Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
65	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	5♂8♀	pes		Biograd, Sikolo	144-C1	19.4.07	Ante Sikulandra
66	a) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	21♂11♀	ovca	trebuh, ušesa	Biograd, Kakma	144-C1	19.4.07	Goran Prtenjač
67	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	ovca	trebuh, ušesa	Biograd, Kakma	144-C1	19.4.07	Goran Prtenjač
68	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀	ovca	trebuh, ušesa	Biograd, Kakma	144-C1	19.4.07	Goran Prtenjač
	b) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂	ovca	trebuh, ušesa	Biograd, Kakma	144-C1		
69	a) <i>Rhipicephalus bursa</i>	1♀	ovca	trebuh, ušesa	Biograd, Kakma	144-C1	19.4.07	Goran Prtenjač
70	a) <i>Rhipicephalus bursa</i>	2♀	ovca	trebuh, ušesa	Biograd, Kakma	144-C1	19.4.07	Goran Prtenjač
	b) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♀	ovca	trebuh, ušesa	Biograd, Kakma	144-C1		
71	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♂1♀	ovca	trebuh, ušesa	Biograd, Kakma	144-C1	19.4.07	Marko Perajič
72	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀	vegetacija		ZD, Bokanjac	136-C2	17.4.07	Ivo Mesnič
73	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	2♀1Ny	vegetacija		Nin, Ninski stanovi	136-C1	18.4.07	Rade Proroković
74	a) <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1♂	pes		ZD, Žodani	137-A2	17.4.07	Veterinarska postaja Zadar
	b) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1♂	pes			137-A2		
75	a) <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	3♂2♀	pes		ZD, Murvica Donja	137-A1	18.4.07	Romano Surač
	b) <i>Rhipicephalus turanicus</i>	3♂3♀1Ny						
76	a) <i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀2Ny	pes		ZD, Briševo	137-A2	18.4.07	Zorka Jurlina

PRILOGA C

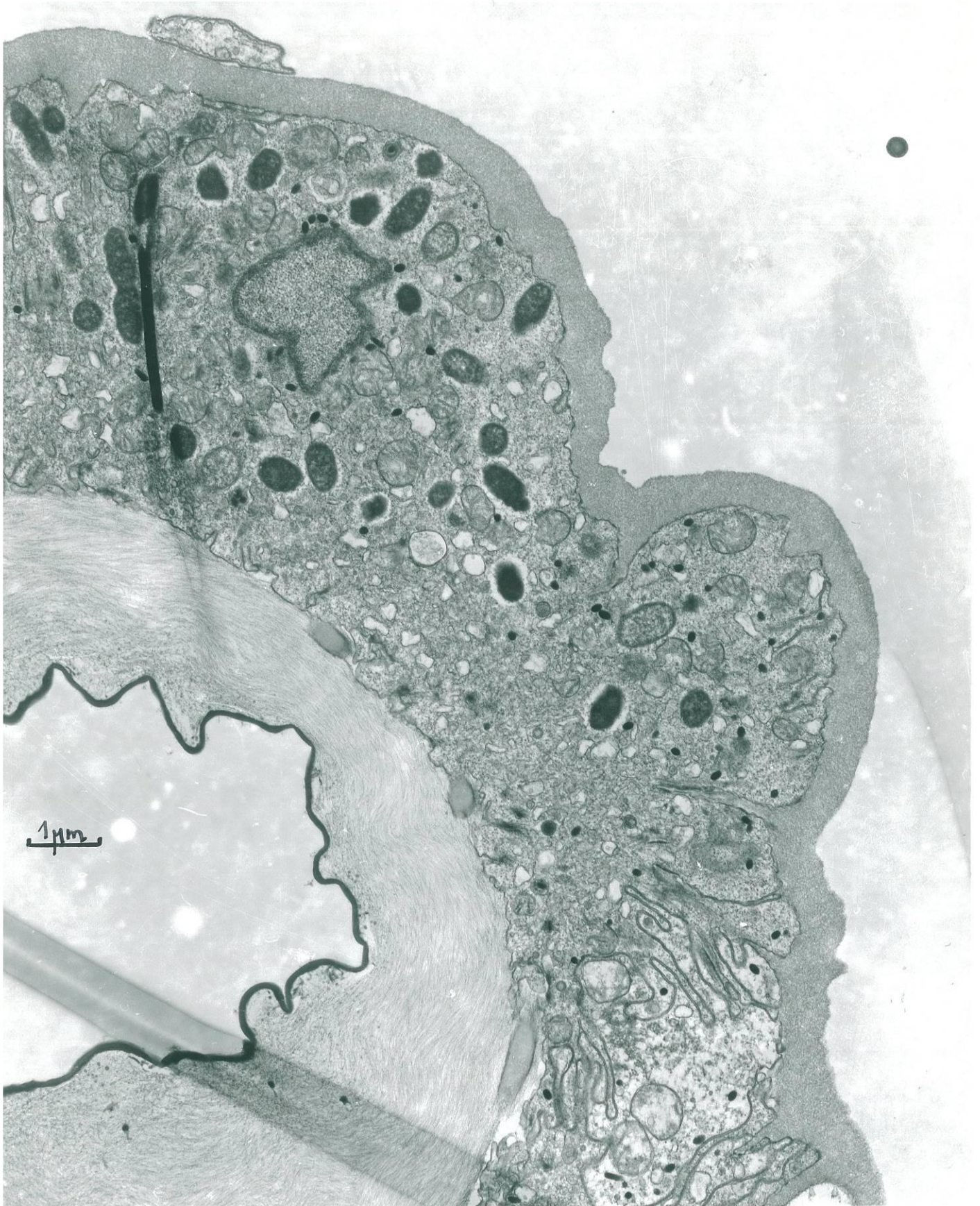
Priloga C: Podatki o gostiteljih in zunanjih zajedalcih nabranih v Splitu leta 2007 (november)

ID	Gostitelj številka	Vrsta zunanjega zajedavca	Št. in stadij	Vrsta gostitelja	Lokaliteta	Datum
408/4	671	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂2♀	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
409/19	686	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1♂2♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
410/11	678	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	ovca	Muč Gornji	26.11.2007
411/18	685	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	ovca	Gizdovac	26.11.2007
412/17	684	<i>Haemaphysalis punctata</i>	4♂5♀2Ny	ovca	Gizdovac	26.11.2007
413/31	698	<i>Haemaphysalis punctata</i>	3♂1♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
414/24	691	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007
415/5	672	<i>Haemaphysalis punctata</i>	3♂4♀3Ny	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
416/6	673	<i>Haemaphysalis punctata</i>	4♂4♀	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
417/3	670	<i>Haemaphysalis punctata</i>	8♂4♀2Ny	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
418/36	703	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1♂	ovca	Ercegovci	27.11.2007
419/32	699	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂	ovca	Ercegovci	27.11.2007
420/25	692	<i>Haemaphysalis punctata</i>	7♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007
421/39	706	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
422/30	697	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂1♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
423/1	668	<i>Haemaphysalis punctata</i>	3♂3♀	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
424/2	669	<i>Haemaphysalis punctata</i>	9♂3♀	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
425/47	714	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂4♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
426/34	701	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	ovca	Ercegovci	27.11.2007
427/15	682	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂3♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
428/44	711	<i>Haemaphysalis punctata</i>	7♂4♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
429/42	709	<i>Haemaphysalis punctata</i>	4♂2♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
430/49	716	<i>Haemaphysalis punctata</i>	6♂2♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
431/41	708	<i>Haemaphysalis punctata</i>	3♂1♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
432/23	690	<i>Haemaphysalis punctata</i>	3♂1♀1Ny	ovca	Gizdovac	26.11.2007
433/7	674	<i>Haemaphysalis punctata</i>	3Ny	ovca	Nevrić, Muć	26.11.2007
434/26	693	<i>Haempahysalis punctata</i>	2♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007

435/35	702	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1Ny	ovca	Ercegovci	27.11.2007
436/16	683	<i>Haemaphysalis punctata</i>	5♂2♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
437/8	675	<i>Haemaphysalis punctata</i>	4♂	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
438/48	715	<i>Haemaphysalis punctata</i>	4♂2♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
439/45	712	<i>Haemaphysalis punctata</i>	6♂1♀1Ny	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
440/51	718	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂1♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
441/55	722	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂3♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
442/54	721	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
443/53	720	<i>Haemaphysalis punctata</i>	3♂	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
444/43	710	<i>Haemaphysalis punctata</i>	6♂4♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
445/21	688	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
446/20	687	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007
447/52	719	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂2♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
448/33	700	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀	ovca	Ercegovci	27.11.2007
449/50	717	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂1♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
450/40	707	<i>Haemaphysalis punctata</i>	4♂1♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
451/10	677	<i>Haemaphysalis punctata</i>	4♂2♀	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
452/27	694	<i>Haemaphysalis punctata</i>	7♂5♀1Ny	ovca	Gizdovac	26.11.2007
453/9	676	<i>Haemaphysalis punctata</i>	10♂6♀	ovca	Nevrić Muć	26.11.2007
454/56	-	<i>Haemaphysalis punctata</i>	2♂2♀	vegetacija	Nevrić Muć	27.11.2007
455/46	713	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1♂2♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
456/38	705	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1♀	ovca	Krušvar, Dicmo	27.11.2007
457/23	690	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	1♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
458/22	689	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	2♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007
459/26	693	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	2♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007
460/25	692	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	2♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007
461/27	694	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	2♂1♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
462/18	685	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	2♂1♀	ovca	Gizdovac	26.11.2007
463/24	691	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	2♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007
464/13	680	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	1♀	ovca	Muć Gornji	26.11.2007
465/12	678	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	1♂	ovca	Muć Gornji	26.11.2007
466/28	695	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	1♂	ovca	Gizdovac	26.11.2007

PRILOGA Č

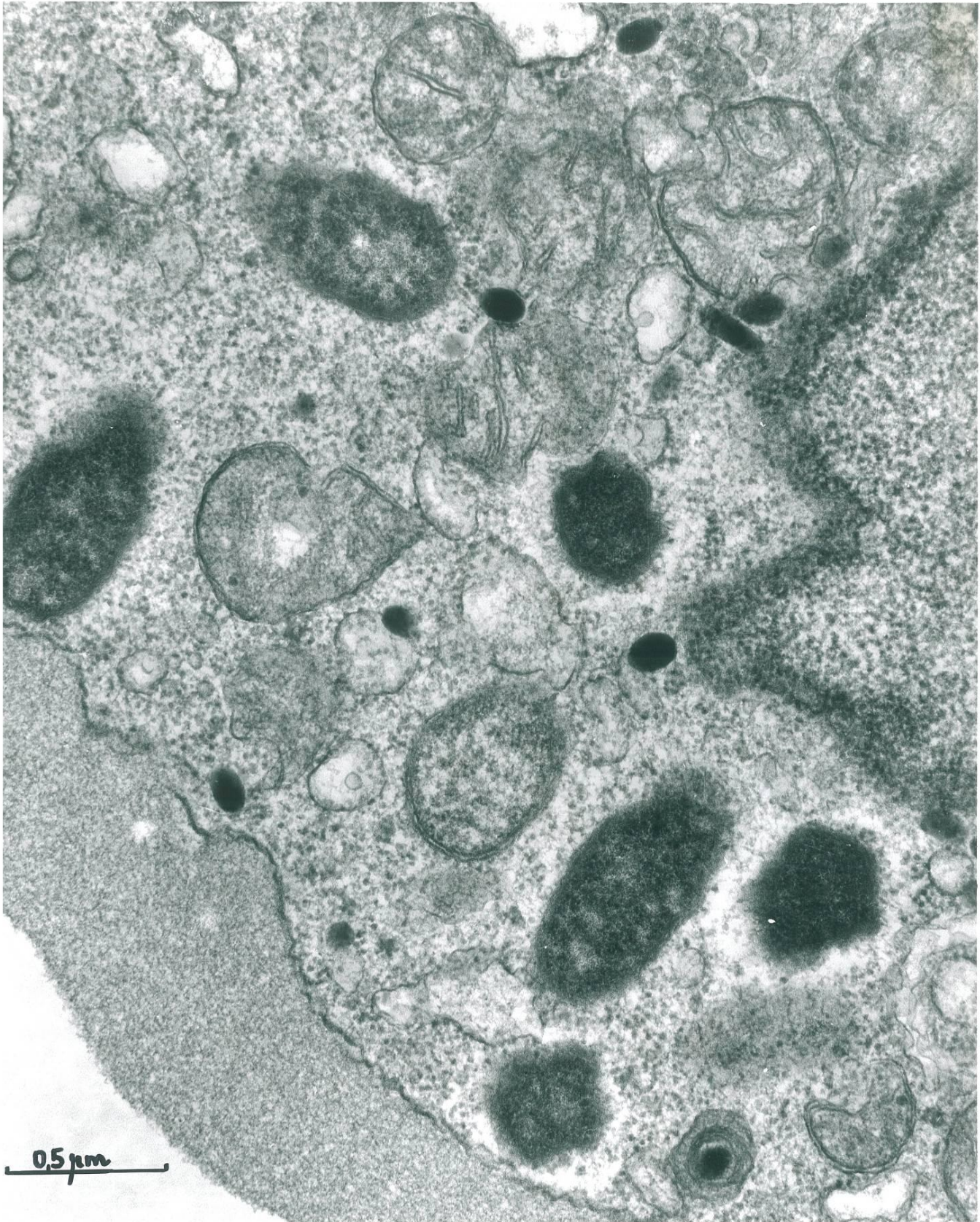
Priloga Č: Prerez žlez slinavk klopa vrste *Hae. sulcata*, okužene z novo rikecijo



REM07-810 ♀ #13 S8

#4638

x14,100



0.5µm

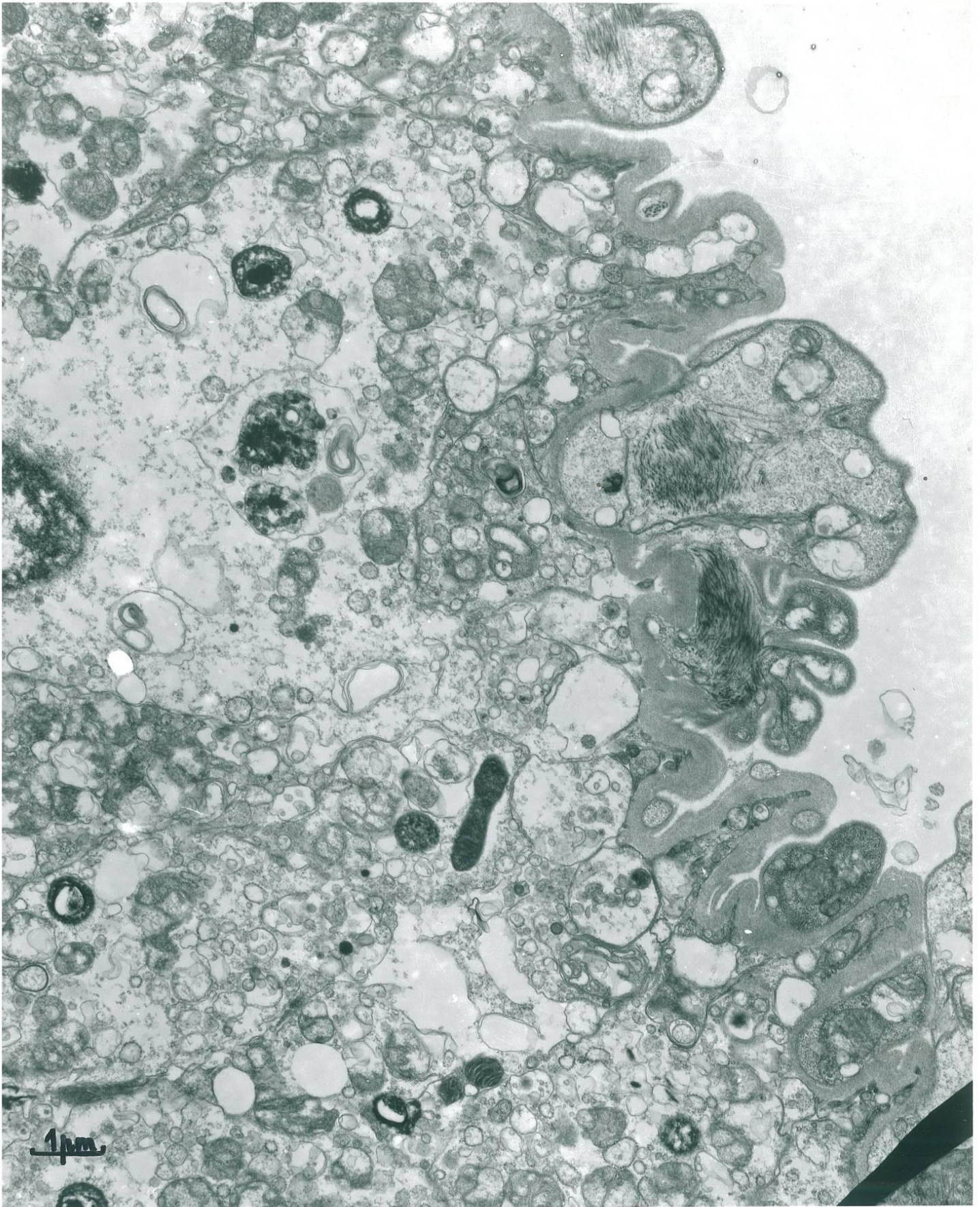
PEM07 X10 ♀ #13 S♀

#4640

x62700

PRILOGA D

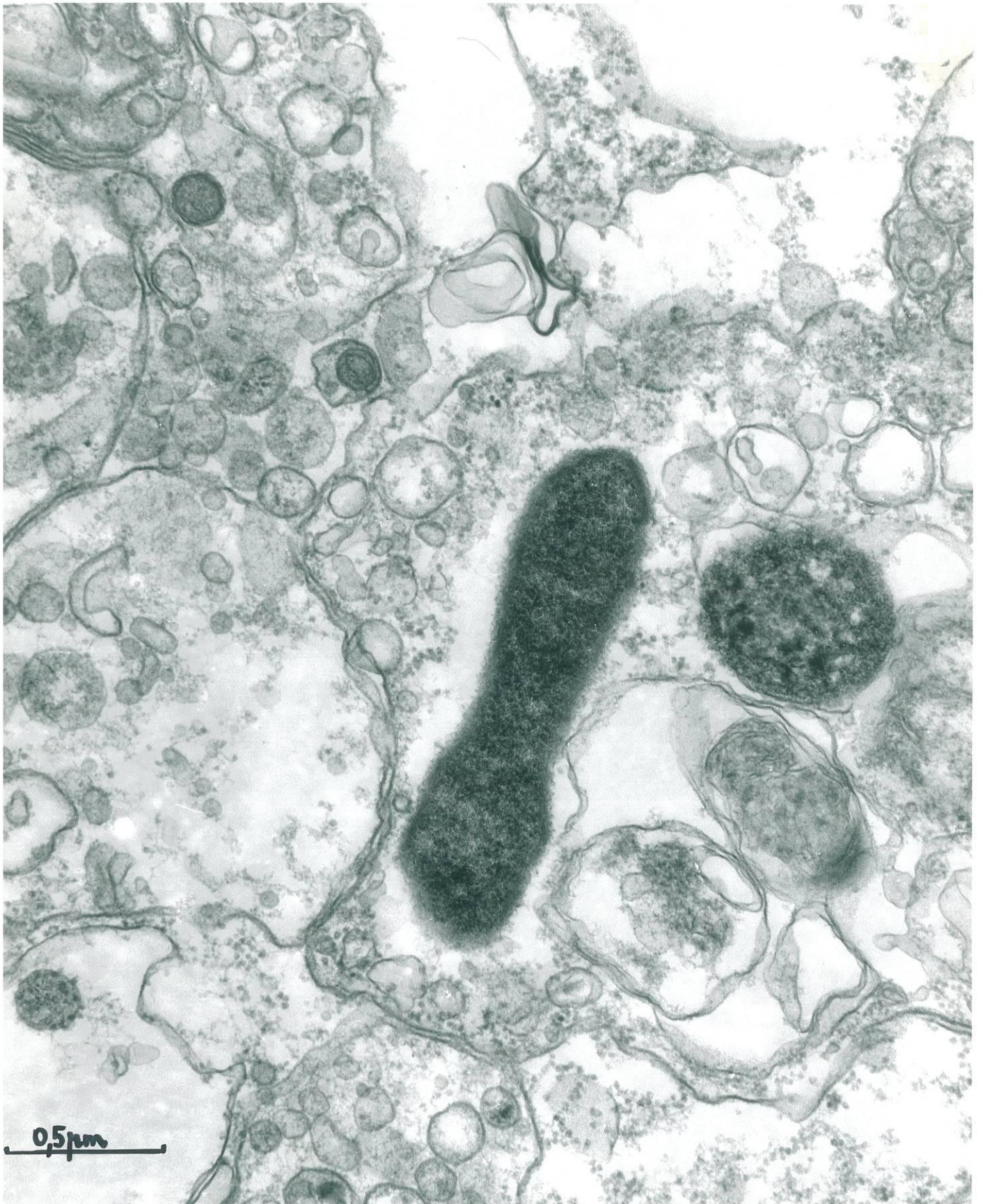
Priloga D: Prerez srednjega črevesa klopa vrste *Hae. sulcata*, okužene z novo rikecijo



REM07-811 ♀ #13 mg

#4702

x14,100



REM07-811 ♀ #13 mg

#401

x62,700

PRILOGA E

Priloga E: Potrdilo o dostopnosti izolata z identifikacijsko številko UTMB00003



SCHOOL OF MEDICINE

December 3, 2008

DAVID H. WALKER, M.D.
Professor and Chairman,
Department of Pathology
Director,
Center for Biodefense and
Emerging Infectious Diseases

Darja Duh, Ph.D.
Associate Professor
Institute of Microbiology and Immunology,
Medical Faculty, University of Ljubljana
Zaloska 4, 1000 Ljubljana,
Slovenija

Dear Dr. Duh;

This letter certifies that your isolate of *Candidatus Rickettsia hoogstraalii* has been deposited in the culture collection of the Rickettsial and Ehrlichial Diseases Research Laboratory at the World Health Organization Collaborating Center for Tropical Diseases, University of Texas Medical Branch at Galveston (U.S.A.).

With best personal regards.

Sincerely,



David H. Walker, M.D.
The Carmage and Martha Walls Distinguished University Chair in Tropical Diseases
Professor and Chairman, Department of Pathology
Executive Director,
Center for Biodefense and Emerging Infectious Disease
University of Texas Medical Branch

DHW/deb



Department of Pathology

Overview

The Department of Pathology at The University of Texas Medical Branch (UTMB) is pleased to provide these valuable research reagents as part of UTMB's ongoing commitment to emerging infectious diseases. The Department of Pathology established The Center for Tropical Diseases in 1994. Since that time, infectious disease research resources at UTMB have expanded to include the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses, the Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, the Western Regional Center of Excellence for Biodefense and Emerging Infectious Diseases Research, The Robert E. Shope, MD Laboratory, and the Galveston National Laboratory—making UTMB a forerunner in infectious disease research. The following strains of *Rickettsia* and *Ehrlichia* are available to researchers, in hopes of advancing their use in the pursuit of scientific knowledge while maintaining requisite standards for their storage, retrieval, and dissemination.

Materials for Research

All researchers are welcome to browse the list of materials below provided by scientists at UTMB. These materials are intended for laboratory research purposes only. They are not intended for use in humans. The distribution of materials from the Department of Pathology at UTMB to nonprofit institutions may require execution of a UTMB Materials Transfer Agreement. At the time of placing an order for an item that requires an MTA, you will receive an e-mail or fax requesting you to print, complete, and fax the fully executed MTA to UTMB. Your order will be shipped to you when UTMB has received and reviewed the completed MTA. Please fill out the form below electronically and email to Sherrill Hebert at smhebert@utmb.edu.

UTMB *Rickettsia* and *Ehrlichia* Reference Collections

Item	Genus/Species	Depositor	Biosafety Level	Shipped
<input type="checkbox"/> 00001	<i>Rickettsia monacensis</i>	Ulrike Munderloh	2	Frozen/Lyophilized
<input type="checkbox"/> 00002	<i>Rickettsia amblyommii</i>	David Walker	2	Frozen/Lyophilized
<input type="checkbox"/> 00003	<i>Rickettsia hoogstraalii</i>	Darja Duh	2	Frozen/Lyophilized
<input type="checkbox"/> 00004	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	David Walker	2	Frozen/Lyophilized

Requestor

Name _____ E-mail _____

Institution _____

Address _____

Phone Number _____ Fax Number _____

Shipping and Billing Information

Ship To:

Bill To (if different than shipping information):

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Payment Method: P.O. Check Credit Card _____

Card Number _____ Name on Card _____ Expiration Date _____



Confirmation of the availability of a strain for the purpose of valid publication of a new name according to the Bacteriological Code

The following information is confidential and serves only to allow the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology to confirm that a strain has been deposited and will be available from the DSMZ in accordance with the Rules of the Bacteriological Code (1990 revision) as revised by the ICSP at the plenary sessions in Sydney and Paris.

"Rickettsia hoogstraalii" strain **Croatica** has been deposited in the DSMZ under the number

DSM 22243

This strain is available in the publicly accessible section of the DSMZ and restrictions have not been placed on access to information concerning the presence of this strain in the DSMZ. It will be included in published and online catalogues after publication of this number by the authors

This strain has been checked for viability in the DSMZ and is stored using one of the standard methods used in the DSMZ

Dr. habil. S. Gronow
Curator responsible for this strain
DSMZ