

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca SERDT

**NAVADNI GOZDNI KLOP *Ixodes ricinus* KOT PRENAŠALEC
BAKTERIJE *Anaplasma phagocytophilum* V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EUROPEAN SHEEP TICK *Ixodes ricinus* AS A VECTOR OF TICK-
BORNE BACTERIUM *Anaplasma phagocytophilum* IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno delo je bilo v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in WHO laboratoriju na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 24.5.2006 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Tatjana Avšič Županc, za somentorico dr. Darja Duh in za recenzenta doc. dr. Miroslav Petrovec.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ.dipl.biol.
Somentorica: dr. Darja Duh, univ.dipl.mikr.
Recenzent: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ.dipl.biol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ.dipl.biol.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo
in imunologijo
Članica: dr. Darja Duh, univ.dipl.mikr.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo
in imunologijo
Član: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr.med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo
in imunologijo

Datum zagovora: 29.10.2008

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Serdt

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.61 + 616.98 : 595.42 (043) = 163.6
KG erlihije/*Anaplasma phagocytophilum/humana* granulocitna anaplastmoza/*Ixodes ricinus/klopi/verižna reakcija s polimerazo/PCR/PCR v realnem času/vgnezdjen PCR*
AV SERDT, Mojca
SA AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentorica)/DUH, Darja (somentorica)/PETROVEC, Miroslav (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodelčnega študija mikrobiologije
LI 2008
IN NAVADNI GOZDNI KLOP *Ixodes ricinus* KOT PRENAŠALEC BAKTERIJE *Anaplasma phagocytophilum* V SLOVENIJI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 74 str., 12 pregl., 18 sl., 59 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Bakterija *Anaplasma phagocytophilum* povzroča vročinsko bolezen imenovano humana granulocitna anaplastmoza (HGA), ki je zoonoza, katera nastopi po vbodu klopa. Navadni gozdni klop *Ixodes ricinus* je prenašalec te obvezne znotrajcelične bakterije v Evropi, medtem ko gostitelj bakterije še ni opredeljen. Cilj diplomske naloge je ugotoviti pogostost okuženih klopor vrste *I. ricinus* z bakterijo *A. phagocytophilum* v Sloveniji. V letih 2005 in 2006 smo mesečno nabirali klope z metodo zastave na 8 različnih lokacijah po Sloveniji. Klope smo uredili v skupine in iz teh osamili celokupno DNK. S PCR v realnem času smo preverili prisotnost bakterijske DNK, medtem ko smo z vgnezdenim PCR pomnožili bakterijski odsek DNK in z določanjem nukleotidnega zaporedja potrdili verodostojnost pridelkov. Ugotovili smo, da imajo klopi v Sloveniji dvojno sezonsko aktivnost (pozno spomladi in jeseni). Za prenos bakterije *A. phagocytophilum* so odgovorni tako odrasli klopi kot nimfe. Dokazali smo, da znaša celokupna prekuženost klopor *I. ricinus* z bakterijo *A. phagocytophilum* za leto 2005 0,36 % in za leto 2006 0,40 %. S filogenetsko analizo smo ugotovili, da se v Sloveniji pojavlja več genetskih različic bakterije *A. phagocytophilum*, saj sta v klopih prisotni vsaj dve genetski liniji *A. phagocytophilum*. S filogenetsko analizo smo odkrili morebitno tretjo genetsko različico bakterije *A. phagocytophilum*, ki je tudi statistično podprtta (95,5 %). Za dokončno potrditev nove genetske linije *A. phagocytophilum* so potrebne dodatne raziskave vzorcev klopor in gostiteljev na tem območju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.61 + 616.98 : 595.42 (043) = 163.6
CX ehrlichia/ *Anaplasma phagocytophilum*/ human granulocytic anaplasmosis/ *Ixodes ricinus*/ticks/polymerase chain reaction/PCR/real time PCR/nested PCR
AU SERDT, Mojca
AA AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor)/DUH, Darja (co-advisor)/PETROVEC, Miroslav (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI EUROPEAN SHEEP TICK *Ixodes ricinus* AS A VECTOR OF TICK-BORNE BACTERIUM *Anaplasma phagocytophilum* IN SLOVENIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 74 p., 12 tab., 18 fig., 59 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Human granulocytic anaplasmosis (HGA) is an acute febrile illness and tick-borne zoonosis caused by *Anaplasma phagocytophilum*. The european sheep tick *Ixodes ricinus* is the recognized vector of this obligate intracellular ehrlichiae in Europe, and reservoir host is yet unknown. The aim of the study was to establish the prevalence of *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* ticks in Slovenia. Ticks were collected monthly by flagging at 8 location in Slovenia in 2005 and 2006. Collected ticks were pooled into groups and ticks DNA was isolated. With the real time PCR we detected bacterial DNA, while nested PCR was used for the amplification of bacterial DNA and preparation of amplicons for sequencing. Biannual activity of ticks was shown, peaking in May-July with a secondary rise in September. We demonstrated that nymphs and adults are responsible for transmission of the pathogen. Based on the results, we calculated the 0,36 % overall prevalence of *A. phagocytophilum* in ticks in 2005 and 0,40 % overall prevalence in 2006. Sequence analysis revealed genetic variants of bacterium *A. phagocytophilum* in Slovenia. By phylogenetic analysis we have demonstrated an existence of at least two genetic variants of *A. phagocytophilum* in ticks. Furthermore, the possible existence of a third, novel genetic variant of *A. phagocytophilum* was shown and was statistically supported (95,5 %). Experimental studies on ticks and reservoir hosts in this area are needed to confirm the presence of a novel genetic variant of *A. phagocytophilum*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED.....	4
2.2 BAKTERIJA <i>A. phagocytophilum</i> IN HUMANA GRANULOCITNA ANAPLAZMOZA	5
2.2.1 Taksonomija.....	5
2.2.2 Morfološke in fenotipske značilnosti bakterije <i>A. phagocytophilum</i>	6
2.2.3 Prenos bakterije v naravi.....	7
2.2.4 Potek bolezni	8
2.2.5 Klinični znaki bolezni.....	9
2.2.6 Laboratorijska diagnostika HGA	9
2.2.6.1 Krvni razmaz	10
2.2.6.2 Serološke metode.....	10
2.2.6.3 Osamitev bakterije na celični kulturi.....	11
2.2.6.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR, iz angl.: polymerase chain reaction)	11
2.2.7 Zdravljenje in preprečevanje	13
2.2.8 Epidemiologija okužb z bakterijo <i>A. phagocytophilum</i>	14
2.3 PRENAŠALCI IN GOSTITELJI BAKTERIJE <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	15
2.3.1 Klopi.....	16

2.3.2 Taksonomija kloporov	16
2.3.3. <i>Ixodes ricinus</i>	17
2.3.3.1 Življenjski prostor kloporov	17
2.3.3.2 Anatomija kloporov	17
2.3.3.3 Življenjski krog kloporov	19
2.3.3.4 Iskanje gostitelja in hranjenje	20
2.3.4 Navadni gozdni klop <i>Ixodes ricinus</i> v Sloveniji	22
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 MATERIALI	23
3.1.1 Klopi	23
3.1.2 Lokacije	23
3.2 METODE	25
3.2.1 Metoda zastave	25
3.2.2 Razkuževanje kloporov	25
3.2.3 Razvrščanje kloporov	26
3.2.3 Homogenizacija kloporov	26
3.2.4 Osamitev celokupne DNA iz kloporov	27
3.2.5 Pomnoževanje izolirane bakterijske DNA	28
3.2.5.1 Izbira začetnih oligonukleotidov	28
3.2.5.2 Preverjanje uspešnosti osamitve klopne DNA	30
3.2.5.3 PCR v realnem času	31
3.2.5.3.1 Teoretične osnove	31
3.2.5.3.2 Preverjanje prisotnosti bakterijske DNA s PCR v realnem času	33
3.2.5.4 Vgnezden PCR (angl. nested PCR)	34
3.2.6 Elektroforeza pridelkov PCR v agaroznem gelu	36
3.2.7. Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR	37
3.2.7.1 Čiščenje pridelkov PCR	37
3.2.7.2 Določanje koncentracije očiščene DNA	38
3.2.7.3 Izbira sekvenčnih nukleotidov za sekvečno reakcijo	38

3.2.7.4 Sekvenčna reakcija	40
3.2.7.5 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije.....	41
3.2.8 Analiza nukleotidnih zaporedij	42
4 REZULTATI	43
4.1 KLOPI	43
4.2 DOKAZ BAKTERIJE <i>A. phagocytophilum</i> Z METODO PCR V REALNEM ČASU.....	51
4.2.1 Izračun prekuženosti klopoz z bakterijo <i>A. phagocytophilum</i>	52
4.3 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA <i>A. phagocytophilum</i> Z AVTOMATSKIM SEKVENIRANJEM	54
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	58
5.1 UVOD.....	58
5.2 ANALIZA REZULTATOV.....	59
5.3 SKLEPI.....	64
6 POVZETEK.....	65
7 VIRI	67
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki o lokacijah nabiranja klopoval: ime in občina lokacije, zemljepisna širina in dolžina ter nadmorska višina	24
Preglednica 2: Začetni oliginukleotidi, ki smo jih uporabili pri sekvenčni reakciji	39
Preglednica 3: Število klopoval <i>I. ricinus</i> po posameznih stadijih, mesečno od aprila do novembra 2005 na osmih lokacijah v Sloveniji	44
Preglednica 4: Število klopoval <i>I. ricinus</i> po posameznih stadijih, mesečno od februarja do decembra 2006 na osmih lokacijah v Sloveniji	45
Preglednica 5: Število skupin klopoval zbranih na osmih lokacijah v Sloveniji v letu 2005	46
Preglednica 6: Število skupin klopoval zbranih na osmih lokacijah v Sloveniji v letu 2006	46
Preglednica 7: Prikaz izmerjenih temperatur (°C) in vlažnosti (%) po mesecih na lokacijah v Sloveniji v letu 2005	47
Preglednica 8: Prikaz izmerjenih temperatur (°C) in vlažnosti po mesecih na lokacijah v Sloveniji v letu 2006	48
Preglednica 9: Vzorci klopoval <i>I. ricinus</i> nabranih v Sloveniji leta 2005, kjer smo dokazali bakterijsko DNA z metodo PCR v realnem času	51
Preglednica 10: Vzorci klopoval <i>I. ricinus</i> nabranih v Sloveniji leta 2006, kjer smo dokazali bakterijsko DNA z metodo PCR v realnem času	51
Preglednica 11: Izračun prekuženosti klopoval (%) z <i>A. phagocytophilum</i> v letu 2005 in 2006 v Sloveniji	53
Preglednica 12: Izračunana povprečna prekuženost klopoval v različnih stadijih z bakterijo <i>A.</i> <i>phagocytophilum</i> v letu 2005 in 2006 v Sloveniji	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Prenos bakterije <i>A. phagocytophilum</i> v naravi med vektorji in gostitelji (CDC, 2000)	7
Slika 2: Razširjenost <i>A. phagocytophilum</i> , <i>E. ewingii</i> in <i>E. chaffeensis</i> po svetu (Parola in Raoult, 2001)	15
Slika 3: Razvojne stopnje klopo: Odrasla samica, odrasli samec, nimfa in ličinka (Parola in Raoult, 2001)	18
Slika 4: Grafični prikaz sezonske aktivnosti ličink, nimf in odraslih klopo vrste <i>Ixodes ricinus</i> v različnih okoljih (Sonenshine, 1993).....	20
Slika 5: Geografska karta Slovenije z označenimi lokacijami nabiranja klopo.....	24
Slika 6: Metoda zastave in sesalna naprava, s katero smo nabirali klope.....	25
Slika 7: Shematski prikaz operona GroESL in položaja začetnih oligonukleotidov HS1, HS6, HS43 in HSVR ter velikosti pridelkov PCR	29
Slika 8: Nespecifični način detekcije pridelkov PCR v realnem času s Sybr Green I (Arko, 2004).....	31
Slika 9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času	32
Slika 10: Shematska predstavitev določanja 1256 bp dolgega nukleotidnega zaporedja operona GroESL	39
Slika 11: Skupno število odraslih klopo v letih 2005 in 2006 na vseh lokacijah	50
Slika 12: Skupno število nimf v letih 2005 in 2006 na vseh lokacijah.....	50
Slika 13: Skupno število ličink v letih 2005 in 2006 na vseh lokacijah	50
Slika 14: Gostota klopo <i>I. ricinus</i> (nimf in odraslih klopo) na 100 m ² ter okuženost le-teh z bakterijo <i>A. phagocytophilum</i> na posameznih lokacijah	52
Slika 15: Primerjava identičnosti nukleotidnih zaporedij 1256 bp dolgega odseka operona GroESL med vzorci klopo	55
Slika 16: Dendrogram 12 različnih nukleotidnih zaporedij operona GroESL <i>A. phagocytophilum</i> v klopih <i>I. ricinus</i>	55
Slika 17: Primerjava identičnosti izbranih nukleotidnih zaporedij 1256 bp dolgega odseka operona GroESL med vzorci klopo, divjadi, referenčnih sevov in bolnika	56

Slika 18: Filogenetsko drevo sorodnosti nukleotidnih zaporedij izolatov bakterije *A. phagocytophilum* iz klopoval, bolnika, divjadi in referenčnih sevov.....57

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
HME	humana monocitna erlihioza
HGE	humana granulocitna erlihioza
HGA	humana granulocitna anaplastična moza
NCBI	National Center for Biotechnology Information
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)

1 UVOD

Bolezni, ki jih prenašajo klopi, predstavljajo v Sloveniji in na splošno v evropskih državah precejšen zdravstveni problem. Med bolezni, katerih povzročitelje prenašajo klopi, najpogosteje prištevamo lajmsko boreliozo in klopn meningoencefalitis. V zadnjih letih so se kot nov, pomemben povzročitelj vročinskih bolezni po vbodu klopa pojavile anaplazme.

Bakterijo *Anaplasma phagocytophilum*, prej poznano kot *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* in HGE agent, so sprva uvrščali v rod erlihij. Erlihije so obvezne znotrajcelične bakterije, ki povzročajo bolezni pri človeku in živalih. So po Gramu negativni kokobacili, ki rastejo v obliki mikrokolonij znotraj vakuol. Vakuole so obdane z membrano in se nahajajo v citoplazmi evkariontskih celic (običajno levkocitov). Na podlagi filogenetskih analiz so bakterijo *A. phagocytophilum* uvrstili v rod *Anaplasma*. *Anaplasma phagocytophilum* povzroča bolezen imenovano humana granulocitna anaplazmoza (HGA). Leta 1994 so ameriški raziskovalci odkrili, da bakterija, za katero je bilo znano, da povzroča bolezen pri živalih, povzroča bolezen tudi pri ljudeh. Tri leta kasneje so v Sloveniji opisali prvi primer HGA pri človeku v Evropi. HGA je v Sloveniji porajajoča se zoonoza. Med letoma 1996 in 2007 so v Sloveniji potrdili 42 primerov HGA.

Bakterija *A. phagocytophilum* se v naravi ohranja s kroženjem med gostitelji, kot so mali sesalci in divjad, ter klopi, ki so glavni prenašalci bakterije. V Evropi prenaša bakterijo *A. phagocytophilum* navadni gozdni klop *Ixodes ricinus*, ki je najbolj razširjena in najpogostejša vrsta klopa tudi v Sloveniji. Prekuženost klopor z anaplazmo v Sloveniji znaša 3,2 %, medtem ko v Evropi variira med 0,4 % - 66,7 %. Določena prevalenca *A. phagocytophilum* v klopih *I. ricinus* v Sloveniji verjetno ne odraža dejanske prevalence, saj so bili podatki pridobljeni v študiji, ki je zajela premajhno število klopor.

Z diplomsko nalogo želimo ugotoviti ali se prekuženost klopor razlikuje od predhodno določene prevalence *A. phagocytophilum* v klopih, če pregledamo večje število klopor

nabranih mesečno na določenih lokacijah v Sloveniji. Ugotoviti želimo tudi, kako na prevalenco okužbe z *A. phagocytophilum* vpliva dinamika klopor *I. ricinus*. Z metodo zastave bomo mesečno nabirali klope ter jih urejali v skupine za nadaljno obdelavo. Osamili bomo celokupno DNA in s PCR v realnem času preverili prisotnost bakterijske DNA, medtem ko bomo z vgnezdenim PCR pomnožili značilen bakterijski odsek DNA in z določanjem nukleotidnega zaporedja potrdili verodostojnost pridelkov in določili sorodski status dokazanih anaplazem.

1.1 NAMEN DELA

Klop je eden izmed najpomembnejših prenašalcev bolezni, ki prizadenejo ljudi in živali. Klop *Ixodes ricinus* je v Evropi in v Sloveniji glavni prenašalec bakterije *Anaplasma phagocytophilum*, ki povzroča bolezen imenovano humana granulocitna anaplastoma. Bolezen se pojavlja razmeroma redko, na kar vpliva prekuženost prenašalcev s povzročiteljem HGA. Prekuženost klopor *I. ricinus* z bakterijo *A. phagocytophilum* v Sloveniji znaša 3,2 % (Petrovec in sod., 1998). Med leti 1996 in 2004 so v Sloveniji pri bolnikih potrdili 24 primerov HGA (Lotrič-Furlan in sod., 2006). Po podatkih iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani pa so med leti 2005 in 2007 potrdili novih 18 primerov HGA pri slovenskih bolnikih, kar kaže na to, da je HGA vse pogostejša bolezen v Sloveniji.

Namen diplomske naloge je sistematično in ciljano spremljati populacijo klopor *I. ricinus* mesečno, v letih 2005 in 2006, nabranih na osmih različnih lokacijah. Kriterija za izbiro lokacij bosta incidenca in prevalenca HGA na izbranih območjih. Nabrani zbirki klopor bomo določili prisotnost DNA bakterije *A. phagocytophilum*. Ugotoviti želimo ali se stopnja prekuženosti klopor z anaplastom razlikuje ali sovpada s predhodno določeno prekuženostjo v Sloveniji in Evropi. Zanima nas tudi ali/in kako je prekuženost klopor z *A. phagocytophilum* povezana z razvojno stopnjo klopor. Zato bomo nabirali ličinke, nimfe in odrasle klope. Želimo tudi potrditi ali so genetske različice bakterije v kloporih enake tistim, ki jih poznamo

pri divjadi in slovenskih bolnikih. Uporabili bomo molekularne biološke metode, kot so PCR v realnem času, vgnezden PCR in določili nukleotidno zaporedje z avtomatskim sekveniranjem.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Že v antični Grčiji so bili klopi znani kot človeški paraziti, saj so jih opisovali številni antični grški pisatelji, kot sta Homer in Aristotel (Sonenshine, 1991). Klope so preučevali dolga leta, a šele ob koncu 19. stoletja so odkrili, da je klop tudi prenašalec bolezni. Smith in Kilbourne sta prva dokazala, da klop *Boophilus annulatus* prenaša parazita *Babesia bigemina* (Assadian in Stanek, 2002). Od začetka 20. stoletja dalje smatrajo klope za prenašalce bakterijskih povzročiteljev bolezni. V 80. letih prejšnjega stoletja je bila opisana tudi danes ena izmed najpogostejših bolezni, ki jih prenaša klop, lajmska borelioza. Klopi niso le prenašalci različnih mikroorganizmov, ampak tudi njihovi gostitelji (Parola in Raoult, 2001).

Zgodovina erlihij sega v leto 1935, ko so jih prvič opisali kot povzročiteljice hemoragične bolezni pri psih v Alžiriji. Ime so dobitile po nemškem mikrobiologu Paulu Ehrlichu (Petrovec, 2002; Rikihisa, 1991). Erlihije so bile dolgo časa pomembne v veterinarski medicini. V zadnjih letih pa so dokazali, da povzročajo bolezni pri človeku štiri pomembne vrste erlihij. V 50. letih prejšnjega stoletja so na Japonskem dokazali bakterijo *Ehrlichia sennetsu* (danes *Neorickettsia sennetsu*) kot povzročiteljico vročinske bolezni pri človeku, podobne mononukleozi (Rikihisa, 1991). Prvi primer humane monocitne erlihioze (HME), za katero so sprva mislili, da jo je povzročila *Ehrlichia canis*, je bil opisan leta 1987 v ZDA (Maeda in sod., 1987). Glavno povzročiteljico HME, *Ehrlichia chaffeensis*, so nato leta 1991 tudi prvič izolirali v ZDA. Leta 1994 je bil prav tako v ZDA opisan prvi primer humane granulocitne erlihioze (HGE). Takrat je bil povzročitelj te bolezni znan kot »HGE« agent, ki so ga kasneje preimenovali v *Ehrlichia phagocytophila* in nato v *A. phagocytophilum* (Parola in Raoult, 2001). V Evropi so bili prvi primeri okužb z *A. phagocytophilum* opisani že leta 1995, ko so bili dokazani s serološkimi preiskavami. Prvi potrjen evropski primer HGA pa je bil opisan v Sloveniji leta 1997 (Petrovec in sod., 1997). Leta 1999 je bil dokazan tudi prvi primer okužbe

pri človeku z bakterijo *Ehrlichia ewingii*, ki povzroča pri psih granulocitno erlihiozo (Parola in Raoult, 2001).

Na podlagi filogenetskih študij 16S rRNA, operona GroESL in površinskih proteinov je leta 2001 prišlo do pomembne taksonomske reorganizacije reda rikecij, kamor so uvrščali tudi erlihije. Živalski patogeni bakteriji *Ehrlichia equi* (povzročitelj erlihioze pri konjih v ZDA) in *Ehrlichia phagocytophila* (povzročitelj klopne vročice v Evropi) ter HGE agent so uvrstili v eno bakterijsko vrsto *A. phagocytophilum* (Dumler in sod., 2001).

2.2 BAKTERIJA *A. phagocytophilum* IN HUMANA GRANULOCITNA ANAPLAZMOZA

2.2.1 Taksonomija

Taksonomska razvrstitev bakterije *A. phagocytophilum* temelji na osnovi filogenetskih raziskav 16S rRNA in operona GroESL. Gen za 16S rRNA in operon GroESL sta dobra evolucijska kronometra, ki sta se skozi evolucijo zaradi svoje specifične funkcije zelo počasi spremenjala. Zato sta ohranila pomembne ohranjene dele, primerne za klasifikacijo oz. ugotavljanje filogenetskih sorodnosti (Dumler in Walker, 2001).

A. phagocytophilum je bila prej poznana pod imeni *E. phagocytophila*, *E. equi* ali HGE agent, katere so uvrščali v rod *Ehrlichia*. Danes pa ta bakterija spada v red *Rickettsiales*, ki zajema družine *Rickettsiaceae*, *Holosporaceae* in *Anaplastaceae*. V slednji najdemo 5 rodov: *Aegyptianella*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* in *Anaplasma*, kamor uvrščamo vrste *A. phagocytophilum*, *A. bovis*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. marginale* in *A. platys* (Dumler in sod., 2001).

2.2.2 Morfološke in fenotipske značilnosti bakterije *A. phagocytophilum*

Bakterija *A. phagocytophilum* ima tropizem za bele krvne celice ali levkocite. Tarčne celice so mononuklearni fagociti, eozinofilci in nevtrofilci (Woldehiwet, 2006). Je edinstvena v svetu bakterij, saj preživi znotraj vakuole v citoplazmi nevtrofilcev, ki so prva obrambna črta organizma. Je edina znana patogena bakterija, ki se je prilagodila za rast in razvoj v sovražnem okolju granulocitov in predhodnikov teh celic v kostnem mozgu. Bakterije navadno najdemo znotraj z membrano obdanih vakuol v citoplazmi evkariontskih celic v obliki mikrokolonij, ki jih imenujemo morule (*morula* iz lat.murva). Morule merijo od 1,5 do 2,5 μm v premeru. Nimajo fibrilarnega matriksa in ob njihovi membrani se ne zbirajo mitohondriji, kot je to značilno za nekatere erlihije (Dumler in Brouqui, 2004; Dumler in sod., 2001).

Po Gramu se obarvajo negativno in so kokoidne, velikokrat pleomorfne oblike. Po Romanovskem se obarvajo temno modro ali škrlatno, rdeče po Macchiavelli in rjavo do črno pri barvanju s srebrom. *Anaplasma phagocytophilum* meri v premeru do 0,4 μm , lahko pa zraste do 2 μm . Posamezne bakterijske celice najdemo v dveh morfoloških oblikah: retikularne oblike in oblike z zgoščeno sredico. Za retikularno obliko je značilno, da so večje in imajo ribosome ter fibrilna vlakna DNA enakomerno razporejena po citoplazmi, medtem ko so zgoščene oblike manjše in imajo te sestavine zbrane v središču celice. Obe morfološki oblici lahko najdemo v isti vakuoli (Petrovec, 1999; Dumler in sod., 2001).

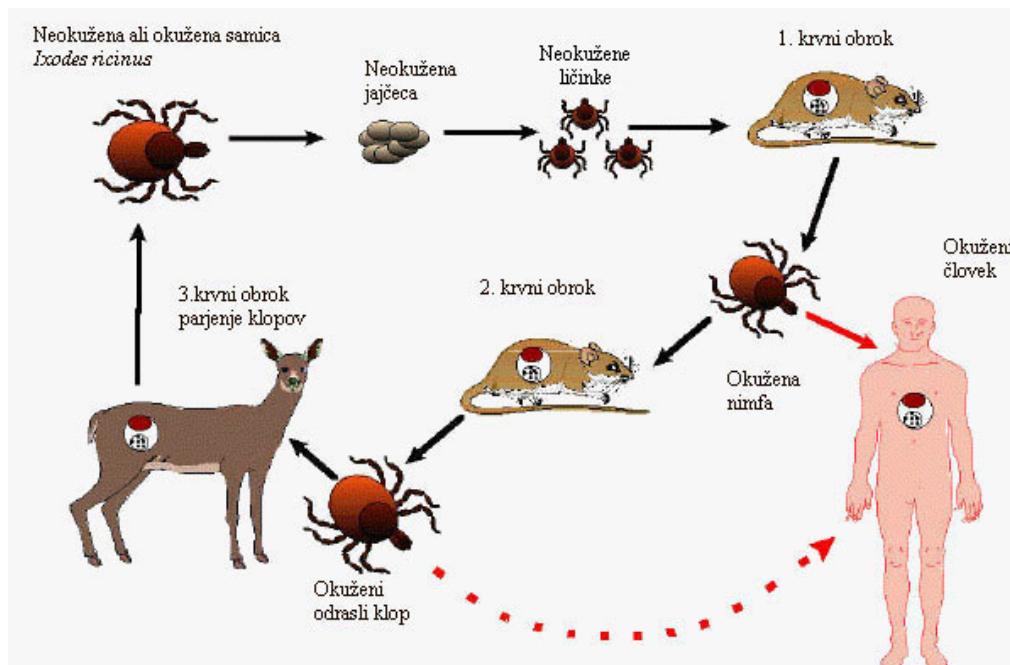
Bakterijski genom *A. phagocytophilum* je velik 1,5 Mbp in vsebuje številne ohranjene konzervativne regije genskega zapisa. Z molekularnimi metodami so določili celotno nukleotidno zaporedje genoma in ga najdemo v genski bazi NCBI pod številko NC 007797 (NCBI, 2008b). Določili so nukleotidno zaporedje številnim genom, kot so *gltA*, *ftsZ*, *rrs*, *rrl*, *rrf*, ki nosijo zapis za 16S, 23S in 5S rRNA, geni, ki kodirajo sekretorni sistem tipa IV, ter operon GroESL. Operon GroESL nosi zapis za stresne beljakovine (angl. heat shock). To so zelo ohranjeni geni, ki so zaradi svoje zgradbe in primerne dolžine zelo pomembni v

filogenetskih primerjavah med mikroorganizmi (McBride in Walker, 2006; Dunning Hotopp in sod., 2006).

2.2.3 Prenos bakterije v naravi

Za učinkovito ohranjanje v naravi potrebuje bakterija *A. phagocytophilum* prenašalca, ki je v Evropi največkrat navadni gozdni klop *Ixodes ricinus*, ter primernega gostitelja kot so mali gozdni sesalci, jelenjad in srnjad, konji, ovce, psi, idr.

Slika 1 prikazuje prenos anaplazem v naravi. Anaplazme se lahko s klopi prenašajo na horizontalni način, ko se klop okuži na okuženem gostitelju. Klop se okuži v katerikoli razvojni stopnji in ostane kužen med celotnim ciklom. Bakterija se prenaša tudi na vertikalni način prenosa bakterije, pri katerem se le-ta transstadalno prenaša med razvojnimi stopnjami. Okuženih ličink še niso odkrili, kar dodatno potrjuje hipotezo, da se anaplazme ne prenašajo s transovarialnim načinom prenosa, pri katerem samica klopa okuži jajčeca (Dumler in sod., 2001; Parola in sod., 2005).



Slika 1: Prenos bakterije *A. phagocytophilum* v naravi med vektorji in gostitelji (CDC, 2000)

2.2.4 Potek bolezni

Anaplasma phagocytophilum povzroča bolezen humano granulocitno anaplastozo, ki je bila prej poznana kot humana granulocitna erlihioza. Bolezen so prvič pri človeku odkrili leta 1994 v ZDA (Chen in sod., 1994). Patogeneza bolezni še vedno ni zadovoljivo pojasnjena.

Anaplastome se v telo prenesejo z vbodom klopa. Po vbodu se s krvjo prenesejo v druge organe (jetra, vranica, kostni mozeg). Sledi okužba belih krvnih celic in mieloidnih predhodnikov. Bakterije vstopajo v tarčne celice z endocitozo. Msp-2 je 44 kDa velika zunanja beljakovina bakterijske membrane, ki ima vlogo adhezina in se veže na receptorski molekuli CD15 in PSGL-1. Molekuli sta značilni za nevtrofilce in prav zato velja tropizem bakterije za te bele krvne celice (Dumler in sod., 2005). Ob vezavi bakterije na tarčno celico se sproži vrsta imunskih odgovorov gostitelja. Inducirajo se samo citokini IL-8, MCP-1, MIP1- α , MIP1- β , RANTES, ki še dodatno okrepijo nastanek drugih dovzetnih tarčnih celic, kar kaže na sposobnost spreminjanja funkcije gostiteljske celice. Pomembno vlogo pri obrambi gostitelja igrata IFN- γ in TH-1. Povečana koncentracija IFN- γ sproži monocitno diferenciacijo in s tem zavre razvoj granulocitnih nevtrofilcev, kar pomeni neuspešno razmnoževanje anaplastme. Bakterija se izogne toksičnim kisikovim radikalom z neposredno detoksifikacijo superokksida in s tem prepreči uničenje tarčne celice. S svojimi mehanizmi prepreči bakterija tudi programirano celično smrt ali apoptizo. (Goodman, 2005; McBride in Walker, 2006). Pomembna bakterijska beljakovina je AnkA, ki je edina bakterijska molekula, katera lahko prehaja preko sekretornega mehanizma tipa IV. skozi bakterijsko membrano in membrano vakuole, v citoplazmo in skozi jedrno membrano do celične DNA. Tu tvori kompleks s kromatinom in vpliva na gensko ekspresijo celice (von Loewenich in sod., 2003; Dumler in sod., 2005). Bakterija v endosomih prepreči zlitje endosomskega mešička z lizosomom in s tem znižanja pH v vakuoli endosoma. Sledi razmnoževanje in proliferacija novih bakterijskih celic ter nastanek morul. Naslednji korak je liza okužene tarčne celice in sprostitev novo nastalih bakterij (Goodman, 2005).

2.2.5 Klinični znaki bolezni

Prvi klinični znaki bolezni se navadno pokažejo po 7-10 dneh od vboda klopa. Pojavijo se visoka telesna temperatura ($>39^{\circ}\text{C}$), glavobol, bolečine v mišicah, slabost in mrazenje. Pri nekaterih bolnikih so se pojavili še drugi simptomi kot so bruhanje, driska, suhi kašelj in izpuščaji. Bolezen naj bi bila podobna gripi, ki je pogosta v zimskih časih, medtem ko je HGA pogostejša poleti (Goodman, 2005; Bakken in Dumler, 2000).

Med laboratorijskimi znaki so najpogostejši levkopenija (znižana koncentracija levkocitov), trombocitopenija (znižana koncentracija trombocitov), povečana aktivnost jetnih transaminaz, anemija in povečana koncentracija C-reaktivnega proteina (Strle, 2004; Bakken in Dumler, 2000).

Večinoma ljudje ozdravijo brez zdravljenja, medtem ko starejši bolniki potrebujejo zdravljenje z antibiotki. Pogosteje obolevajo moški kot ženske in tudi starejši ljudje. Odstotek smrtnosti je manjši od 1 % (Goodman, 2005). V redkih primerih lahko okužba poteka z odpovedjo organov, ki se konča s smrtjo. Pri bolnikih umrlih za HGA je bila skupna značilnost razvoj oportunističnih okužb. Posebej ogroženi so ljudje z oslabljenim imunskim sistemom. Istočasno lahko pride do okužbe tudi z borelijami in babezijami, ki jih prav tako prenaša klop *I. ricinus* (Blanco in Oteo, 2002).

2.2.6 Laboratorijska diagnostika HGA

Pri bolniku s sumom na HGA, ki ima levkopenijo in/ali trombocitopenijo ter povišano koncentracijo aktivnosti jetnih encimov in koncentracijo C-reaktivnega proteina, je potrebna hitra potrditev diagnoze bolezni. Laboratorijsko lahko okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* dokažemo na posreden ali neposreden način (Dumler in Walker, 2001).

2.2.6.1 Krvni razmaz

Hitra in zelo enostavna metoda laboratorijske diagnoze HGA je krvni razmaz. S svetlobnim mikroskopom lahko v razmazu periferne krvi, obarvanem po Giemsi, Wrightu ali izvedenki barvanja po Romanovskem, najdemo značilne morule v nevtrofilcih. V ZDA so ugotovili prisotnost morul v 25-80 % bolnikov, medtem ko so v Evropi le v nekaj primerih našli morule v krvnih razmazih (Dumler in Walker, 2001; Lotrič-Furlan in sod, 1998). Prisotnost morul v nevtrofilcih ne zaznamo več pri zdravljenju z doksiciklinom ali po dveh tednih bolezni. Ta laboratorijska metoda je odvisna od izkušenosti mikrobiologa in je zato subjektivna ter slabo občutljiva. (Dumler in Brouqui, 2004).

2.2.6.2 Serološke metode

S serološkimi metodami zaznavamo protitelesa proti *A. phagocytophilum* v vzorcu bolnikov. Najpogosteje uporabljena metoda je posredna imunofluorescenca (angl.: indirect immunofluorescence- IIF), za katero sta značilni večja specifičnost in občutljivost kot pri metodi krvnega razmaza. Kot pozitiven rezultat vrednotimo 4-kratni porast titra protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* v dveh zaporednih vzorcih ali enkratni titer protiteles, ki je večji od 1:128. V akutni fazи bolezni lahko ugotavljamo protitelesa IgG in IgM. Protitelesa IgG so prisotna v krvi nekaj let, medtem ko IgM le 45-60 dni (Dumler in Brouqui, 2004; Goodman, 2005). Pri IIF lahko pride tudi do lažno pozitivnih rezultatov, čemur so vzrok navzkrižne serološke reakcije antigenov drugih bakterij, kot sta *Ehrlichia chaffensis* in *Borrelia burgdorferi* (Goodman, 2005).

Uporabljajo še druge serološke metode, kot so encimsko imunska metoda (ELISA), imunski blot metodi Western blot in imunoblot ter Elisa/imunoblot test. (Dumler in Walker, 2001).

2.2.6.3 Osamitev bakterije na celični kulturi

Za zlati standard mikrobioloških preiskav velja osamitev povzročitelja bolezni na celičnih kulturah. Prvo uspešno osamitev bakterije *A. phagocytophilum* so izvedli leta 1996 na tkivni kulturi človeških levkemičnih celic HL60 (Goodman in sod., 1996). Z manipulacijo diferenciacije celic HL60 v monocitno ali granulocitno smer so razvili enoten sistem celične kulture primerne za osamitev anaplaste. Kasneje so anaplasto prilagodili še na druge celične sisteme, kot so npr. celice klopa in endotelijske celice (Goodman, 2005). Prvi citopatski učinki celic se pokažejo hitro v 2-7 dneh, vidne so lahko tudi morule. Metoda ni primerna za laboratorijsko diagnostiko HGA, saj je dolgotrajna in težavna ter zahteva odlične tehnične razmere. Uspešnost osamitve je odvisna od kvalitete izhodiščnega vzorca in od odstotka okuženih celic (Petrovec, 1999).

2.2.6.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction)

Ena od najpomembnejših metod za dokazovanje anaplaste je PCR. Gre za metodo, s katero lahko s temperaturno obstojno polimerazo DNA pomnožimo izbrani del nukleotidnega zaporedja v molekuli DNA. S tem ko pomnožimo del genoma, značilnega za iskani mikroorganizem, neposredno dokažemo njegovo prisotnost v vzorcu.

Verižna reakcija s polimerazo je metoda za sintezo nukleinskih kislin *in vitro*, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA. Zaradi tega za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca, kar pomeni bistveno prednost PCR pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije, kjer analiziramo nepomnoženo DNA oziroma RNA in potrebujemo večje količine celic ali tkiv (Albert in sod., 1994).

Reakcijska mešanica za PCR mora vsebovati:

- tarčno dvojno DNA, ki služi kot matrica,
- dva začetna olionukleotida z znanim zaporedjem,

- termostabilni encim DNA polimerazo,
- deoksinukleotidtrifosfati (dNTP) vseh štirih baz v enakih koncentracijah,
- pufer z optimalnim pH in ionsko jakostjo, pri katerem je pomembna koncentracija Mg^{2+} ionov (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, ki predstavljajo en ciklus PCR. In sicer, pri 95 °C poteka denaturacija dvojnovijačne molekule DNA v enojnovijačni molekuli DNA. Pri drugi temperaturi (navadno med 45 °C in 75 °C) se začetni oligonukleotidi pripenjajo na komplementarna dela vzorčne DNA. Pri tretji temperaturi 72 °C poteka podaljševanje verige oz. sinteza nove komplementarne molekule DNA v smeri od 5' konca proti 3' koncu. Z vsakim ciklom podvojimo število kopij želenega odseka DNA. Navadno izvedemo 20-40 ciklov (Louie in sod, 2000).

Pri običajnem PCR poteka dokazovanje produktov po končanem pomnoževanju in sicer s horizontalno elektroforezo na agaroznem gelu, ki omogoča ločevanje delcev DNA po velikosti (Poljak in sod., 1994).

PCR je zelo specifična in občutljiva metoda. Na specifičnost reakcije vplivajo začetni oligonukleotidi, tarčna DNA, koncentracija reagentov v reakcijski mešanici in izbira metode PCR. Na občutljivost reakcije vplivajo priprava DNA, prisotnost tuje DNA, inhibitornih snovi in postopki analize produktov. Občutljivost reakcije lahko povečamo z izbiro primerne metode, kot je postopek vgnezdeni PCR (Dumler in Brouqui, 2004).

PCR je med vsemi diagnostičnimi metodami edina metoda, s katero lahko opredelimo anaplazme na nivoje vrste. Za dokaz bakterije *A. phagocytophilum* v kliničnih vzorcih uporabljam PCR, kjer pomnožujemo značilni odsek DNA. Največkrat so to 16S rRNA, GroESL operon, gen za EPANK1, gena za HGE-44 in MSP2 geni (Goodman 2005). Gen za 16S rRNA se v evoluciji zaradi svojih funkcijskih sposobnosti (prevajanje DNA) ne spreminja enako na vseh svojih delih. Sestoji iz visoko ohranjenega dela, skupnega vsem

živim organizmom in sprejemljivega dela, ki se lahko razlikuje znotraj zelo sorodnih vrst organizmov. Zaradi teh lastnosti je gen za 16S rRNA idealen molekularni označevalec za filogenetske raziskave v bakteriologiji.

Specifičnost PCR so izboljšali s PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. Gre za prikrojitev reakcije PCR, katera uporablja »vgnezden« (nested) set začetnih oligonukleotidov, ki se v drugi reakciji PCR prilegajo na odsek DNA, značilnem za bakterijo *A. phagocytophilum*. Ker pa je bila občutljivosti metod, ki so kot tarče uporabljale 16S rRNA, še vedno splošno slaba, so v zadnjih letih začeli uporabljati nove tarčne odseke genov (Dumler in Brouqui, 2004).

Za *A. phagocytophilum* je bilo uspešno opisano pomnoževanje dela operona GroESL. Ta je sestavljen iz dveh genov GroES in GroEL, ki sta ločena z medgenskim predelom in prav slednji se pri različnih bakterijskih vrstah razlikuje po dolžini, kar izkoriščamo za dokazovanje posameznih vrst (Petrovec, 1999; Sumner in sod., 1997).

Eno izmed močnih orodij na področju diagnostike predstavlja PCR v realnem času (Arko, 2004). Gre za nadgradnjo PCR, ki omogoča sprotro zasledovanje količine nastalega produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo in je zato hitrejša, omogoča pa tudi kvantificiranje točno določene DNA v začetnem vzorcu (Ginzinger, 2002).

2.2.7 Zdravljenje in preprečevanje

Zdravljenje bolnikov okuženih z bakterijo *A. phagocytophilum* je potrebno pričeti čim prej. Najpogosteje se uporablja doksiciklin, ki je zelo učinkovit tako *in vitro* kot tudi *in vivo*. Drugi antibiotiki z baktericidnim učinkom so še rifampin, rifabutin in fluorokinoloni (ciprofloksacin, ofloksacin, levofloksacin in trovafloksacin). Kloramfenikol in gentamicin sta delovala le blago inhibitorno in nista imela baktericidnega učinka. *A. phagocytophilum* je odporna na antibiotike klindamicin, trimetoprim-sulfometoksazol, imipenem-cilastatin,

ampicilin, amoksicilin, ceftriakson, eritromicin, klaritromicin in azitromicin. Sredstvo izbora pri zdravljenju odraslega je doksiciklin. Otroke (>8 let) in nosečnice zdravijo z rifampinom ali trovafloksacinom (Bakken in Dumler, 2000; Blanco in Oteo, 2002; Horowitz in sod., 2000).

Preprečevanje HGA je omejeno na uporabo repellentov, osebne zaščite (s primerno obleko in obutvijo), natačno pregledovanje telesa po vrnitvi iz področij, kjer je prekuženost s klopi velika in odstranjevanje prisesanih klopor.

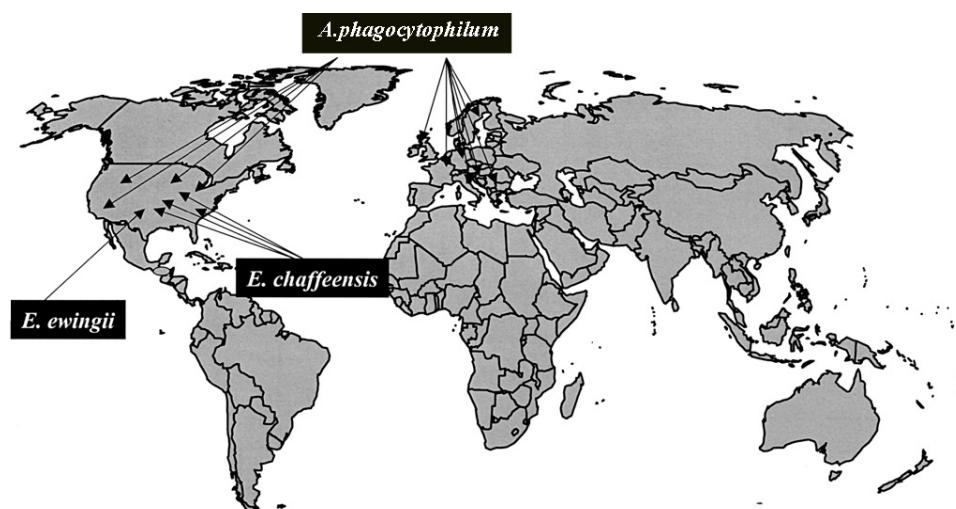
2.2.8 Epidemiologija okužb z bakterijo *A. phagocytophilum*

Anaplaste so danes opisane na vseh kontinentih sveta z izjemo Avstralije (slika 2). Največ primerov je opisanih v ZDA, kjer so tudi prvi odkrili, da povzroča bakterija *A. phagocytophilum* bolezen pri človeku. Na severovzhodnem delu in osrednjem delu ZDA je glavni prenašalec bakterije klop *Ixodes scapularis*, na zahodnem pacifiškem delu ZDA pa klop *Ixodes pacificus*. Nekatere študije so pokazale, da je prekuženost klopa *I. scapularis* z bakterijo *A. phagocytophilum* nad 50 %, medtem je pri *I. pacificus* okužen le v 7 %. Incidenca okuženosti v osrednjem delu ZDA in v zvezni državi Connecticut naj bi bila 58 in 51 primerov bolezni na 100,000 prebivalcev. Prava incidenca bi naj bila še večja, saj večina držav nima uvedenega sistema spremmljanja bolezni. Največ primerov HGA je v poletnih mesecih, predvsem junija in novembra. Bolezen v ZDA najbolj prizadene moške (78 %) s povprečno starostjo 60 let, ki delajo v gozdnem okolju in so utrpeli vbod klopa (McBride in Walker, 2006).

V Evropi je glavni prenašalec bakterije klop *I. ricinus*. Prvi dokazan primer HGA so odkrili leta 1997 v Sloveniji (Petrovec in sod., 1998). Od takrat pa vse do marca 2003 so v Evropi dokazali 65 novih primerov HGA (Strle, 2004). Prekuženost klopor v Evropi z bakterijo *A. phagocytophilum* variira med 0,4 % in 66,7 %. Tudi v Evropi je največ okužb v poletnih mesecih. Najpogosteje je okužena moška populacija (53 %), medtem ko je povprečna starost

okuženih 38 let. V Evropi še ni bilo smrtnega primera bolnika okuženega z *A. phagocytophilum* (Blanco in Oteo, 2002; Parola, 2004).

Med letoma 1996 in 2004 so v Sloveniji potrdili 24 primerov HGA (Lotrič-Furlan, 2006). Po podatkih iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani je bilo med letoma 2005 in 2007 dokazanih še 18 novih primerov HGA, pri čemer so 7 bolnikov potrdili tudi s PCR. Prekuženost klopor z anaplastzo je 3,2 % (Petrovec in sod., 1998). HGA je v Sloveniji porajajoča se zoonoza.



Slika 2: Razširjenost *A. phagocytophilum*, *E. ewingii* in *E. chaffeensis* po svetu (Parola in Raoult, 2001)

2.3 PRENAŠALCI IN GOSTITELJI BAKTERIJE *Anaplasma phagocytophilum*

Za uspešno razmnoževanje in ohranjanje v naravi potrebujejo anaplastme prenašalca in primernega gostitelja. Glavni prenašalci anaplastme so klopi. V vzhodnem delu ZDA je glavni prenašalec bakterije *A. phagocytophilum* klop *I. scapularis*, medtem ko pa na zahodnem delu ZDA klop *I. pacificus*. V Evropi je najbolj znan prenašalec anaplastme navadni gozdni klop *Ixodes ricinus*, medtem ko v Aziji klop *I. persulcatus* (Bakken in Dumler, 2000).

Klop se hrani na številnih živalskih vrstah. Največkrat so gostitelji bakterije mali gozdní sesalci kamor spadajo navadna belonoga miš (*Apodemus sylvaticus*), rumenogrla miš (*Apodemus flavicollis*), gozdna rovka (*Sorex araneus*), voluharica (*Myodes glareolus*) (Blanco in Oteo, 2002). Tudi pri ovcah, kozah, konjih in psih so že odkrili granulocitno anaplazmo (Parola, 2004), medtem ko pa so v Sloveniji zelo pogosto okuženi jeleni, gamsi in srne (Petrovec in sod., 2002).

2.3.1 Klopi

Klope prištevamo v razred *Arachnida* ali pajkovcev in so poleg pršic najmanjši pajkovci. So značilni ektoparaziti živali in človeka, ki sesajo kri in so razširjeni po vsem svetu (Logar, 1999). Znani so kot prenašalci različnih mikroorganizmov, ki povzročajo bolezni pri ljudeh. Izmed bolezni, ki jih prenašajo klopi v Sloveniji, sta najbolj pogosti in endemični Lymska borelioza in klopní meningoencefalitis (Lotrič-Furlan in sod., 2006).

2.3.2 Taksonomija klopor

Klope uvrščamo v dve glavni družini: *Ixodidae* ali trdi, ščitasti klopi (okrog 713 vrst) in *Argasidae* ali mehki, usnjati klopi (okrog 185 vrst). Tretjo družino predstavlja *Nuttalliellidae*, kjer je znana samo ena vrsta v južni Afriki in ima lastnosti obeh prej navedenih družin (Steen in sod., 2006).

Klopi družine *Ixodidae* se razlikujejo od klopor družine *Argasidae* po značilnem hrbtnem ščitu, ki ga sestavlja ovalna hitinska ploščica in omogoča povečanje med hranitvijo. Ustni deli ščitastih klopor so dobro vidni in navadno štrlijo pred ščitkom, medtem ko pri usnjatih klopih ustni deli ležijo ventralno in od zgoraj niso vidni. Vse razvojne oblike usnjatih klopor se lahko večkrat hranijo s krvjo, medtem ko pa se vsaka razvojna stopnja ščitastih klopor hrani le enkrat na gostitelju. Samica ščitastih klopor izleže po oploditvi nekaj tisoč jajčec in pogine, samica usnjatih klopor pa lahko večkrat leže okoli 150 jajčec in pri tem ne pogine. V

nasprotju s ščitastimi klopi se lahko tudi odrasli usnjati klopi levijo (Logar, 1999; Parola in Raoult, 2001).

2.3.3. *Ixodes ricinus*

Med medicinsko najpomembnejše klope spadajo trdi ali ščitasti klopi družine *Ixodidae*, ki imajo tudi največ predstavnikov. Medicinsko pomembni rodovi ščitastih klopor so: *Ixodes Boophilus, Amblyomma, Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma* in *Rhipicephalus*. V rod *Ixodes* spada navadni gozdni klop *Ixodes ricinus*, ki je prenašalec številnih medicinsko pomembnih organizmov (Logar, 1999).

2.3.3.1 Življenjski prostor klopor

Klop *Ixodes ricinus* je razširjen po vsej Evropi, od Irske, Velike Britanije in skandinavskih držav, preko srednje Evrope do sredozemskega morja. V naravi najpogosteje prebivajo v prizemeljskem sloju ob gozdnih robovih, kjer se strnjen gozd konča in prehaja v travniško rastje. Radi se naselijo na grmovju, nizkem rastlinju in gozdnih podrasti. Zelo pogosti so tudi na pašnikih in travnikih, še posebej v obdobjih med košnjami (Sonenshine, 1993).

2.3.3.2 Anatomija klopor

Klopov življenjski cikel ima tri razvojne stopnje (slika 3): ličinko, nimfo in odraslo žival.



Slika 3: Razvojne stopnje klopovalcev: Odrasla samica, odrasli samec, nimfa in ličinka (Parola in Raoult, 2001)

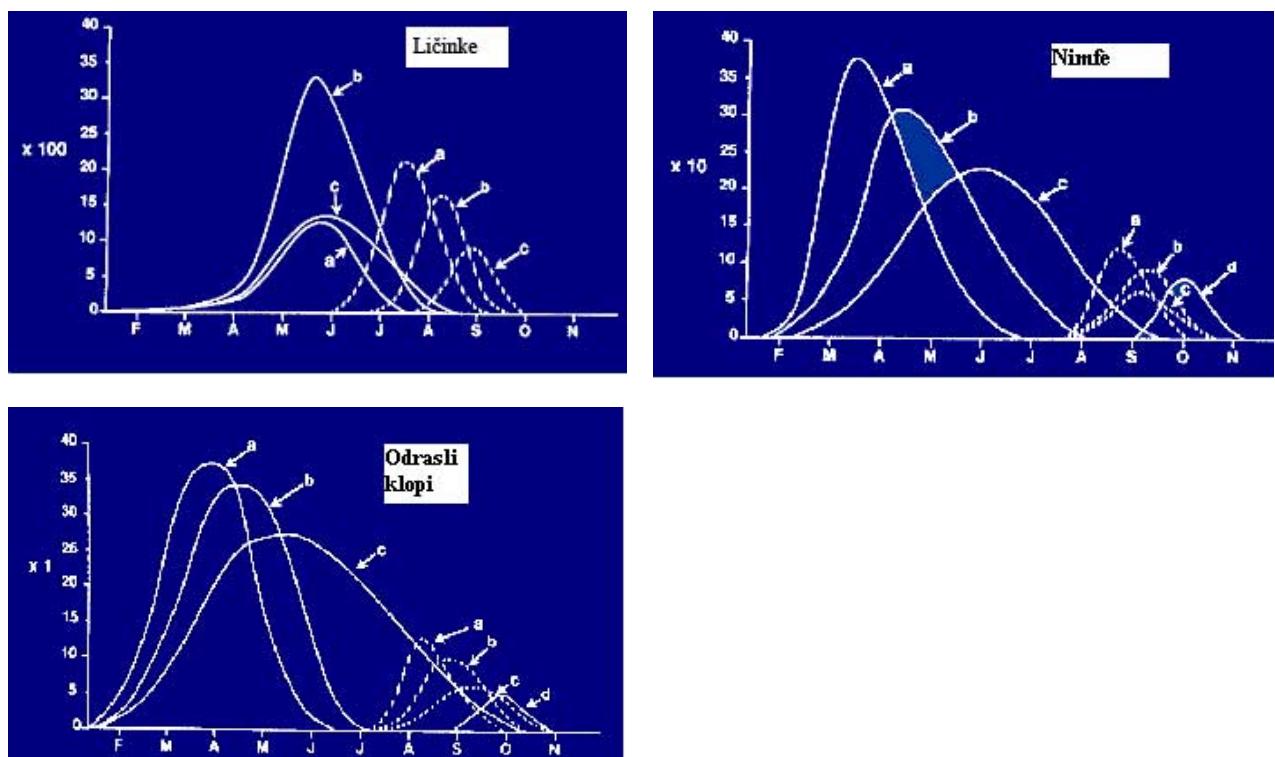
Odrasli klopi zrastejo okoli 2 do 3 mm, ličinke pa do 1 mm. Ko se samica napije doseže velikost do 10 mm in več. Moški in ženski spol ločimo le pri zadnji razvojni stopnji, kjer je samec znatno manjši od samice. Na dorzalni strani telesa je hitinski ščit, ki je pri samcih na celotni sprednji strani, na samicah pa le na prednji tretjini telesa, kar ji omogoča, da se močno nasesa krvi in poveča za 10-krat (Parola in Raoult, 2001).

Glavooprsje in zadek sta združena v celoto, v nečlenast meh. Odrasli klopi in nimfe imajo štiri pare nog, ličinke pa tri pare nog. Na sprednjem delu telesa se nahajajo ustni deli, par palp in rostrum, s katerim vbadajo. Ta ima hipostom, ki je oborožen z zobci, in par helicer, s katerimi se zarije v kožo. Zobci na hipostому so zasukani nazaj za čvrstejšo in trdno pritrditev na kožo gostitelja. Vse razvojne stopnje se hranijo s krvjo. Brez krvnega obroka razvojne oblike niso zmožne levitve, odraslim samicam pa ne dozorijo jajčeca (Logar, 1999; Wilson, 1994). Večina klopovalcev nima oči, ampak imajo značilne periferne organe, kot so lasem podobne strukture na površini telesa, nog in na ustnem delu ter čutilni organ na hrbtni površini prvih nog, Hallerjev organ. Ti čutilni organi omogočajo klopu, da poiščejo gostitelja, partnerje za parjenje in ustrezni mikrohabitat (Spielman in Hodgson, 2000; Belozerov, 2001).

2.3.3.3 Življenjski krog klopor

Življenjski krog klopor vrste *I. ricinus* traja okrog 2 do 3 leta. Preobrazba iz ene razvojne stopnje v drugo ponavadi traja eno leto, življenjski krog klopa pa je ponavadi izpolnjen v treh letih. Dolžina razvojnega kroga je odvisna od temperturnih razmer, sezone, v kateri se klop razvija in razpoložljivosti gostiteljev (Parola in Raoult, 2001).

Vse razvojne stopnje prezimijo v zgornjih plasteh zemlje ali pod odpadlim listjem. Klopi postanejo aktivni, ko je dnevna temperatura okrog 7 °C in temperatura prsti okrog 4 °C (Sonenshine, 1991). Pri iskanju gostiteljev in partnerjev za parjenje imajo pomembno vlogo feromoni. Parjenje se večinoma odvija na gostitelju pred začetkom sesanja krvi. Oplojena samica zapusti gostitelja, pade na tla in po 2-20 dneh izleže od 2000 do 120000 jajčec. Samica nato pogene. Jajčeca zorijo nekaj tednov odvisno od temperature, vlage in drugih okoljskih razmer. Iz jajčec se razvije ličinka, ki je že po nekaj dneh pripravljena na hranjenje. Ko ličinke najdejo gostitelja, se na njem hrani 2-3 dni, pri tem se njihova masa lahko poveča za 10 do 20-krat. Po hranjenju pade nazaj na vegetacijo in se v nekaj mesecih preobrazijo v nimfo. Tudi za levitev potrebujejo gostiteljevo kri. Nimfe lahko mirujejo precej časa preden se preobrazijo v klopo. Preobrazijo se v odrasle samce ali samice. Odrasla samica se na gostitelju hrani od 7 do 11 dni, medtem ko se samec lahko hrani večkrat z manjšimi količinami krvi. Tako si zagotovi parjenje s samicami (Logar, 1999; Spielman in Hodgson 2000). Klopi vrste *I. ricinus* se hrani na gostiteljih od marca do oktobra. Za klope je značilna dvojna sezonska aktivnost (slika 4). Najbolj so aktivni pozno spomladi in zgodaj poleti ter ponovno zgodaj jeseni. Aktivnost klopor je jeseni nekoliko manjša zaradi krajšanja dnevov in nižanja temperature (Sonenshine, 1993; Korenberg, 2000).



Slika 4: Grafični prikaz sezonske aktivnosti ličink, nimf in odraslih klopor vrste *Ixodes ricinus* v različnih okoljih (Sonenshine, 1993)

Legenda:

neprekinjene krivulje- spomladanska aktivnost klopor
prekinjene krivulje- jesenska aktivnost klopor.

a- travnik, b- listnat gozd in gosta gričevnata vegetacija, c- gozd na višjih predelih, d- klopi, ki so se spomladini levili in jeseni hranili.

Za klope je značilna tudi diapavza, ki je hormonsko voden proces z nizko stopnjo metabolne aktivnosti. Morfogenetska diapavza omogoča klopu, da se uspešno preobrazijo iz ene razvojne stopnje v novo. Vedenjska diapavza pa omogoča klopu, da dalj časa preživijo v ekstremnih okoliščinah brez hrane (Sonenshine, 1993).

2.3.3.4 Iskanje gostitelja in hranjenje

Za obstoj in preživetje klopa sta pomembni relativna vlažnost zraka in zadostno število različnih gostiteljev. Vsaj 80 % vlažnost v zraku je potrebna, da lahko klop preživi dlje časa brez gostitelja. Klopi so relativno občutljivi na sušenje in se običajno nahajajo v gozdovih,

kjer je relativna vlažnost visoka in ni suhih mest. Vodo pridobivajo z direktno absorbcijo atmosferske vlage (Spielman in Hodgson, 2000).

Kri vretenčarjev je vir hrane za klopa. Vsaka razvojna stopnja se na gostitelju hrani samo enkrat. Klopi večino svojega življenja preživijo na zemlji med vegetacijo. Klopi iščejo in zaznavajo gostitelje s pomočjo Hallerjevega organa na prednjem prvem paru nog. Ta zaznava spremembo koncentracij CO₂ in NH₃, vibracije v zraku in telesno temperaturo. Strategije iskanja gostiteljev se razlikujejo glede na razvojno stopnjo. Ličinke se v večini primerov zadržujejo na nizkem rastlinju, kjer bodo srečale majhne sesalce, ptiče, ki se hranijo na zemlji, in ostale gostitelje. Odrasli klopi in nimfe splezajo na višje rastline in se hranijo na večih živalih, kot so jeleni, srne, ovce in na človeka. Klopi lahko čakajo na gostitelja na spodnji strani listov ali skriti v tleh po več ur (Spielman in Hodgson, 2000).

Klopi so lahko glede na odnos do gostitelja specifični za enega gostitelja ali pa parazitirajo na večih gostiteljih. *I. ricinus* se običajno hrani na večih gostiteljih, zlasti na velikih in malih sesalcih, pa tudi ptičih (Sonenshine, 1993).

Ko klopi naletijo na gostitelja, si poiščejo ustrezeno mesto za pritrjevanje in hranjenje na koži gostitelja. Svoj rilček vbodejo v kožo, se zarijejo s helicerami naprej in razširijo ranico za hipostom. Zobci na hipostому so zasukani nazaj, kar pritrdi klopa na kožo (Logar, 1999). Sledi izločanje lepila, ki prepoji rano in se razširi navzven na kožo v področju okoli ust. Lepilo izločajo žleze slinavke in služi za pritrjanje klopa na gostitelja. Izločanje lepila traja 2 do 3 dni. V lepilu so antikoagulansi, antihistaminiki, lokalni anestetiki, toksini in ostali encimi, ki olajšajo sesanje krvi. Po dolgotrajnem pritrjanju sledi sesanje krvi (Sonenshine, 1993). Klopi lahko s svojim vbodom povzročijo mehanične poškodbe, alergije, toksikoze, klopne paralize in bolezni, saj prenašajo patogene mikroorganizme in praživali (Logar, 1999).

2.3.4 Navadni gozdni klop *Ixodes ricinus* v Sloveniji

V Sloveniji je razširjenih 16 vrst kloporodcev. Najpogostejsa in splošno razširjena vrsta v Sloveniji je gozdni klop *I. ricinus*. Vse ostale vrste imajo omejeno razširjenost ali so ekološko specializirane. Klope vrste *I. ricinus* najdemo v ekoloških nišah od morske obale do nadmorske višine 1000 m. Preživetje klopa je odvisno od temperature in vlage v okolju. Temperaturno območje za normalno aktivnost klopa je od 14 °C do 24 °C, najugodnejša vlažnost za klopa pa je med 92 % in 95 %. V Sloveniji je za klopa značilna dvojna sezonska aktivnost z vrhom spomladis in jeseni.

Klop *I. ricinus* je v Sloveniji prenašalec številnih patogenih mikroorganizmov: babezij, borelij, virusa klopnega meningoencefalitisa, rikecij in erlihij (Duh, 2002).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Klopi

V letih 2005 in 2006 smo nabirali klope na osmih določenih lokacijah v Sloveniji. Nabirali smo jih mesečno z metodo zastave na nizkem rastlinju in grmičevju ob robu gozda.

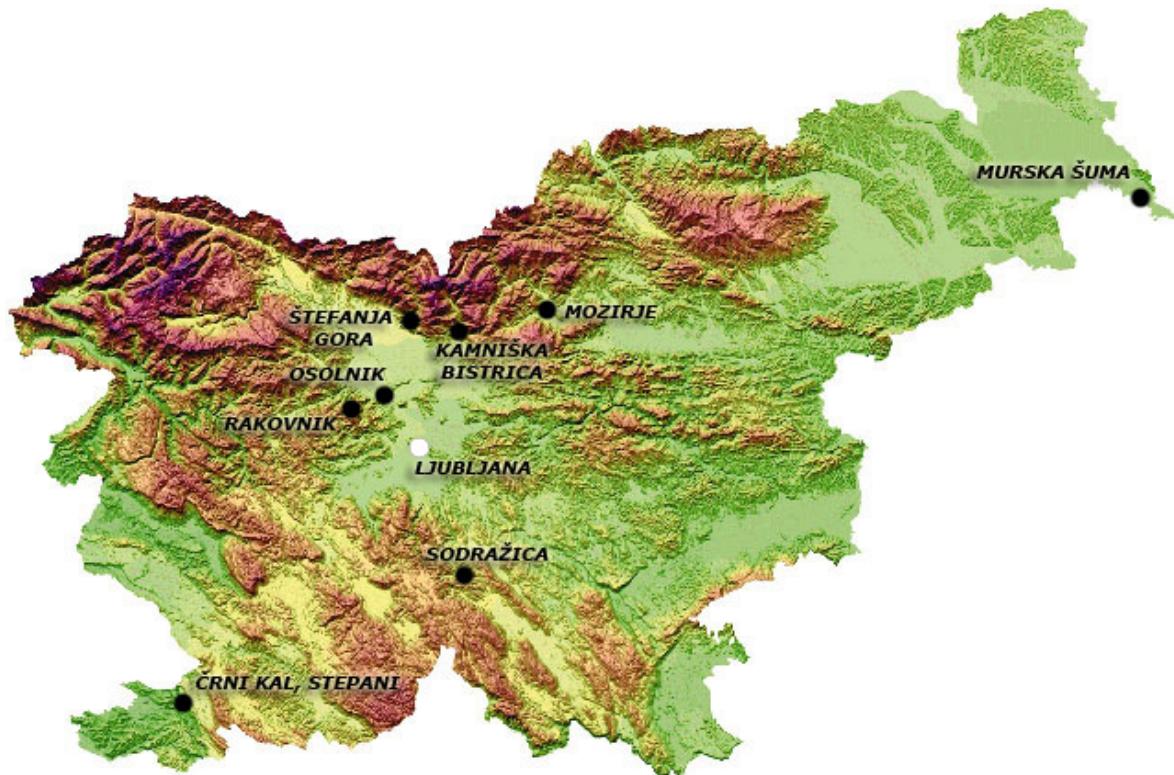
3.1.2 Lokacije

Izbrali smo osem lokacij v Sloveniji (slika 5) glede na pojavljanje HGA. Kriterija sta bila incidenca in prevalenca HGA na izbranih območjih Slovenije. Dokazali so namreč, da je endemsko območje bolezni tesno povezano s stopnjo prekuženosti klopor z mikroorganizmi, ki povzročajo to bolezen (Parola, 2004).

Preglednica 1 prikazuje ime in občino lokacije, zemljepisno širino in dolžino ter nadmorsko višino lokacije. Lokacije smo zaradi preglednosti označili z različnimi barvami: Črni kal-rdeča, Kamniška bistrica- bela, Mozirje- rumena, Murska šuma- oranžna, Osolnik- vijolična, Rakovnik- zelena, Sodražica- roza in Štefanja gora- modra.

Preglednica 1: Podatki o lokacijah nabiranja klopoval: ime in občina lokacije, zemljepisna širina in dolžina ter nadmorska višina

Ime lokacije	Občina lokacije	Zemljepisna širina	Zemljepisna dolžina	Nadmorska višina
Črni kal, Stepani	Koper	13°51'29.93"	45°32'57.83"	153 m
Kamniška bistrica	Kamnik	14°35'16.74"	46°19'34.14"	590 m
Mozirje	Mozirje	14°57'17.12"	46°8'50.99"	389 m
Murska šuma	Lendava	16°31'47.59"	46°29'35.51"	153 m
Osolnik	Medvode	14°20'27.43"	46°8'6.08"	817 m
Rakovnik	Medvode	14°22'56.65"	46°8'50.99"	322 m
Sodražica	Sodražica	14°39'14.48"	45°45'24.01"	534 m
Štefanja gora	Cerknje na Gorenjskem	14°28'33.82"	46°17'12.7"	685 m



Slika 5: Geografska karta Slovenije z označenimi lokacijami nabiranja klopoval

3.2 METODE

3.2.1 Metoda zastave

Metoda zastave je najpogosteje uporabljana metoda za nabiranje klopor iz vegetacije (Sonenshine, 1993; Wilson, 1994). Na leseno palico smo pritrdili belo bombažno tkanino v velikosti 1 m^2 in jo vlekli po nizkem rastlinju in grmičevju ob gozdnih obronkih. Naredili smo 40 potegov na vsakih 2,5 m. Ob vsakem potegu smo na obeh straneh tkanine s sesalno napravo, ki smo jo sami naredili, pobrali klope in jih shranili pri $4\text{ }^\circ\text{C}$ v posodicah (slika 6). V posodice smo dodali vlažen list trave, ki ohranja primerno vlažnost. V takih razmerah preživijo dva do tri tedne.



Slika 6: Metoda zastave in sesalna naprava, s katero smo nabirali klope.

3.2.2 Razkuževanje klopor

Na površini klopor se lahko nahaja mnogo netarčnih mikroorganizmov in umazanije, ki delujejo kot inhibitorji PCR (Sparagano in sod. 1999). Zato smo klope pred osamitvijo celokupne DNA očistili in razkužili.

Delo je potekalo v biološki komori II.varnostne stopnje (laminariju). Pri tem smo uporabljali rokavice in aseptično tehniko dela. Klope, ki so bili shranjeni v hladilniku na 4 °C, smo najprej prenesli v petrijevko, v kateri je bil 70 % etanol. Po petih minutah smo jih prenesli v drugo petrijevko, v kateri je bila sterilna destilirana voda in jih tam pustili dve minuti. Očiščene in razkužene klope smo shranili v sterilnih tubicah do nadaljnje obdelave pri -20 °C.

3.2.3 Razvrščanje klopor

Zaradi velikega števila nabranih klopor smo različne razvojne stopnje klopor razvrstili in organizirali v smiselne skupine. Očiščene odrasle klope smo razvrščali ločeno glede na spol in jih vzorčili po pet skupaj v en vzorec. Nimfe smo vzorčili po deset skupaj in ličinke po 30 skupaj v en vzorec. Vsako tubico smo barvno označili glede na lokacijo in jo oštevilčili z zaporedno številko in črko A (nimfe in ličinke) ali B (odrasle samice in samci). Če smo poleg oznake dodali zvezdico, je pomenilo, da vzorec ni bil popoln in je bilo v tubici manj kot 10 nimf ali 30 ličink.

3.2.3 Homogenizacija klopor

Pred začetkom dela smo laminarij obsevali z UV lučjo in še dodatno počistili delovno površino, stojala in pipete s 5 % natrijevim hipokloritom. Uporabljali smo sterilne pripomočke (nastavki za pipete, objektna stekelca, skalpel, posodice, kovinske kroglice, pincete, 1,5 ml tubice). Uporabljali smo rokavice in jih pogosto menjavali pri samem delu. Na ta način smo zmanjšali morebitno verjetnost okužbe s patogenimi mikroorganizmi in tudi verjetnost kontaminacije vzorcev med delom.

Očiščene in razkužene klope, ki smo ji shranili v zmrzovalniku na -20 °C, smo pripravili za homogenizacijo. Odrasle klope smo prenesli na sterilno objektno stekelce, ki smo ga predhodno obrisali in razkužili z 70 % etanolom. S sterilnim skalpelom smo jih prerezali na polovico. Eno polovico smo shranili v sterilno posodico na -20 °C za nadaljne raziskave in jo

ustrezno označili. Drugo polovico smo pa prenesli v sterilno 1,5 ml tubico, v kateri smo predhodno pripravili 245 µl filtriranega fosfatnega pufra (PBS, angl. Phosphate Buffer Saline) in kovinsko kroglico. V vsako tubico smo združevali po pet polovic odraslih klopor, medtem ko nimf in ličink nismo rezali ampak le prenesli v tubice. Tubice smo nato vstavili v homogenizator TissueLyser (proizvajalec Retsch za Qiagen, Hilden, Nemčija). Ta deluje tako, da stresa tubice z različnimi frekvencami stresanja, v katerih je kovinska kroglica, ki trga in homogenizira tkivo klopor. Po 5 minutah homogenizacije s frekvenco 50 Hz smo prenesli 100 µl homogenizata v nove tubice, jih ustrezzo označili in ga uporabili za osamitev celokupne DNA. Preostali homogenizat smo shranili na -20 °C za nadaljne raziskave.

3.2.4 Osamitev celokupne DNA iz klopor

Vzorcem homogenizata smo dodali razgradno mešanico, ki je vsebovala 180 µl razgradnega pufra ATL (angl. Tissue Lysis Buffer) in 20 µl proteinaze K ter inkubirali v termomikserju čez noč na 56 °C.

Celokupno DNA iz klopor smo izolirali z izolacijskim setom BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija), ki temelji na tehnologiji magnetnih delčkov, na katere se veže DNA. Osamitev DNA je potekala po opisanem protokolu za osamitev DNA iz tkiv.

Laminarij smo najprej sterilizirali z UV svetlobo, nato pa še razkužili delovno površino, stojala in pipete z 5 % natrijevim hipokloritom. V posebni posodici smo pripravili raztopino mešanice iz 200 µl pufra AL (angl. Lysis Buffer), 200 µl izopropanola in 30 µl suspenzije magnetnih delčkov.

V stripe smo odpipetirali posamezne reagente potrebne za osamitev DNA v naslednjem vrstnem redu:

- Na 5. mesto smo odpipetirali 70 µl pufra AE (angl. Elution Buffer).
- Na 2. mesto smo odpipetirali 700 µl pufra AW1 (angl. Wash Buffer 1).
- Na 3. in 4. mesto 500 µl pufra AW2 (angl. Wash Buffer 2).

- Na 1. mesto 430 µl mešanice raztopine in še 200 µl celotnega lizata.

Strip smo nato vstavili v posebno stojalo in ga namestili v aparaturo KingFisher mL (Thermolab Systems, ThermoElectron Corporation, Hampshire, Velika Britanija). Aparat služi avtomatski osamitvi DNA.

Po končani osamitvi DNA smo prenesli celotno izolirano DNA iz 5. mesta v nove sterilne tubice, jih oštevilčili in shranili v zmrzovalnik na -20 °C do nadaljnje obdelave. Po končanem delu smo komoro, stojalo in pipete razkužili s 5 % hipokloritom ter še za 10 minut obdelali z UV svetlobo.

3.2.5 Pomnoževanje izolirane bakterijske DNA

3.2.5.1 Izbira začetnih oligonukleotidov

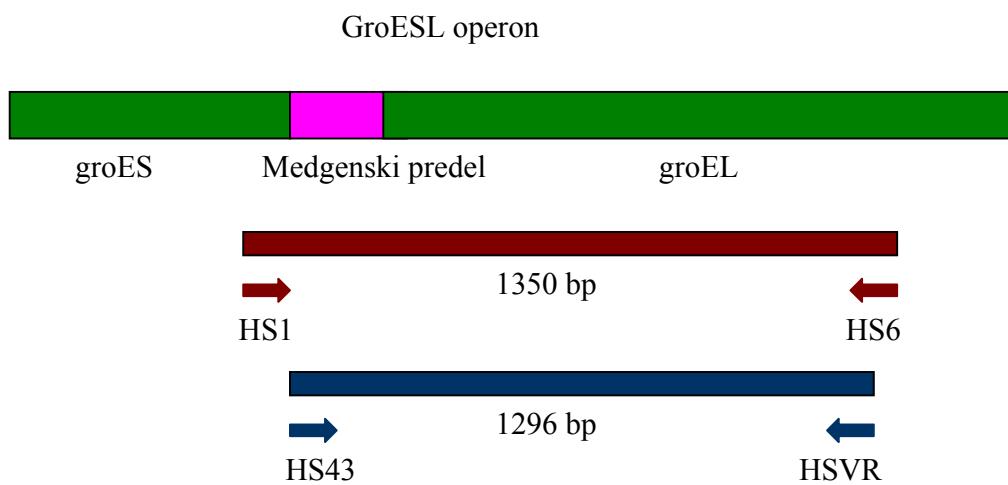
Pravilna izbira začetnih oligonukleotidov je ključni element pri optimizaciji in izvedbi PCR. Začetni oligonukleotidi so kratki, značilni odseki DNA, komplementarni z mejnima deloma tarčnega odseka genoma, ki ga želimo pomnožiti. Od medsebojne razdalje začetnih oligonukleotidov je odvisna tudi velikost na novo nastalih delcev DNA.

Za preverjanje osamitve celokupne klopne DNA smo uporabili začetna oligonukleotida 16S-1 (nukleotidno zaporedje: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3') in 16S+2 (nukletidno zaporedje: 5'-TTGGGCAAGAACGCCATTGAA-3'), s katerima smo pomnoževali 290 bp dolg odsek klopne mitohondrijske 16S rRNA (Black in Piesman, 1994).

Za dokazovanje DNA predstavnikov rodu *Ehrlichia* sp. (*E. canis*, *E. caaffeensis*) in *Anaplasma* sp. (*A. platys*, *A. phagocytophilum*) v PCR v realnem času smo uporabili začetna oligonukleotida EHR521 (nukleotidno zaporedje: 5'-TGTAGGCGGTCGGTAAGTTAAAG-3') in Ehr790 (nukleotidno zaporedje: 5'-

CTTAACGCGTTAGCTACAACACAG-3'), ki pomnožujeta 293 bp dolg odsek 16S rDNA (Petrovec in sod., 2002; Petrovec, 1999).

Za pomnoževanje regije operona GroESL in dokaz DNA bakterije *A. phagocytophilum* smo uporabili t.i. sistem PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (angl. nested PCR). S parom zunanjih začetnih oligonukleotidov HS1 (nukleotidno zaporedje: 5'-AITGGGCTGGTAITGAAAT-3') in HS6 (nukleotidno zaporedje: 5'-CCICCIGGIACICCTTC-3') smo pomnoževali 1350 bp odsek operona GroESL. HS43 (nukleotidno zaporedje: 5'-AT(A/T)GC(A/T)AA(A/G)GAAGCATAGTC-3') in HSVR (nukleotidno zaporedje: 5'-CTAACACAGCAGCTCTAGTAGC-3') oligonukleotida sta se pripenjala znotraj tarčnega dela HS1 in HS6 začetnih oligonukelotidov in pomnoževala 1296 bp dolg odsek DNA, ki vsebuje konec groES gena, medgensko nekodirajočo regijo in približno dve tretjini groES gena operona GroESL (slika 7). Z notranjimi začetnimi oligonukleotidi smo povečali občutljivost in specifičnost reakcije PCR (Petrovec in sod., 1998; Petrovec in sod., 2002).



Slika 7: Shematski prikaz operona GroESL in položaja začetnih oligonukleotidov HS1, HS6, HS43 in HSVR ter velikosti pridelkov PCR

3.2.5.2 Preverjanje uspešnosti osamitve klopne DNA

Uspešnost osamitve klopne DNA smo preverili z metodo PCR, pri kateri smo pomnoževali klopno mitohondrijsko 16 rRNA. Pripravili smo 25 µl reakcijsko mešanico, ki je vsebovala:

- 2,5 µl 10×koncentriranega PCR pufra II,
- 2 µl MgCl₂ (25mM),
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida 16S-1,
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida 16S+2,
- 0,1 µl polimeraze Taq,
- 15,4 µl deionizirane vode.

Reakcija je potekala v aparatu Eppendorf Mastercycler® ep (Hamburg, Nemčija). Temperaturni cikli, ki so si sledili:

- 10 ciklov:
 - 45 sekund pri 92 °C,
 - 45 sekund pri 48 °C,
 - 1 minuta pri 72 °C
- 30 ciklov:
 - 35 sekund pri 92 °C,
 - 35 sekund pri 54 °C,
 - 1 minuta 72 °C.
- ohlajevanje na 4 °C.

V agaroznem gelu smo preverili navzočnost pomnoženega pridelka in s tem preverili uspešnost osamitve klopne DNA.

3.2.5.3 PCR v realnem času

3.2.5.3.1 Teoretične osnove

Leta 1985 je razvoj verižne reakcije s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) zelo olajšal študij genetskega materiala, saj je PCR postal nepogrešljivo orodje v raziskovalnih in diagnostičnih laboratorijih. V današnjem času predstavlja eno izmed močnih orodij na področju molekularne biologije tehnologija PCR v realnem času (Arko, 2004).

PCR v realnem času omogoča merjenje količine pridelkov v vsakem ciklu med samo reakcijo (Ginzinger, 2002). Pomnoževanje in zaznavanje pridelkov PCR v realnem času potekata sočasno, medtem ko pri PCR poteka zaznavanje pridelkov po končanem pomnoževanju z elektroforezo na agaroznem gelu (Arko, 2004).

Dokaz pridelkov temelji na merjenju fluorescence in jih odkrivamo na dva načina:.

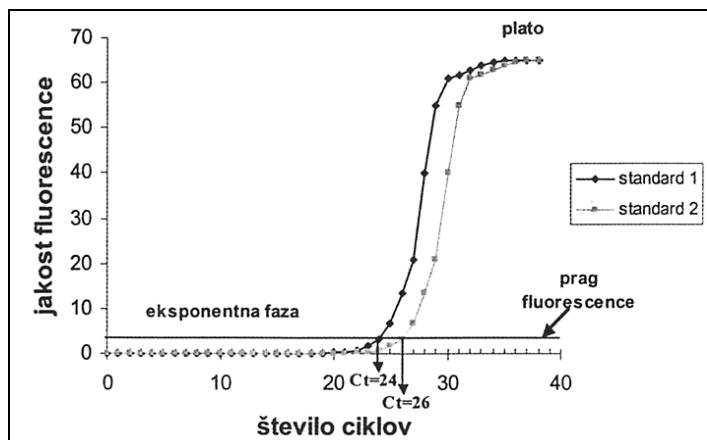
- Nespecifični načini dokazovanja pridelkov- uporabimo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvostransko DNA. Primera sta etidijev bromid, ki se danes skoraj ne uporablja več in SYBR® Green I (Mackay in sod., 2002). Prost SYBR Green I ne fluorescira, ko pa se vgradi v nastajajočo dvostransko DNA, pa ob eksitaciji močno fluorescira (slika 8). Količina fluorescence je sorazmerna s količino nastale dvostranske DNA. Slabost barvila Sybr Green I je nespecifična vezava na vsako dvostransko DNA, kamor spadajo tudi oligonukleotidni dimeri in drugi nespecifični pridelki reakcije (Foy in Parkes, 2001).



Slika 8: Nespecifični način detekcije pridelkov PCR v realnem času s Sybr Green I (Arko, 2004)

- Specifični načini detekcije pridelkov- S flourokromi označene sonde se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo princip fluorescenčnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo. Najpogosteje se uporablja FRET sonde, TaqMan sonde in molekularna svetila (Foy in Parkes, 2001).

Nepretrgano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino pridelkov PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. To naredimo tako, da na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (slika 9).



Slika 9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času

Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko preseže ta prag (C_t). Pri večjem začetnem številu kopij matrice, signal prej preseže ta prag in tako določimo nižji C_t . Če je razlika C_t med dvema vzorcema 1, to pomeni, da je razlika v količini matrice 2-kratna. S primerjavo vrednosti C_t vzorcev z vrednostmi C_t standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu (Klein, 2002; Niesters, 2001).

PCR v realnem času odlikuje široko dinamično območje (7-8 log₁₀ kopij matrice), kar omogoča sočasno analizo vzorcev z različnimi koncentracijami, visoka občutljivost (<5 kopij matrice) in ponovljivost. Poteka v zaprtem prostoru in odpravlja potrebe po dodatnih postopkih po končani PCR reakciji, kar skrajša čas analize in zmanjša možnost kontaminacije. Omogoča kvantificiranje točno določene DNA v začetnem vzorcu. Prisotnost DNA dokažemo iz živih in mrtvih patogenih organizmov, medtem ko s klasičnimi mikrobiološkimi testi (npr. osamitvijo v celični kulturi) dokazujemo le žive mikrorganizme. Pri izbiri odseka, ki ni specifičen za določen patogen organizem, lahko pride pri pomnoževanju tega odseka do lažno pozitivnih rezultatov. Do lažno negativnih rezultatov pa lahko pride ob izbiri odseka, ki ima visoko stopnjo mutacij (Klein, 2002; Espy in sod., 2006).

3.2.5.3.2 Preverjanje prisotnosti bakterijske DNA s PCR v realnem času

S PCR v realnem času smo po osamitvi celokupne DNA preverili prisotnost DNA bakterije *A. phagocytophilum* v klopih. Za dokazovanje bakterijske DNA smo uporabili par začetnih oligonukleotidov EHR521 in EHR790, ki specifično pomnožujeta 293 bp dolg odsek 16S rDNA granulocitnih erlihij (Petrovec in sod., 1998). Z izbranimi začetnima oligonukleotidoma pomnožujemo 16S rDNA predstavnikov iz rodu *Ehrlichia* sp. in *Anaplasma* sp., kamor spada tudi *Anaplasma phagocytophilum*.

Uporabili smo komplet reagentov Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, ZDA).

25 µl reakcijska mešanica je vsebovala:

- 12,5 µl 2× koncentrirane reakcijske mešanice Platinum Sybr SuperMix (mešanico encima Platinum Taq DNA polimeraze, ki pomnožuje tarčni odsek, encima UDG, ki preprečuje kontaminacijo s PCR produkti, nespecifičnega barvila Sybr Green I in ostalih stabilizatorjev PCR reakcije),
- 0,15 µl začetnega oligonukleotida Ehr521,

- 0,15 µl začetnega olginukleotida Ehr790,
- 9,7 µl sterilizirane in deionizirane vode,
- 2,5 µl bakterijske DNA.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili DNA anaplastme izolirane iz bolnikovega vzorca, za negativno kontrolo pa ddH₂O. Reakcija je potekala v aparatu za pomnoževanje nukleinskih kislin RotorGene 3000 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Avstralija). Gre za aparat, ki je računalniško voden in sočasno spremišča pomnoževanje in nastajanje produktov na osnovi flourescence nespecifičnega barvila.

Najprej je stekla aktivacija encima UDG za 2 minuti pri 50 °C, nato aktivacija Platinum Taq polimeraze pri 95 °C za 4 minute ter reakcija v 40 temperaturnih ciklih:

- denaturacija tarčne DNA: 15 sekund pri 94 °C
- prileganje začetnih oligonukleotidov: 20 sekund pri 60 °C
- podaljševanje tarčnega odseka: 30 sekund pri 72 °C. V tem koraku smo merili fluorescenco pridelkov.

Po končani reakciji smo opravili analizo rezultatov na računalniku. Kot pozitivne vzorce smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linijo fluorescenčnega praga (C_t) (Leskovec, 2005).

3.2.5.4 Vgnezden PCR (angl. nested PCR)

Vzorce celokupne DNA, ki so bili pozitivni pri preverjanju prisotnosti DNA z metodo PCR v realnem času, smo uporabili za namnožitev tarčnega odseka DNA značilnega za bakterijo *A. phagocytophilum*. Gre za prikrojitev reakcije PCR, katera uporablja »vgnezden« (nested) set začetnih oligonukleotidov.

Metoda sestoji iz dveh reakcij PCR. Pri prvi, klasični reakciji PCR, uporabimo prvi set začetnih oligonukleotidov v 15 – 30 krogih pomnoževanja, nato prenesemo 1 µl nastalega pridelka v novo reakcijsko mešanico, kjer se nato izvaja drugi del pomnoževanja z notranjimi

začetnimi oligonukleotidi, ki se vežejo znotraj vezavnih mest prvega para začetnih olugonukleotidov.

Pri prvi reakciji PCR smo uporabili komplet reagentov PCR Master Mix (Promega, Madison, ZDA). Prva reakcija PCR je potekala v 50 µl reakcijski mešanici in je vsebovala:

- 25 µl 2× koncentrirane reakcijske mešanice PCR Master Mix,
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida HS1 (50 µM),
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida HS6 (50 µM),
- 5 µl bakterijske DNA,
- 19 µl sterilne deionizirane vode.

Reakcija je potekala v aparatu Eppendorf Mastercycler® ep (Hamburg, Nemčija). Temperaturni cikli, ki so si sledili:

- 2 minuti pri 95 °C,
- 40 ciklov:
 - denaturacija DNA: 30 sekund pri 94 °C,
 - prileganje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 52 °C,
 - podaljševanje tarčnega odseka: 1 minuto pri 72 °C,
- 5 minut pri 72 °C,
- ohlajanje na 4 °C.

V vgnezdenem PCR smo kot DNA matriko uporabili pridelek PCR pridobljen z začetnima oligonukleotidoma HS1 in HS6. Uporabili smo komplet reagentov PCR Master Mix (Promega, Madison, ZDA). Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 25 µl 2× koncentrirane reakcijske mešanice PCR MasterMix,
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida HS43,
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida HSVR,
- 23 µl sterilne deionizirane vode,

- 1 µl PCR pridelka pridobljenega s HS1 in HS6.

Reakcija je potekala v aparatu Primus 96 plus (MWB Biotech Inc., ZDA). Temperaturni cikli:

- 15 sekund pri 94 °C,
- 40 ciklov:
 - denaturacija DNA: 1 minuto pri 92 °C,
 - prileganje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 51 °C,
 - podaljševanje tarčnega odseka: 1 minuto 30 sekund pri 72 °C,
- 5 minut pri 72 °C,
- Ohlajevanje na 4 °C.

Pridelke obeh PCR smo po končani reakciji shranili pri 4 °C.

3.2.6 Elektroforeza pridelkov PCR v agaroznem gelu

Agarozna gelska elektroforeza uporabljamo za dokazovanje, ločevanje in čiščenje nukleinskih kislin in temelji na potovanju negativno nabitih nukleinskih kislin v električnem polju proti anodi. Hitrost potovanja DNA je odvisna od večih dejavnikov:

- velikosti in oblike DNA (krajše (manjše) molekule DNA potujejo hitreje),
- koncentracije agaroze (višja koncentracija zmanjša hitrost potovanja molekul),
- napetosti električnega polja (pri višjih jakostih se začnejo fragmenti gibati hitreje, a je njihovo ločevanje slabše),
- sestave elektroforeznega pufra (pomembni sta sestava in ionska jakost pufra),
- interkalirajočih barvil (npr. etidijev bromid; s svojim vgrajevanjem zmanjša mobilnost molekul) (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

Pridelke PCR smo dokazovali z vodoravno elektroforezo v 2 % agaroznem gelu (agarosa NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA). Agarozni gel smo pripravili v 50 ml 1-koncentriranega TAE pufra (Tris acetat EDTA; vsebuje Tris bazo, natrijev acetat, natrijev

klorid in EDTA; pH je 8,3) in ga do vrelišča segrevali v mikrovalovni pečici. Raztopljen gel smo ohladili in barvali s 4,5 µl etidijevim bromidom ter ga nalili v plastični nosilec. Počakali smo, da se je strdil in ga nato vstavili v elektroforezno kadičko. Napolnili smo jo z 1× koncentriranim TAE pufrom tako, da je bil celoten gel prekrit s pufrom. V prvo vdolbinico smo nanesli molekularni označevalec lestvice DNA 100 bp (1 µg/µl, Gibco-BRL, Life Technologies, New York, ZDA), s katerim smo primerjali velikost pridelkov PCR. V ostale vdolbine smo nanesli 10 µl pridelka PCR in 2 µl nosilne raztopine (0,35 % brom-fenol modrilo) Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Nemčija). V zadnjih dveh vdolbinicah sta bili negativna in pozitivna kontrola.

Elektroforeza je potekala približno 30 minut pri napetosti 80V pri sobni temperaturi. Agarozni gel smo pregledali pod ultravijolično svetlobo in slikali s polaroidno kamero.

3.2.7. Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR

Z avtomatskim sekveniranjem smo določili nukleotidno zaporedje pridelkom PCR, ki smo jih pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov HS1 in HS6 ter HS43 in HSVR.

3.2.7.1 Čiščenje pridelkov PCR

Pred začetkom sekvenčne reakcije je potrebno pridelke PCR očistiti ostankov encima Taq polimeraze, začetnih oligonukleotidov in deoksiribonukleotidov. Očistili smo jih z uporabo komercialnega kompleta Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA). Čiščenje temelji na vezavi DNA na delce silicijevega dioksida v membrani posebne kolone in spiranju s pufri.

Pridelkom PCR smo dodali 40 µl MBS (angl. Membrane Binding Solution) in nato prenesli vse na membrano ter inkubirali na sobni temperaturi 1 minuto. Sledilo je centrifugiranje 1 minuto pri 14000 obratih/minuto, pri katerem se je pomnožena DNA vezala na membrano.

Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni tubici, smo odlili in na membrano nanesli 700 µl pufra MWS (angl. Membrane Wash Solution), s katerim smo spirali nečistoče. Centrifugirali smo 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Ponovno smo odlili tekočino iz zbiralne tubice in nanesli na membrano 500 µl pufra MWS ter centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih/minuto. Odlili smo tekočino iz zbiralne tubice in ponovno centrifugirali, tokrat brez pokrova centrifuge, 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. S tem smo se znebili alkoholnih hlapov med centrifugiranjem. V naslednjem koraku smo zavrgli zbiralno tubico in prenesli kolono z membrano v označeno 1,5 ml tubico. Sledilo je spiranje vezane DNA. Dodali smo 50 µl sterilne vode in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Nato smo centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Kolono z membrano smo zavrgli, očiščene pridelke PCR pa shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.7.2 Določanje koncentracije očiščene DNA

Pripravili smo 50 ml 1,6 % agaroznega gela (NuSieve GTG). Ko se je ta ohladil na približno 50 °C, smo dodali 5 µl etidijevega bromida. Na gel smo nanesli 3 µl očiščene DNA, raztopljene v 7 µl deionizirane vode ter 2 µl brom-fenol modrila. Po končani elektroforezi smo ocenili koncentracijo DNA glede na jakost fragmenta (ocena 1 je pomenila najmočnejšo jakost) in temu primerno določili količino DNA, ki smo jo uporabili za sekvenčno reakcijo. Pri oceni 1 je bila količina DNA v sekvenčni reakciji 1 µl, pri oceni 5 pa 5 µl.

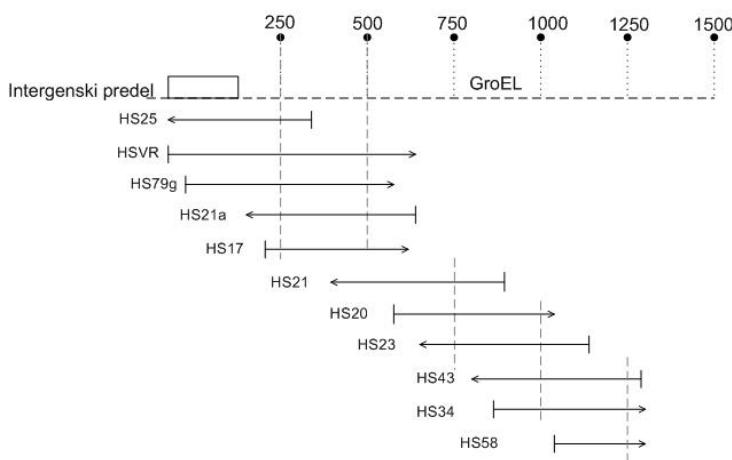
3.2.7.3 Izbira sekvenčnih nukleotidov za sekvečno reakcijo

Za sekvečno reakcijo je potrebno izbrati najbolj optimalne začetne oligonukleotide, ki so lahko enaki tistim, ki jih uporabljam v reakciji PCR. Izbrali smo začetna oligonukletida HS43 in HSVR, ki smo ju uporabili za reakcijo "nested" PCR ter začetne oligonukletide HS17, HS20, HS21, HS21a, HS23, HS25, HS34, HS58, HS79g, ki se nalegajo znotraj 1256 bp dolgega dela operona GroESL (preglednica 2 in slika 10). Z uporabo več začetnih

oligonukleotidov v sekvenčni reakciji smo zagotovili zadosten presežek podatkov za kvalitetno in zanesljivo sestavljenje nukleotidnega zaporedja (Petrovec, 1999).

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri sekvenčni reakciji

Ime začetnega oligonukleotida	Zaporedje začetnega oligonukleotida v smeri 5' proti 3' koncu DNA verige
HS43	AT(A/T) GC(A/T) AA(A/G) GAA GCA TAG TC
HS23	AGT TGG TTG TAC TGC TGG TC
HS34	GTC TCA TAG ACA TAA GCG CTG
HS21	GGA TCT GAT ATT GTT AGC AT
HS58	CTC TGA GTA ATG ATG CTC GC
HS17	GAA CTG CTA TCA ACA CTG CCT
HS25	GTA ATA GTA GGC GCT GAG TAT G
HS20	GTA AGG AAT ATG TAT GGA T
HS79g	TTC CTT CAC CTC AAC TTC
HS21a	AAG ACT GAT GGT ATG CAG
HSVR	CTC AAC AGC AGC TCT AGT AGC



Slika 10: Shematska predstavitev določanja 1256 bp dolgega nukleotidnega zaporedja operona GroESL

3.2.7.4 Sekvenčna reakcija

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili komercialni komplet reagentov BigDye[®] terminator cycle ready reaction kit (ABI Prism, PE Applied Biosystems, Foster City, California, ZDA). Princip sekvenčne reakcije temelji na Sangerjevi metodi sekveniranja, ki se od le-te razlikuje v uporabi terminatorjev.

Pri Sangerjevi metodi se pri *in vitro* sintezi DNA uporabljam radioaktivno označeni nukleotidi, ki smo jih nadomestili s specifičnimi terminatorji. Terminatorji so spremenjeni nukleotidi (dideoksinukleozid trifosfat ali ddNTP), ki imajo na mestu 3'- H namesto -OH skupine. Podaljševanje nukleinske kisline se pri ddNTP ustavi, saj polimeraza DNA za podaljšanje verige potrebuje -OH skupino. V reakcijski mešanici je razmerje NTP:ddNTP običajno 100:1. Po sekvenčni reakciji dobimo mešanico različno dolgih odsekov, ki se končajo na vsakem mestu vezave terminatorja. V sekvenčni reakciji uporabljam posebno polimerazo DNA, ki je temperaturno obstojna in manj občutljiva na ddNTP (Sanger in sod., 1977). Sangerjeva metoda je prilagojena računalniški tehnologiji in je komercialno dostopna v avtomatiziranih sistemih. Na trgu je več sistemov, ki temeljijo na fluorescentno označenih ddNTP-jih. Sekvenčno reakcijo lahko izvajamo ločeno za vsak terminator (4 reakcije) ali v eni epruvetki, kjer je vsak terminator označen s svojim barvilom. Odseke DNA avtomatizirano ločujemo s kapilarno gelsko elektroforezo. Laserski čitalec zazna terminalne nukleotide na osnovi značilnega fluorescentnega spektra. Z ustreznim računalniškim programom nato sekvence dodatno obdelamo in analiziramo (Voet D in Voet JG, 1995).

Za vsak pridelek PCR smo izvedli 11 ločenih sekvenčnih reakcij. V vsaki sekvenčni reakciji smo uporabili po en začetni olugonukletid. V reakcijski mešanici so bili fluorescentno označeni dideoksiterminatorji, mešanica dNTP-jev in polimeraza FS, ki je različica polimeraze Taq.

20 µl reakcijske mešanice je vsebovalo:

- 1-5 µl DNA (kvantitativna ocena iz 1,6 % agaroznega gela)
- 2 µl ustreznega začetnega oligonukletida (50 µM)
- 3 µl reakcijskega pufra
- 2 µl mastermix reakcijske mešanice
- deoinizirana voda do skupnega volumna 20 µl.

Sekvenčna reakcija je potekala v aparatu Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA). Reakcija je potekala v 25 ciklih:

- denaturacija DNA: 20 sekund pri 96 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 10 sekund pri 50 °C
- podaljševanje tarčnega zaporedja: 3 minute pri 60 °C,
- ohlajevanje na 4 °C.

Po končani reakciji smo shranili pridelke sekvenčne reakcije v hladilniku pri 4 °C.

3.2.7.5 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije

Pred analizo v sistemu ABI PRISM 310 smo morali prečistiti in odstraniti neuporabljene dideoksiterminatorje, začetne oligonukleotide in polimerazo FS. Za čiščenje smo uporabili komercialni komplet DyeEx® (Qiagen, Hilden, Nemčija), ki temelji na gelski filtraciji. Komercialni komplet vsebuje kolumne, v katerih je hidriran gel, ki se med centrifugiranjem strdi. Najprej smo kolumne rahlo vorteksirali, da se je tekočina premešala v kolumni, nato pa smo centrifugirali 3 minute pri 3000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo zbiralno tubico zavrgli in prenesli kolumno v označeno in čisto 1,5 ml tubico. Na gel v kolumni smo nanesli 20 µl pridelka sekvenčne reakcije in ponovno centrifugirali 3 minute pri 3000 obratih/minuto. Med centrifugiranjem smo očiščeno DNA sprali v tubico. Zaradi slabe obstojnosti DNA v vodi, smo DNA posušili v vakuumski hladilni centrifugi za 15-16 minut. DNA smo nato raztopili v 25 µl formamida. Sledila je 2 minutna denaturacija pri 95 °C, nato pa smo

obdelane vzorce hitro prestavili na led za 2 minuti. Tako obdelani vzorci so bili pripravljeni za analizo in smo jih do uporabe shranili v zmrzovalniku pri -20 °C.

Pridelke sekvenčne reakcije smo analizirali z avtomatskim sekvenatorjem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, ZDA), ki ločuje pomnožene odseke v kapilari s polimerom (POP6) z laserskim čitalcem na osnovi značilnega fluorescentnega spektra.

3.2.8 Analiza nukleotidnih zaporedij

Podatke, ki smo jih dobili z avtomatskim sekvenatorjem, smo računalniško obdelali s programskim paketom LaserGene (DnaStar, Wisconsis, ZDA), izdanim leta 1999. Paket vsebuje programe za sestavljanje zaporedij (SeqMan), urejanje zaporedij (EditSeq) ter primerjavo zaporedij in prikaz sorodnosti v obliki fenogramov (MegAlign).

V programu SeqMan smo najprej sestavili pare nukleotidnih zaporedji v eno soglasno zaporedje. Ta program uporablja algoritem Clustal W. Neberljiv začetek in konec ter zaporedji najbolj zunanjih začetnih oligonukleotidov smo odrezali. Poravnano in sestavljeno zaporedje smo preverili vzdolž verige zaradi morebitnih neujemanj. V programu EditSeq smo priklicali sestavljeni zaporedje in primerjali zaporedje v FASTA formatu z drugimi zaporedji v genski banki preko medmrežnega servisa BLAST (NCBI, 2008a). V programu MegAlign smo zaporedja vseh analiziranih vzorcev poravnali, uredili in analizirali medsebojno sorodnost. Filogenetska drevesa smo izrisali z računalniškim paketom TreeCon (Yves Van de Peer, Department of Biochemistry, University of Antwerp, Antwerpen, Belgium). Uporabili smo distančno metodo, model Kimura 1980 in Neighbor-joining evaluacijo drevesa s 1000 replikati.

4 REZULTATI

4.1 KLOPI

Na osmih lokacijah v Sloveniji smo nabirali klope z metodo zastave enkrat mesečno od aprila do novembra 2005 in od februarja do decembra 2006. Vzorce smo uredili v skupine po 5 odraslih samic ali 5 odraslih samcev in 10 nimf ter 30 ličink. Število vseh nabranih klopor *I. ricinus* po lokacijah v letu 2005 prikazuje Preglednica 3, v letu 2006 pa Preglednica 4. iz obeh preglednic je razvidno, da smo nabrali 1924 klopor v letu 2005 in 5049 klopor v letu 2006. Skupno število vseh klopor v obeh letih je bilo 6973. Vzorce smo nato razdelili v skupine vzorcev, kot to prikazujeta preglednici 5 in 6. Za leto 2005 smo pripravili 252 skupin vzorcev in za leto 2006 442 skupin vzorcev.

Na lokacijah smo izmerili temperaturo zraka v senci in na soncu, temperaturo tal in vlažnost. Vse meritve na lokacijah prikazujeta Preglednica 7 in Preglednica 8.

Preglednica 3: Število klopor *I. ricinus* po posameznih stadijih, mesečno od aprila do novembra 2005 na osmih lokacijah v Sloveniji

Leto 2005 Mesec	Črni kal, Stepani	Sodražica, Zamostec	Murska šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška bistrica	Štefanja gora	Osolnik	Skupaj
April	86	56	14	44	49	34	29	×	312
M	5	5	2	6	5	0	4	×	27
Ž	1	4	2	5	6	4	4	×	26
N	80	47	10	33	38	30	21	×	259
L	0	0	0	0	0	0	0	×	0
Maj	57	55	7	42	80	40	47	34	362
M	2	4	5	17	9	1	6	4	48
Ž	1	1	2	11	7	1	5	1	29
N	30	48	0	14	45	38	35	28	238
L	24	2	0	0	19	0	1	1	47
Junij	2	25	4	36	73	86	60	15	301
M	0	5	1	7	15	4	8	3	43
Ž	0	3	3	6	8	3	5	0	28
N	2	15	0	22	50	47	47	12	195
L	0	2	0	1	0	32	0	0	35
Julij	11	16	1	14	37	38	54	25	196
M	0	2	1	3	3	2	6	0	17
Ž	0	3	0	2	4	2	4	2	17
N	0	11	0	9	30	23	38	23	134
L	11	0	0	0	0	11	6	0	28
Avg.	23	1	×	35	29	35	×	25	148
M	0	1	×	0	3	3	×	6	13
Ž	0	0	×	2	3	1	×	3	9
N	0	0	×	10	20	17	×	16	63
L	23	0	×	23	3	14	×	0	63
Sept.	0	11	×	46	43	151	96	24	371
M	0	0	×	4	2	11	4	4	25
Ž	0	0	×	2	0	5	4	3	14
N	0	8	×	26	20	22	66	5	147
L	0	3	×	14	21	113	22	12	185
Okt.	3	3	×	34	34	78	72	8	232
M	0	0	×	4	2	6	4	0	16
Ž	0	0	×	3	0	3	3	0	9
N	3	3	×	27	23	26	49	8	139
L	0	0	×	0	9	43	16	0	68
Nov.	×	×	×	2	×	×	×	×	2
M	×	×	×	1	×	×	×	×	1
Ž	×	×	×	0	×	×	×	×	0
N	×	×	×	1	×	×	×	×	1
L	×	×	×	0	×	×	×	×	0
Skupaj	182	167	26	253	345	462	358	131	1924

Legenda: M-moški odrasel klop; Ž-ženski odrasel klop; N-nimfe; L-ličinke; Avg.- avgust; Sept.- september; Okt.- oktober; Nov.- november; × - nismo nabirali klopor.

Preglednica 4: Število klopor *I. ricinus* po posameznih stadijih, mesečno od februarja do decembra 2006 na osmih lokacijah v Sloveniji

Leto 2006 Mesec	Črni kal, Stepani	Sodražica, Zamostec	Murska šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška bistrica	Štefanja gora	Osolnik	Skupaj
Feb.	69	×	×	×	×	×	×	×	69
M	0	×	×	×	×	×	×	×	0
Ž	2	×	×	×	×	×	×	×	2
N	66	×	×	×	×	×	×	×	66
L	1	×	×	×	×	×	×	×	1
Marec	60	×	×	×	13	×	×	×	73
M	1	×	×	×	1	×	×	×	2
Ž	3	×	×	×	1	×	×	×	4
N	56	×	×	×	11	×	×	×	67
L	0	×	×	×	0	×	×	×	0
April	124	120	20	108	119	81	51	28	651
M	4	9	5	21	18	15	6	3	81
Ž	1	7	15	16	14	9	8	4	74
N	115	104	0	60	87	57	37	21	481
L	4	0	0	11	0	0	0	0	15
Maj	106	62	12	232	121	179	177	231	1120
M	3	11	3	22	10	12	18	18	97
Ž	1	6	9	20	9	19	15	16	95
N	65	45	0	72	85	95	120	47	529
L	37	0	0	118	17	53	24	150	399
Junij	19	55	7	283	146	168	255	225	1158
M	1	7	1	12	2	27	9	15	74
Ž	0	3	6	13	13	23	12	11	81
N	18	25	0	80	84	67	145	55	474
L	0	20	0	178	47	51	89	144	529
Julij	17	25	11	255	76	130	70	115	699
M	0	2	4	6	16	6	4	10	48
Ž	0	3	6	7	9	7	2	6	40
N	0	14	1	38	33	40	64	45	235
L	17	6	0	204	18	77	0	54	376
Avg.	44	63	0	161	65	54	100	19	506
M	0	5	0	7	3	5	5	2	27
Ž	0	1	0	3	3	8	5	2	22
N	0	6	0	39	27	22	35	15	144
L	44	51	0	112	32	19	55	0	313
Sept.	6	14	2	43	137	94	76	9	381
M	0	2	0	2	4	8	7	2	25
Ž	0	0	1	2	1	6	7	1	18
N	0	12	1	21	31	26	35	6	132
L	6	0	0	18	101	54	27	0	206
Okt.	1	16	0	47	65	29	42	40	240
M	0	1	0	3	2	4	2	2	14
Ž	0	2	0	3	1	5	3	1	15
N	1	13	0	24	26	20	37	36	157
L	0	0	0	17	36	0	0	1	54

se nadaljuje

nadaljevanje, **Preglednica 4:** Število klopor *I. ricinus* po posameznih stadijih, mesečno od februarja do decembra 2006 na osmih lokacijah v Sloveniji

Mesec	Črni kal, Stepani	Sodražica, Zamostec	Murska šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška bistrica	Štefanja gora	Osolnik	Skupaj
Nov.	54	4	×	8	7	14	14	3	104
M	2	1	×	2	1	1	1	1	9
Ž	0	1	×	0	0	7	0	0	8
N	42	2	×	1	6	6	13	2	72
L	10	0	×	5	0	0	0	0	15
Dec.	48	0	×	×	×	×	×	×	48
M	2	×	×	×	×	×	×	×	2
Ž	2	×	×	×	×	×	×	×	2
N	44	×	×	×	×	×	×	×	44
L	0	×	×	×	×	×	×	×	0
Skupaj	548	359	52	1137	749	749	785	670	5049

Legenda: M-moški odrasel klop; Ž-ženski odrasel klop; N-nimfe; L-ličinke; Feb.- februar; Avg.- avgust; Sept.- september; Okt.- oktober; Nov.- november; Dec.- december.; × - nismo nabirali klopor.

Preglednica 5: Število skupin klopor zbranih na osmih lokacijah v Sloveniji v letu 2005

Lokacija	Ličinke	Nimfe	Samci	Samice	Skupaj
Črni Kal	3	13	2	2	20
Sodražica	1	14	5	4	24
Murska šuma	0	2*	4	7*	13
Rakovnik	2	15	12	10	39
Mozirje	3	23	10	8	44
Kamniška bistrica	9	22	9	7	47
Štefanja gora	3	27	9	6	45
Osolnik	1	10	5	4	20
Skupaj	22	126	56	48	252

*- 1 skupina nimf sestavljena iz vrste *Haemaphysalis concinna*, 4 skupine samic vrste *Dermacentor reticulatus*

Preglednica 6: Število skupin klopor zbranih na osmih lokacijah v Sloveniji v letu 2006

Lokacija	Ličinke	Nimfe	Samci	Samice	Skupaj
Črni Kal	0	43	4	2	48
Sodražica	0	24	8	6	38
Murska šuma	0	1	10*	22*	33
Rakovnik	0	32	17	14	63
Mozirje	0	41	14	13	68
Kamniška bistrica	0	34	17	18	69
Štefanja gora	0	50	13	12	75
Osolnik	0	25	12	10	47
Skupaj	0	250	95	97	442

*- 5 skupin samcev in 8 skupin samic vrste *D. reticulatus*, 4 skupine samic vrste *H. concinna*

Preglednica 7: Prikaz izmerjenih temperatur ($^{\circ}\text{C}$) in vlažnosti (%) po mesecih na lokacijah v Sloveniji v letu 2005

Leto 2005	Črni Kal	Sodražica	Murska šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška bistrica	Štefanja gora	Osolnik
April								
T _{sonce}	18,5	24,0	22,7	16,5	29,5			
T _{senca}	17,3	16,8	19,3		19,5	15,8	18,8	
T _{tal}	12,5	8,0	9,7		10,5	9,4	10,5	
Maj								
T _{sonce}	24,2	16,8	22,5	28,9	28,9	27,7	27,2	21,8
T _{senca}	24,2	16,8	22,5	28,6	20,7	21,7	21,4	20,9
T _{tal}	16,2	13,7	11,7	17,6	12,6	11,6	15,7	12,5
Junij								
T _{sonce}	33,6	31,2		29,6	28,7	34,4	30,3	29,1
T _{senca}	28,3	21,1		27,0	22,5	20,9	23,8	24,1
T _{tal}	19,6	15,7		18,4	16,7	15,8	17,7	15,4
Julij								
T _{sonce}	32,7	28,5	30,5	28,0	30,6	24,0	24,3	23,0
T _{senca}	25,8	20,6	25,3	22,7	21,1	21,4	23,0	19,4
T _{tal}	19,7	15,5	17,0	20,7	16,9	16,1	19,7	16,2
Avg.								
T _{sonce}	33,6	20,9		24,7	25,2	35,0		
T _{senca}	26,4	20,6		19,3	18,1	20,9		17,3
T _{tal}	19,5	16,3		18,6	16,4	15,1		16,4
Sept.								
T _{sonce}	24,0	19,7		22,0	26,8	18,8	22,1	20,5
T _{senca}	20,5	14,1	22,8	20,0	18,7	16,4	15,8	16,0
T _{tal}	18,0	12,2	15,3	14,6	13,7	13,8	15,1	13,7
Okt.								
T _{sonce}	21,1	17,4		16,4				14,1
T _{senca}	16,8	14,3	10,0	12,6	14,9	14,4	13,5	9,6
T _{tal}	11,4	7,6	9,7	10,4	11,5	11,6	12,0	9,0
Vlažnost					82,7	82,0	81,7	
Nov.								
T _{sonce}				5,8				
T _{senca}				5,5				
T _{tal}				6,6				
Vlažnost				62,4				

Preglednica 8: Prikaz izmerjenih temperatur ($^{\circ}\text{C}$) in vlažnosti po mesecih na lokacijah v Sloveniji v letu 2006

Leto 2006	Črni Kal	Sodražica	Murska šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška bistrica	Štefanja gora	Osolnik
Feb.								
T _{sonce}	15,0							
T _{senca}	9,8							
T _{tal}	1,4							
Vlažnost								
Marec								
T _{sonce}	19,5							
T _{senca}	11,0				11,6			
T _{tal}	5,5				1,9			
Vlažnost	38,4				45,2			
April								
T _{sonce}	23,3	14,2	26,0	21,8	18,9	20,9	14,0	20,4
T _{senca}	22,1		20,2	19,5	16,5	18,8	12,5	17,4
T _{tal}	11,8	9,6	10,9	8,7	6,4	4,8	7,5	7,4
Vlažnost	42,0	65,7		32,0	30,6	24,6	56,8	32,0
Maj								
T _{sonce}	23,7	22,4	31,1	23,2	23,6		27,3	16,2
T _{senca}	21,1	18,8	26,2	20,6	18,5	22,0	22,8	15,7
T _{tal}	14,2	10,8	16,0	15,0	12,8	10,2	14,2	11,2
Vlažnost	54,2	42,2		60,2	57,6	40,8	43,9	76,2
Junij								
T _{sonce}	30,0	29,7	27,3	28,3	30,9	25,2	24,8	21,3
T _{senca}	26,3	24,6	25,1	22,4	23,7	22,1	22,3	18,9
T _{tal}	19,1	14,1	20,2	16,0	12,9	11,3	13,2	12,7
Vlažnost	31,0	45,6		60,3	49,7	42,3	40,5	70,8
Julij								
T _{sonce}	32,3	31,4	28,3	31,8	32,6	31,7	31,1	21,6
T _{senca}	28,6	28,2	27,1	28,7	27,2	24,7	27,0	19,4
T _{tal}	20,7	15,5	19,7	19,9	17,2	15,4	19,4	15,6
Vlažnost	40,6	62,4		61,3	57,1	59,1	45,1	73,3
Avg.								
T _{sonce}	28,5	28,3	28,5	26,6	28,1	26,9	24,5	23,6
T _{senca}	26,0	19,6	24,7	23,3	23,0	24,3	21,2	20,4
T _{tal}	20,1	15,0	16,9	17,2	17,3	14,5	16,3	15,4
Vlažnost	60,4	70,8		90,2	66,7	60,6	67,3	72,4

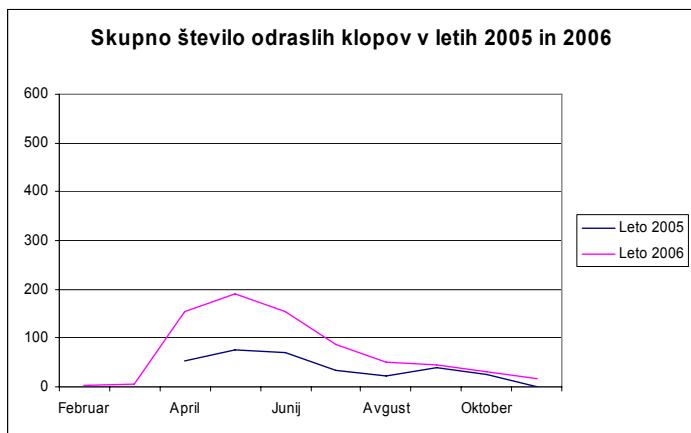
se nadaljuje

nadaljevanje, **preglednica 8:** Prikaz izmerjenih temperatur ($^{\circ}\text{C}$) in vlažnosti po mesecih na lokacijah v Sloveniji v letu 2006

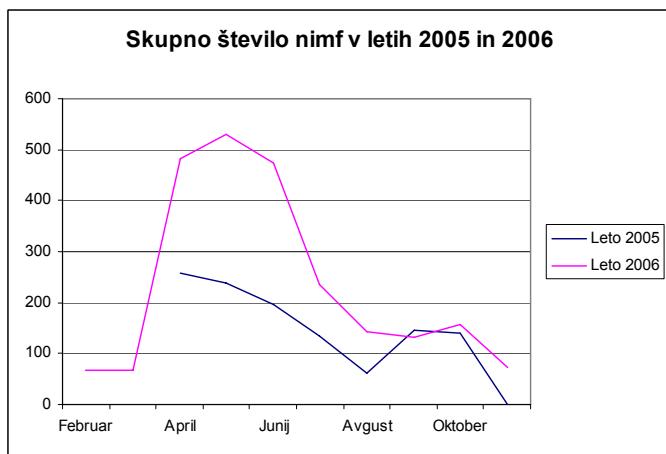
	Črni Kal	Sodražica	Murska šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška bistrica	Štefanja gora	Osolnik
Sept.								
T _{sonce}	25,9	20,4	28,6	25,5	18,0	21,8	22,4	20,4
T _{senca}	23,9	19,1	20,9	19,3	16,8	18,7	16,9	18,9
T _{tal}	17,0	13,8	16,4	16,9	15,3	14,8	14,9	14,6
Vlažnost	53,4	60,0		66,2	91,4	67,4	68,7	61,3
Okt.								
T _{sonce}	22,3	19,1		17,0	19,5	18,1	18,3	10,7
T _{senca}	16,7	14,4	2,9	15,3	18,1	15,1	14,3	10,6
T _{tal}	11,7	9,8	8,2	11,4	11,6	12,0	10,8	11,1
Vlažnost	48,2	43,6		57,3	61,8	64,1	68,0	74,7
Nov.								
T _{sonce}	18,6	9,2		9,3	7,2	9,2	7,7	10,1
T _{senca}	11,2	8,9	18,0	8,7	7,2	9,2	7,7	7,7
T _{tal}	10,4	8,5	9,4	6,6	7,8	8,6	8,9	7,4
Vlažnost	67,3	71,7		74,7	84,5	68,1	67,5	65,8
Dec.								
T _{sonce}	12,1							
T _{senca}	8,5							
T _{tal}	6,7							
Vlažnost	65,8							

Legenda: T_{sonce}- temperatura zraka na soncu; T_{senca}- temperatura v senci; T_{tal}- temperatura tal; Feb.- februar; Avg.- avgust; Sept.- september; Okt.- oktober; Nov.- november; Dec.- december.

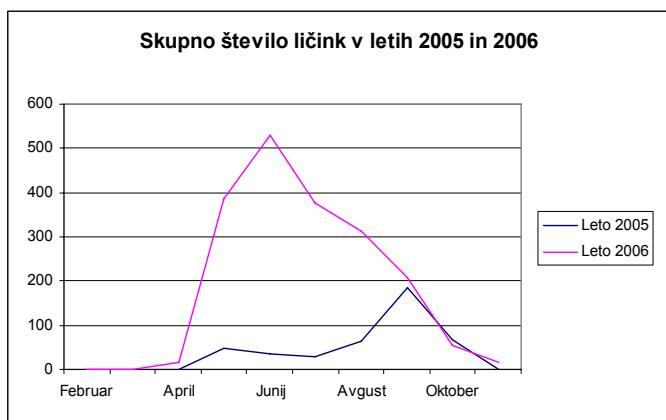
Na osnovi podatkov o zbranih klopih smo narisali grafe, ki prikazujejo dinamiko pojavljanja klopor v letu 2005 in 2006 v Sloveniji. Slika 11 prikazuje število odraslih klopor na vseh lokacijah v letih 2005 in 2006, slika 12 število nimf in slika 13 število ličink na vseh lokacijah v letih 2005 in 2006.



Slika 11: Skupno število odraslih klopo v letih 2005 in 2006 na vseh lokacijah



Slika 12: Skupno število nimf v letih 2005 in 2006 na vseh lokacijah



Slika 13: Skupno število ličink v letih 2005 in 2006 na vseh lokacijah

4.2 DOKAZ BAKTERIJE *A. phagocytophilum* Z METODO PCR V REALNEM ČASU

Iz 694 skupin vzorcev smo osamili DNA in z metodo PCR v realnem času preverili prisotnost bakterijske DNA. Le-to smo dokazali v 22 skupinah vzorcev. Kot je razvidno iz preglednic 9 in 10 smo dokazali DNA bakterije *A. phagocytophilum* v 6 skupinah vzorcev iz leta 2005 in v 16 skupinah vzorcev iz leta 2006. Leta 2006 nismo obdelali vzorce ličink.

Preglednica 9: Vzorci kloporov *I. ricinus* nabranih v Sloveniji leta 2005, kjer smo dokazali bakterijsko DNA z metodo PCR v realnem času

Lokacija	Ličinke	Nimfe	Samci	Samice	Skupaj
Črni Kal	3	13	2	2	20
Sodražica	1	14/1	5	4	24/1
Murska šuma	0	2	4	7	13
Rakovnik	2	15	12	10	39
Mozirje	3	23/3	10	8/1	44/4
Kamniška bistrica	9	22	9	7	47
Štefanja gora	3	27	9/1	6	45/1
Osolnik	1	10	5	4	20
Skupaj	22	126/4	56/1	48/1	252/6

Legenda: x/y; x- število vseh skupin kloporov, y- število pozitivnih skupin kloporov

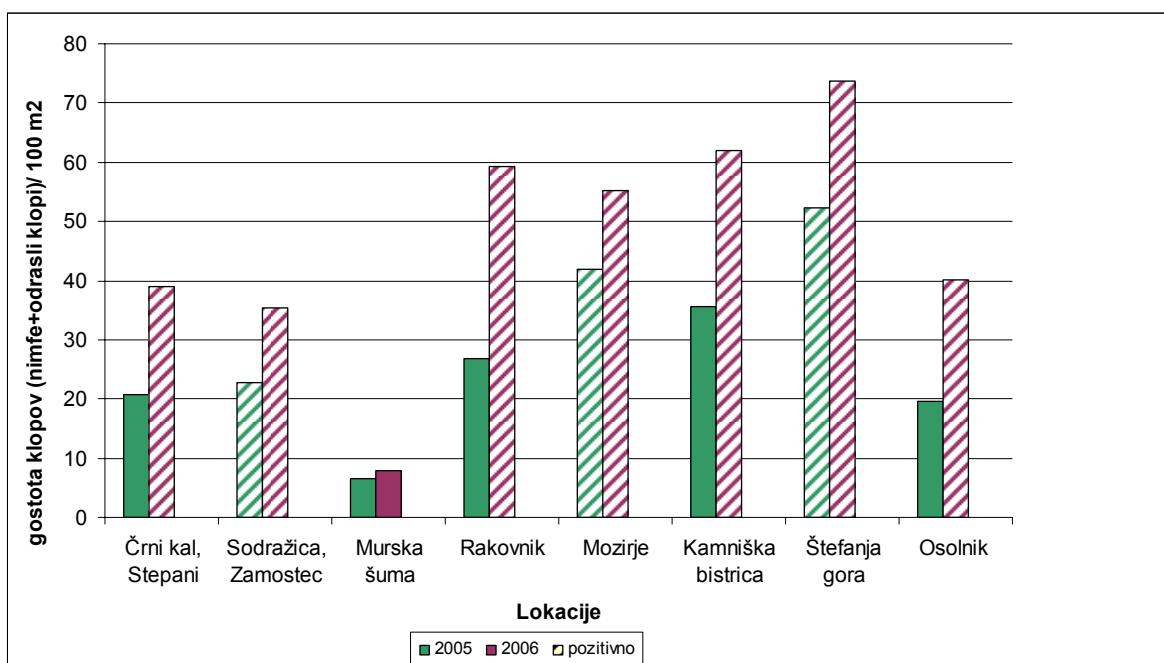
Preglednica 10: Vzorci kloporov *I. ricinus* nabranih v Sloveniji leta 2006, kjer smo dokazali bakterijsko DNA z metodo PCR v realnem času

Lokacija	Ličinke	Nimfe	Samci	Samice	Skupaj
Črni Kal	x	43/4	4	2	49/4
Sodražica	x	24/1	8	6	38/1
Murska šuma	x	1	10	22	33
Rakovnik	x	32/1	17	14	63/1
Mozirje	x	41/2	14/2	13/1	68/5
Kamniška bistrica	x	34/2	17	18	69/2
Štefanja gora	x	50/1	13	12	75/1
Osolnik	x	25/2	12	10	47/2
Skupaj	x	250/13	95/2	97/1	442/16

Legenda: x - nismo analizirali bakterijske DNA; x/y; x- število vseh skupin kloporov, y- število pozitivnih skupin kloporov

Slika 14 prikazuje gostoto kloporov *I. ricinus* (odraslih kloporov in nimf) na 100 m² ter njihovo okuženost z bakterijo *A. phagocytophilum* na posameznih lokacijah. Okužene klope z

bakterijo *A. phagocytophilum* smo dokazali leta 2005 v Sodražici, Mozirju in Štefanji gori, leta 2006 pa na vseh lokacijah razen v Murski šumi. Bakterijska DNA smo dokazali pri nimfah in odraslih klopih. Pri ličinkah je nismo dokazali.



Slika 14: Gostota klopor *I. ricinus* (nimf in odrasli klopor) na 100 m^2 ter okuženost le-teh z bakterijo *A. phagocytophilum* na posameznih lokacijah

4.2.1 Izračun prekuženosti klopor z bakterijo *A. phagocytophilum*

Ker smo celokupno DNA iz klopor osamili iz skupin po 30 ličink, 10 nimf in 5 odraslih klopor, smo izračunali prekuženost klopor na podlagi verjetnosti okuženosti posamezne nimfe, samca in samice po formuli, ki temelji na binomalni distribuciji (Norval in sod., 1990):

$$p = 1 - ((n-x)/n)^{1/k}$$

Neznanke v enačbi imajo naslednji pomen: p- verjetnost okužbe klopa; n- število testiranih skupin; x- število pozitivnih skupin; k- število klopor v skupini.

Od skupno testiranih 376 skupin nimf smo dokazali bakterijo *A. phagocytophilum* v 17 skupinah nimf. Od 151 testiranih skupin moških odraslih klopor *I. ricinus* smo dobili 3 pozitivne skupine in od 145 skupin vzorcev ženskih odraslih klopor 2 pozitivni skupini vzorcev.

Izračunali smo da, so bile nimfe leta 2005 okužene z bakterijo *A. phagocytophilum* v 0,38 %, samci v 0,32 % in samice v 0,37 % (preglednica 12). Celokupna prekuženost za leto 2005 znaša 0,36 % (preglednica 11).

V letu 2006 so bile nimfe okužene z bakterijo v 0,59 %, samci v 0,40 % in samice 0,21 % (preglednica 12). Celokupna prekuženost za leto 2006 znaša 0,40 % (preglednica 11).

Preglednica 11: Izračun prekuženosti klopor (%) z *A. phagocytophilum* v letu 2005 in 2006 v Sloveniji

Leto	Lokacije	N	M	Ž	Skupaj
2005	Črni Kal	0	0	0	0
	Sodražica	0,75	0	0	0,25
	Murska šuma	0	0	0	0
	Rakovnik	0	0	0	0
	Mozirje	2,27	0	2,92	1,73
	Kamniška bistrica	0	0	0	0
	Štefanja gora	0	2,60	0	0,87
	Osolnik	0	0	0	0
2006	Črni Kal	1,23	0	0	0,41
	Sodražica	0,43	0	0	0,14
	Murska šuma	0	0	0	0
	Rakovnik	0,26	0	0	0,09
	Mozirje	0,76	3,19	1,65	1,87
	Kamniška bistrica	0,61	0	0	0,20
	Štefanja gora	0,20	0	0	0,07
	Osolnik	1,28	0	0	0,43
Prekuženost v kloporih za leto 2005					
Prekuženost v kloporih za leto 2006					

Legenda: N- nimfe, M-moški odrasel klop; Ž-ženski odrasel klop

Preglednica 12: Izračunana povprečna prekuženost klopoval v različnih stadijih z bakterijo *A. phagocytophilum* v letu 2005 in 2006 v Sloveniji

	Povprečno 2005			Povprečno 2006	
N	M	Ž	N	M	Ž
0,38 %	0,32 %	0,37 %	0,59 %	0,40 %	0,21 %

Legenda: N- nimfe, M-moški odrasel klop; Ž-ženski odrasel klop

4.3 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA *A. phagocytophilum* Z AVTOMATSKIM SEKVENIRANJEM

Vzorce, pri katerih smo predhodno z metodo PCR v realnem času dokazali bakterijsko DNA, smo uporabili za nadaljnje analize določanja nukleotidnega zaporedja *A. phagocytophilum*. Z metodo vgnezdenega PCR smo pomnožili 1296 bp dolg odsek operona GroESL .

Vsem 22 skupinam vzorcev smo določili nukleotidno zaporedje z avtomatskim sekveniranjem. Zaporedja, ki smo jih dobili s sekvenčno reakcijo, smo sestavili in uredili, nato pa primerjali z zaporedji v genski banki preko medmrežnega servisa BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA), ki je dostopen na spletni strani <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query> (Blast, 2001). Izračunali smo tudi medsebojno sorodnost naših vzorcev in jih primerjali z vzorci *A. phagocytophilum* iz divjadi, klopop in vzorca bolnika ter narisali filogenetsko drevo.

Izmed vseh 22 nukleotidnih zaporedij smo dokazali 12 različnih zaporedij operona GroESL *A. phagocytophilum* v klopih *I. ricinus*. Med seboj se je teh 12 zaporedij razlikovalo od 95,7 % do 99,8 % (slika 15).

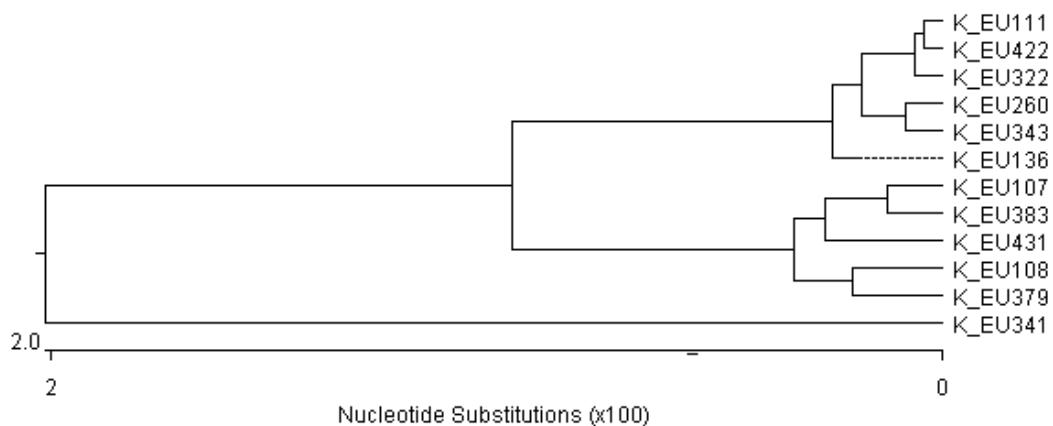
Ugotovili smo, da imajo vzorci K_EU107, K_EU112, K_EU132, K_EU254, K_EU277, K_EU367, K_EU412, K_EU418, K_EU433 in K_EU652 enako zaporedje (100 %), zato smo pri risanju filogenetskega drevesa uporabili enega predstavnika (K_EU107) (slika 15). Prav tako sta imela identična zaporedja vzorca K_EU111 in K_EU329. Pri risanju filogenetskega

drevesa smo uporabili K_EU111 (slika 15). V filogenetsko drevo smo vstavili še preostalih 10 vzorcev.

		ODSTOTEK IDENTIČNOSTI																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
	1	98.6	98.3	100.0	100.0	98.4	100.0	98.4	100.0	98.2	98.3	95.8	98.4	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	98.2	99.6	100.0	100.0	1	
	2	0.4		98.4	99.6	99.6	98.5	99.6	98.5	99.6	98.2	98.4	95.7	98.5	99.6	99.6	99.4	99.6	99.6	98.3	99.5	99.6	99.6	2
	3	1.7	1.6		98.3	98.3	99.6	98.3	99.6	98.3	99.8	100.0	96.4	99.6	98.3	98.0	98.1	98.3	98.3	99.9	97.9	98.3	98.3	3
	4	0.0	0.4	1.7		100.0	98.4	100.0	98.4	100.0	98.2	98.3	95.9	98.4	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	98.2	99.5	100.0	100.0	4
	5	0.0	0.4	1.7	0.0		99.4	100.0	98.4	100.0	99.2	98.3	95.9	98.4	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	98.2	99.6	100.0	100.0	5
	6	1.6	1.5	0.4	1.6	1.6		98.4	99.8	98.4	99.6	99.6	96.7	99.7	98.4	98.1	98.2	98.4	98.4	99.7	98.0	98.4	98.4	6
	7	0.0	0.4	1.7	0.0	0.0	1.6		98.4	100.0	98.2	98.3	95.9	98.4	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	98.2	99.6	100.0	100.0	7
D	8	1.6	1.5	0.4	1.6	1.6	0.2	1.6		98.4	99.8	99.6	96.7	99.8	98.4	98.1	98.2	98.4	98.4	99.7	98.0	98.4	98.4	8
I	9	0.0	0.4	1.7	0.0	0.0	1.6	0.0	1.6		98.2	98.3	95.9	98.4	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	98.2	99.6	100.0	100.0	9
V	10	1.9	1.8	0.2	1.9	1.9	0.4	1.9	0.2	1.9		99.8	96.4	99.6	98.2	97.9	97.9	98.2	98.2	99.9	97.8	98.2	98.2	10
E	11	1.7	1.6	0.0	1.7	1.7	0.4	1.7	0.2		98.4	99.6	98.3	98.0	98.1	98.3	98.3	99.9	97.9	98.3	98.3	98.3	11	
R	12	4.2	4.5	3.7	4.2	4.2	3.4	4.2	3.4	4.2	3.7	3.7		96.5	96.9	95.6	95.7	95.9	95.9	96.5	95.7	95.9	95.9	12
G	13	1.6	1.5	0.4	1.6	1.6	0.3	1.6	0.2	1.6	0.4	0.4	3.6		98.4	98.1	98.2	98.4	98.4	99.5	98.0	98.4	98.4	13
E	14	0.0	0.4	1.7	0.0	0.0	1.6	0.0	1.6	0.0	1.9	1.7	4.2	1.6		99.2	99.8	100.0	100.0	98.2	99.6	100.0	100.0	14
N	15	0.8	0.4	2.0	0.8	0.8	1.9	0.8	1.9	0.8	2.2	2.0	4.5	1.9	0.8		99.0	99.2	99.2	97.9	99.3	99.2	99.2	15
C	16	0.2	0.6	1.9	0.2	0.2	1.9	0.2	1.9	0.2	2.1	1.9	4.5	1.9	0.2	1.0		99.8	99.8	98.0	99.4	99.8	99.8	16
A	17	0.0	0.4	1.7	0.0	0.0	1.6	0.0	1.6	0.0	1.9	1.7	4.2	1.6	0.0	0.8	0.2		100.0	98.2	99.6	100.0	17	
18	18	0.0	0.4	1.7	0.0	0.0	1.6	0.0	1.6	0.0	1.9	1.7	4.2	1.6	0.0	0.8	0.2	0.0		98.2	99.6	100.0	18	
19	19	1.8	1.7	0.1	1.8	1.8	0.3	1.8	0.3	1.8	0.1	0.1	3.6	0.5	1.8	2.1	2.0	1.8	1.8		97.9	98.2	98.2	19
20	20	0.4	0.5	2.1	0.4	0.4	2.0	0.4	2.0	0.4	2.3	2.1	4.5	2.0	0.4	0.7	0.6	0.4	0.4	2.2		99.6	99.6	20
21	21	0.0	0.4	1.7	0.0	0.0	1.6	0.0	1.6	0.0	1.9	1.7	4.2	1.6	0.0	0.8	0.2	0.0	0.0	1.8	0.4		100.0	21
22	22	0.0	0.4	1.7	0.0	0.0	1.6	0.0	1.6	0.0	1.9	1.7	4.2	1.6	0.0	0.8	0.2	0.0	0.0	1.8	0.4	0.0		22
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		

Slika 15: Primerjava identičnosti nukleotidnih zaporedij 1256 bp dolgega odseka operona GroESL med vzoreci klopi

S programom MegAlign (paket LaserGene: DnaStar, Wisconsin, ZDA) smo izrisali dendrogram 12 nukleotidnih zaporedij operona GroESL *A. phagocytophilum* v klopih *I. ricinus* (slika 16).



Slika 16: Dendrogram 12 različnih nukleotidnih zaporedij operona GroESL *A. phagocytophilum* v klopih *I. ricinus*

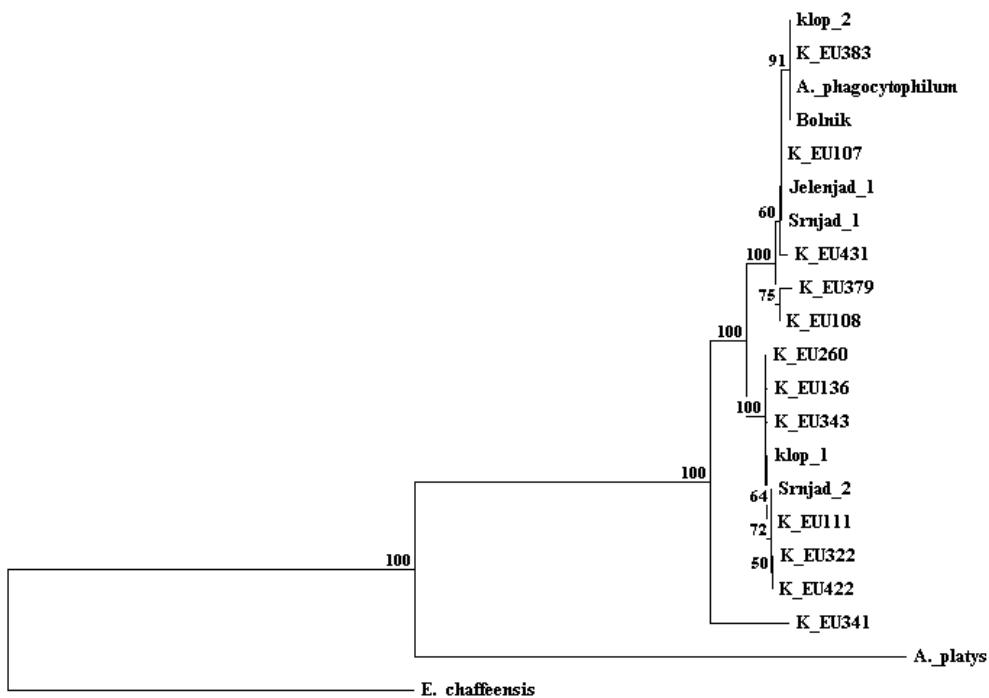
Nukleotidna zaporedja naših vzorcev smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji *A. phagocytophilum* iz divjadi, klopor, bolnika ter z referenčnimi sevi *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, *A. phagocytophilum*. S programom MegAlign smo vsa zaporedja poravnali in izračunali distančno matriko (slika 17).

		odstotek identičnosti																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
d i v e r g e n c a	1	99.6	98.3	98.4	98.2	99.6	99.8	80.6	75.0	99.8	98.4	98.2	95.9	98.4	99.2	99.8	99.9	99.9	98.3	98.4	99.8	1	
	2	0.4	98.4	98.5	98.3	99.5	99.4	80.7	75.1	99.4	98.5	98.2	95.7	98.5	99.6	99.6	99.4	99.5	99.7	98.4	98.5	99.4	2
	3	1.7	1.6	99.6	99.9	97.9	98.1	80.7	75.0	98.1	99.6	99.8	98.4	99.6	98.0	98.1	98.2	98.2	100.0	99.8	98.1	98.1	3
	4	1.6	1.5	0.4	99.7	98.0	98.2	80.6	75.1	98.2	99.8	99.6	96.7	99.7	98.1	98.2	98.3	98.3	99.6	99.7	98.2	98.2	4
	5	1.8	1.7	0.1	0.3	97.9	98.0	80.6	75.1	98.0	99.7	99.9	98.5	99.5	97.9	98.0	98.2	98.2	99.9	99.7	98.0	98.0	5
	6	0.4	0.5	2.1	2.0	2.2	99.4	80.7	75.0	99.4	98.0	97.8	95.7	98.0	99.3	99.4	99.7	99.7	97.9	97.9	98.0	99.4	6
	7	0.2	0.6	1.9	1.9	2.0	0.6	80.6	75.1	100.0	98.2	97.9	95.7	98.2	99.0	100.0	99.7	99.7	98.1	98.2	100.0	100.0	7
	8	22.7	22.5	22.5	22.6	22.6	22.5	22.7	73.0	80.6	80.7	80.6	80.7	80.7	80.9	80.6	80.6	80.6	80.7	80.7	80.7	80.6	8
	9	30.7	30.6	30.7	30.6	30.6	30.7	30.6	34.1	75.1	75.2	75.1	74.7	75.1	74.9	75.1	75.1	75.0	75.0	75.1	75.1	75.1	9
	10	0.2	0.6	1.9	1.9	2.0	0.6	0.0	22.7	30.6	98.2	97.9	95.7	98.2	99.0	100.0	99.7	99.7	98.1	98.2	100.0	100.0	10
	11	1.6	1.5	0.4	0.2	0.3	2.0	1.9	22.5	30.3	1.9	99.8	96.7	99.8	98.1	98.2	98.3	98.3	99.6	99.8	98.2	98.2	11
	12	1.9	1.8	0.2	0.4	0.1	2.3	2.1	22.6	30.5	2.1	0.2	96.4	99.6	97.9	97.9	98.1	98.1	99.8	99.8	97.9	97.9	12
	13	4.2	4.5	3.7	3.4	3.6	4.5	4.5	22.5	31.1	4.5	3.4	3.7	96.5	95.6	95.7	95.9	95.9	96.4	96.5	95.7	95.7	13
	14	1.6	1.5	0.4	0.3	0.5	2.0	1.9	22.5	30.6	1.9	0.2	0.4	3.6	98.1	98.2	98.3	98.3	99.6	99.8	98.2	98.2	14
	15	0.8	0.4	2.0	1.9	2.1	0.7	1.0	22.3	30.9	1.0	1.9	2.2	4.5	1.9	99.0	99.3	99.3	98.0	98.1	99.0	99.0	15
	16	0.2	0.6	1.9	1.9	2.0	0.6	0.0	22.7	30.6	0.0	1.9	2.1	4.5	1.9	1.0	99.7	99.7	98.1	98.2	100.0	100.0	16
	17	0.1	0.5	1.8	1.7	1.9	0.3	0.3	22.7	30.6	0.3	1.7	1.9	4.3	1.7	0.7	0.3	99.8	98.2	98.3	99.7	99.7	17
	18	0.1	0.3	1.8	1.7	1.9	0.3	0.3	22.7	30.7	0.3	1.7	1.9	4.3	1.7	0.7	0.3	0.2	98.2	98.3	99.7	99.7	18
	19	1.7	1.6	0.0	0.4	0.1	2.1	1.9	22.5	30.7	1.9	0.4	0.2	3.7	0.4	2.0	1.9	1.8	1.8	99.8	98.1	98.1	19
	20	1.6	1.5	0.2	0.3	0.3	2.0	1.9	22.5	30.6	1.9	0.2	0.2	3.6	0.2	1.9	1.9	1.7	1.7	0.2	98.2	98.2	20
	21	0.2	0.6	1.9	1.9	2.0	0.6	0.0	22.7	30.6	0.0	1.9	2.1	4.5	1.9	1.0	0.0	0.3	0.3	1.9	1.9	98.2	21
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		

Slika 17: Primerjava identičnosti izbranih nukleotidnih zaporedij 1256 bp dolgega odseka operona GroESL med vzorci klopor, divjadi, referenčnih sevov in bolnika

Nukleotidno zaporedje *A. phagocytophilum*, ki smo ga določili pri vzorcih K_EU111 in K_EU329 je bilo identično z zaporedjem bakterije *A. phagocytophilum*, ugotovljenega pri vzorcu srnjadi. Nukleotidno zaporedje *A. phagocytophilum* vzorca K_EU383 je bilo identično z nukleotidnim zaporedjem slovenskega bolnika in vzorcem klopa (slika 17).

S programom TreeCon smo analizirali sorodnost vseh nukleotidnih zaporedij. Med zaporedji smo izračunali razdalje s Kimurinim dvoparametričnim modelom, ki upošteva neenakomerno hitrost zamenjav na različnih mestih zaporedja. Razdalja, ki jo po izračunu dobimo, odseva število sprememb v zaporedju in s tem filogenetsko razdaljo. Po izračunu razdalj smo izrisali filogenetsko drevo (slika 18). Pri tem smo uporabili sosedsko pridružitveno metodo (NJ, angl. neighbor joining), ki izhaja iz zvezdastega drevesa in potem združuje najbolj podobna zaporedja.



Slika 18: Filogenetsko drevo sorodnosti nukleotidnih zaporedij izolatov bakterije *A. phagocytophilum* iz klopoval, bolnika, divjadi in referenčnih sevov

Legenda: Poleg nukleotidnih zaporedij izoliranih za namen diplomske naloge (pod oznako K_EU in identifikacijska št.vzorca), smo v filogenetsko analizo vključili še nukleotidna zaporedja shranjena v genski banki: Bolnik- izolat iz kliničnega vzorca slovenskega bolnika (AF033101); *A. phagocytophilum*- izolat bakterije (AY529490). Vključili smo še nukleotidna zaporedja *A. phagocytophilum* iz klopoval (klop 1 (EU246960), klop 2 (EU24696.1)) in divjadi (Srnjad 1 (AF478558), Srnjad 2 (AF478564), Jelenjad 1 (AF478562)) iz predhodno objavljenih študij. Za primerjavo sta še vključeni zaporedji bakterij *Anaplasma platys* (AY077621) in *Ehrlichia chaffeensis* (L10917).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 UVOD

Klop *I. ricinus* je v Sloveniji prenašalec številnih patogenih mikroorganizmov: babezij, borelij, virusa klopnega meningoencefalitisa, rikecij in erlihij (Duh, 2002).

Razširjen je po vsej Evropi, od Irske, Velike Britanije in skandinavskih držav, preko srednje Evrope do sredozemskega morja. Najdemo ga na območju od obale do nadmorske višine 1000 metrov, kjer naseljuje vse primerne niše. Rad se naseli na grmovju, nizkem rastlinju in gozdni podrasti, zelo pogosto pa je tudi na pašnikih in travnikih, še posebej v obdobjih med košnjami (Sonenshine, 1993).

Klopov življenjski cikel ima tri razvojne stopnje: ličinko, nimfo in odraslo žival. Vsaka razvojna stopnja se samo enkrat hrani na gostitelju. Nato se spusti na tla, prelevi in napade novega gostitelja (Logar, 1999). Klop išče in zaznava gostitelje s pomočjo Hallerjevega organa na prednjem prvem paru nog. Ta zaznava spremembo koncentracij CO₂ in NH₃, vibracije v zraku in telesno temperaturo. To njegovo lastnost izkoristimo pri nabiranju klopov z metodo zastave, saj klop v začetku ne razlikuje zastave od živega gostitelja (Sonenshine, 1993).

Z bakterijo *A. phagocytophilum* se ljudje okužimo z vodom okuženega klopa. Bakterija povzroča pri človeku humano granulocitno anaplasmozo. Bolezen ima simptome podobne gripi, ki je pogosta v zimskih časih, medtem ko pa je HGA pogostejša poleti (Goodman, 2005; Bakken in Dumler, 2000). Bolezen se pojavlja v Sloveniji razmeroma redko.

Za učinkovito ohranjanje v naravi potrebuje bakterija *A. phagocytophilum* prenašalca, ki je v Evropi največkrat navadni gozdni klop *I. ricinus*, ter primernega gostitelja kot so mali gozdni sesalci, jelenjad in srnjad, divji prašiči, konji, ovce, psi, idr. Človek s svojim vstopom v

življenjski krog bakterije *A. phagocytophilum* predstavlja le naključnega gostitelja (Dumler in sod., 2001).

Prekuženost klopor *I. ricinus* z bakterijo *A. phagocytophilum* v Sloveniji znaša 3,2 % (Petrovec in sod., 1998), medtem ko v Evropi prekuženost klopor z *A. phagocytophilum* varira med 0,4 %- 66,7 % (Blanco in Oteo, 2002). V Sloveniji so med leti 1996 in 2004 pri bolnikih potrdili 24 primerov HGA (Lotrič-Furlan, 2006). Po podatkih iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani so med leti 2005 in 2007 potrdili 18 novih primerov HGA pri slovenskih bolnikih, kar kaže na to, da je HGA vse pogosteje bolezen v Sloveniji.

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti prekuženost klopor *I. ricinus* z bakterijo *A. phagocytophilum* v Sloveniji. Predhodno ugotovljeno prekuženost klopor (3,2 %) v Sloveniji so namreč opisali v študiji, v kateri so pregledali le 93 klopor, ki so jih nabrali na isti lokaciji blizu Ljubljane (Petrovec in sod., 1998). V okviru diplomske naloge smo sistematično in ciljano nabirali klope na osmih lokacijah širom Slovenije v letih 2005 in 2006. Želeli smo ugotoviti ali bomo s sistematičnim zbiranjem vzorcev ugotovili drugačno prekuženost. Hkrati smo želeli določiti molekularne značilnosti bakterije *A. phagocytophilum* v kloporih in jih primerjati z *A. phagocytophilum* izolirano iz ljudi in gostiteljev v Sloveniji.

5.2 ANALIZA REZULTATOV

Na osmih različnih lokacijah smo enkrat mesečno z metodo zastave nabirali klope. Na zastavo pritrjene klope smo pobrali s sesalno napravo, ki smo jo naredili sami. Nato smo v laboratoriju klope očistili in prešteli. Določili smo jim vrsto, razvojno stopnjo in spol.

Kot je razvidno iz Preglednic 3 in 4, smo v letu 2005 nabrali 1924 klopor, v letu 2006 pa 5049 klopor, skupno torej 6973 klopor. Leta 2006 smo nabrali dvakrat več klopor kot leta 2005. Velika razlika v številu klopor je povezana z večimi dejavniki. Eden izmed teh je

prisotnost njihovih gostiteljev, predvsem malih sesalcev, ki jih je bilo leta 2005 znatno več kot ponavadi. Predvidevamo, da je bilo zato leta 2006 več klopor. Drugi dejavnik, ki vpliva na število klopor, je dejavnik okolja. Konec leta 2005 in v začetku leta 2006 je bila v Sloveniji dolga in mrzla zima, zato so se klopi spomladi 2006 naenkrat pojavili v velikem številu. Tretji možni dejavnik, verjetno najmanj pomemben, je izkušenost raziskovalcev pri nabiranju klopor. Leta 2006 smo bili bolj izkušeni pri nabiranju klopor kot leta 2005. V obeh letih smo najmanj klopor nابrali na lokaciji Murska šuma (leta 2005-26 klopor, leta 2006-56 klopor), največ klopor pa smo leta 2005 nابrali na lokaciji Mozirje (541), v letu 2006 pa na lokaciji Rakovnik (1137). V Murski šumi prevladujejo druge vrste klopor in je zato nizko število klopor vrste *I. ricinus* pričakovano.

Na preglednicah 7 in 8, ki prikazujeta izmerjene temperature in vlažnost na različnih lokacijah je razvidno, da se temperature v letih 2005 in 2006 niso pretirano razlikovale in odstopale od povprečnih temperatur značilnih za določen letni čas.

Sezonsko pojavljanje in aktivnost klopor lahko razložimo z rezultati prikazanimi na slikah 11, 12 in 13. Na sliki 11, ki prikazuje število odraslih klopor po mesecih v letih 2005 in 2006, vidimo za leti 2005 in 2006 značilno dvojno sezonsko aktivnost klopor. Vidna sta dva vrha krivulje v mesecu maju in septembru. Več odraslih klopor je v maju in juniju kot v septembru. Manjše število odraslih klopor v jesenskih mesecih lahko razložimo s tem, da samci potem, ko oplodijo samice, poginejo. Poginejo pa tudi samice, nekaj dni zatem, ko izležejo jajca. Aktivnost klopor je jeseni manjša tudi zaradi krajšanja dnevov in nižanja temperature. Dvojna sezonska aktivnost je razvidna tudi iz slike 12, ki prikazuje število nimf po mesecih v letih 2005 in 2006. Aktivnost nimf je najvišja v aprilu in maju ter nato še v septembru. Ličinke, ki so bile aktivne v jesenskih mesecih in so sesale kri iz svojega prvega gostitelja, so se levile in prešle v diapavzo. Hibernirale so do pomladi kot nimfe. Slika 13 prikazuje aktivnost in število ličink v letih 2005 in 2006 na vseh lokacijah. Iz grafa je razvidno, da smo v letu 2006 nابrali veliko več ličink kot v letu 2005. Največ ličink smo leta 2005 nابrali v mesecu septembru, medtem ko v letu 2006 v mesecu juniju. Razlog odstopanja

krivulj v letih 2005 in 2006 gre pripisati metodi zastave, ki ni optimalna metoda pri nabiranju ličink. Za ličinke je značilno, da so v skupkih oz. gnezdih, ki jih z metodo zastave lahko zgrešimo ali pa naenkrat naberemo veliko število ličink. Tudi na posameznih lokacijah je značilna dvojna sezonska aktivnost klopor v vrhom v maju in septembru. Zaradi višjih temperatur in vlage imajo klopi na lokaciji Črni Kal največjo aktivnost že v mesecu aprilu. Aktivnost v jesenskih mesecih je največja v novembru. Klopi iz lokacij, ki so na višji nadmorski višini (Osolnik in Štefanja gora), so imeli leta 2005 vrh aktivnosti v mesecu juniju, manjši vrh aktivnosti pa še v mesecu septembru. Vzrok gre pripisati nižjim temperaturam in vlagi na višje ležečih lokacijah.

Iz naših rezultatov lahko povzamemo, da imajo v Sloveniji klopi *I. ricinus* dvojno sezonsko aktivnost. Največjo aktivnost zasledimo pozno spomladi in ponovno zgodaj jeseni.

Celokupno DNA iz klopor smo osamili iz 252 skupin iz leta 2005 in iz 442 skupin vzorcev iz leta 2006, kot je razvidno iz Preglednic 5 in 6. Skupine vzorcev so bile urejene v skupke po 5 odraslih klopor, 10 nimf in 30 ličink. Preverili smo ali je bila osamitev DNA uspešna in nato z metodama PCR v realnem času in PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi dokazovali prisotnost DNA bakterije *A. phagocytophilum*.

V 22 skupinah vzorcev smo dokazali DNA bakterije *A. phagocytophilum* (Preglednica 9). Bakterije v vzorcih iz Murske šume nismo dokazali, verjetno zaradi majhnega števila nabranih klopor in prevladi drugih vrst klopor.

Iz rezultatov sklepamo, da je bakterija *A. phagocytophilum* genetsko zelo spremenljiva in prisotna na večih različnih gostiteljih, s tem pa tudi prisotna v nimfah in odraslih kloporih vrste *I. ricinus* v Sloveniji (slika 14). Ta dejstva se ujemajo tudi z rezultati objav iz Evrope, kjer so dokazali bakterijo *A. phagocytophilum* v različnih gostiteljih (Strašek Smrdel, 2008; Petrovec in sod., 2002).

Glede na rezultate smo z izbrano formulo izračunali celokupno prekuženost klopor vrste *I. ricinus* z bakterijo *A. phagocytophilum* v Sloveniji za leto 2005, ki znaša 0,36 % in za leto 2006, ki znaša 0,40 % (preglednica 11). Med posameznimi razvojnimi stopnjami klopor ni velikih odstopanj v prekuženosti (preglednica 12). Zaradi večjega števila nabranih klopor v letu 2006 smo dokazali tudi več okuženih klopor z bakterijo *A. phagocytophilum* in s tem nekoliko večji odstotek prekuženosti klopor z anaplazmo kot v letu 2005. Prekuženost klopor z anaplazmo v Sloveniji je po dosedanjih raziskavah iz leta 1998 znašala 3,2 % (Petrovec, 1998). Zaradi velikega števila nabranih klopor na osmih različnih lokacijah je naš odstotek prekuženosti klopor z bakterijo *A. phagocytophilum* znatno manjši in se ujema s prekuženostjo klopor z anaplazmo v Evropi. Ta se razlikuje od 0,4 % do več kot 30 % in je navadno večja pri odraslih kloporih kot nimfah, čeprav so znani tudi obratni primeri (Blanco in Oteo, 2002; Strle, 2004). Vzrok najdemo tudi v geografskih in okoljskih razlikah, na katere vpliva prisotnost določenih gostiteljev in prenašalcev povzročitelja bolezni (Blanco in Oteo, 2002). Potrdili smo domnevo, da je za čim bolj natančno določitev prekuženosti *A. phagocytophilum* v kloporih *I. ricinus*, potrebno testirati večje število klopor nabranih na različnih lokacijah. Povzamemo lahko, da so v Sloveniji za prenos bakterije *A. phagocytophilum* odgovorni klopi vrste *I. ricinus* in sicer tako odrasli klopi kot tudi nimfe.

Z avtomatskim sekveniranjem smo 22 pridelkom PCR določili nukleotidno zaporedje na obeh verigah DNA, ki smo jih pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov HS1 in HS6 ter HS43 in HSVR. Določili smo nukleotidno zaporedje 1296 bp dolgega odseka operona GroESL in opravili filogenetsko analizo. Nukleotidna zaporedja smo primerjali in izračunali razdalje ter odstotek ujemanja s ClustalW algoritmom programa MegAlign.

Ugotovili smo, da se na različnih lokacijah pojavlja več genetskih različic bakterije *A. phagocytophilum*, kar kaže na izredno genetsko različnost bakterije. Na filogenetskem drevesu, izrisanem s programom TreeCon, smo razbrali, da se *A. phagocytophilum* iz klopor razvršča v tri skupine. Posebno genetsko linijo tvori vzorec K_EU341 iz območja Mozirja. Z ostalimi vzorci se po izračunu razdalj med sekvencami ujema v 95,7 % (slika 17). Dve

genetski liniji operona GroESL sta bili opisani med izolati *A. phagocytophilum* v vzorcih divjadi v Sloveniji (Petrovec in sod., 2002). Enaki genetski liniji smo dokazali tudi s filogenetskim drevesom nukleotidnih zaporedij operona GroESL *A. phagocytophilum* v vzorcih klopor, divjadi in bolnika (slika 18). Znotraj prve genetske linije, v kateri so pretežno vzorci jelenjadi, klopor in vzorec bolnika, se odstotek skladnosti giblje od 98,9 % do 100 %. Pri drugi genetski liniji, v kateri so vzorci klopor in srnjadi, pa se odstotek skladnosti giba med 99,5 % in 100 %. To nakazuje na manjše genetske mutacije, ki so posledica evolucije.

Poleg dveh genetskih linij je na filogenetskem drevesu vidna še tretja genetska različica bakterije *A. phagocytophilum* (K_EU341) iz območja Mozirja, ki je tudi statistično podprta (95,5 %). Vendar zaradi enega samega vzorca ne moremo zanesljivo potrditi obstoj nove genetske različice bakterije v Sloveniji. Za potrditev domneve so potrebne nove, nadaljnje raziskave z vzorci izoliranih iz kloporov in gostiteljev na tem območju.

S sekvenčno analizo in primerjavo nukleotidnih zaporedij naših vzorcev, vzorca bolnika, jelenjadi, srnjadi, klopor in referenčnih sevov *A. phagocytophilum*, *A. platys* in *E. chaffeensis*, smo dokazali, da je klop *I. ricinus* prenašalec bakterije *A. phagocytophilum*. Dobili popolnoma identično nukleotidno zaporedje anaplastme pri bolniku in dveh klopih (K_EU383 in klop 4). Našli smo tudi identično nukleotidno zaporedje anaplastme pri srnjadi in klopih, kar kaže na kroženje bakterije med populacijo srnjadi.

Zaključen življenjski krog anaplastme v naravi so nedavno nakazali v Sloveniji. Enako nukleotidno zaporedje *A. phagocytophilum* je bilo dokazano pri slovenskih bolnikih, prenašalcih (klopih) in gostiteljih (divjih prašičih). Kar kaže na to, da je v Sloveniji divji prašič potencialni gostitelj anaplastme, ki povzroča HGA pri ljudeh. Za zaključen naravni krog anaplastme v naravi je potreben še prenašalec. To je klop, ki je odgovoren za prenos bakterije med gostitelji. Enaka nukleotidna zaporedja *A. phagocytophilum* so dokazali tudi v vzorcih divjih prašičev v Avstriji in na Češkem ter vzorcu nemškega konja. Kar pomeni, da

geografska variabilnost *A. phagocytophilum* otežuje določitev pravega potencialnega gostitelja anaplazme. (Strašek Smrdel in sod., 2008).

5.3 SKLEPI

- V Sloveniji smo na 8 lokacijah, v letih 2005 in 2006, nabrali 6973 klopo.
- Metoda zastave ni ustrezna metoda za nabiranje ličink.
- V Sloveniji imajo klopi vrste *Ixodes ricinus* dvojno sezonsko aktivnost. Najbolj aktivni so pozno spomladi in zgodaj poleti ter ponovno zgodaj jeseni.
- Pojavljanje klopo je odvisno od temperature in vlage ter od številčnosti ustreznih gostiteljev.
- Dokazali smo, da je v Sloveniji klop *I. ricinus* prenašalec bakterije *Anaplasma phagocytophilum*. Za prenos bakterije so odgovorni tako odrasli klopi kot nimfe.
- Pogostost z anaplazmo okuženih klopo *I. ricinus* v Sloveniji znaša za leto 2005 0,36 % in za leto 2006 0,40 %.
- Za ugotavljanje prekuženosti *A. phagocytophilum* v klopih je pomembno pregledati večje število klopo iz različnih lokacij.
- Na različnih lokacijah po Sloveniji se pojavlja več genetskih različic bakterije *A. phagocytophilum*.
- S filogenetsko analizo smo dokazali morebitno tretjo genetsko različico bakterije *A. phagocytophilum* v klopih vrste *I. ricinus*, ki doslej ni bila znana.

6 POVZETEK

V Sloveniji je klop *I. ricinus* najpogosteji prenašalec medicinsko pomembnih mikroorganizmov, kar predstavlja resen zdravstveni problem. Klop *I. ricinus* je razširjen po vsej Evropi. Pogosto ga najdemo ob gozdnih robovih, na nizkem rastlinju, grmičevju, pašnikih in travnikih. Klopov življenjski krog zajema tri razvojne stopnje: ličinko, nimfo in odraslo žival. V Sloveniji je za klopa značilna dvojna sezonska aktivnost z vrhom spomladis in jeseni. Aktivnost klopov je jeseni nekoliko manjša zaradi krajšanja dnevov in nižanja temperature.

Bakterija *A. phagocytophilum*, prej poznana pod imeni *E. phagocytophila*, *E. equi* ali HGE agent, povzroča pri človeku bolezen humano granulocitno anaplasmozo. V naravi se bakterija vzdržuje s kroženjem med gostitelji kot so mali sesalci in divjad, ter klopi, ki so glavni prenašalci bakterije. Anaplasme se v telo prenesejo z vbodom okuženega klopa.

V naši raziskavi smo na osmih izbranih lokacijah nabirali klope enkrat mesečno od aprila do novembra v letu 2005 in od februarja do decembra v letu 2006. Z metodo zastave smo nabrali 6973 klopov. Klope smo uredili v skupine in iz teh osamili celokupno DNK. S PCR v realnem času smo preverili prisotnost bakterijske DNK, medtem ko smo z vgnezdenim PCR pomnožili 1296 bp dolg odsek operona GroESL. Verodostojnost pridelkov PCR smo potrdili z avtomatskim sekveniranjem in opravili filogenetsko analizo.

Rezultati so pokazali, da je število klopov odvisno od okoljskih in geografskih dejavnikov ter prisotnosti njihovih gostiteljev. Za klope v Sloveniji je značilna dvojna sezonska aktivnost. Najbolj aktivni so pozno spomladis in zgodaj poleti ter ponovno zgodaj jeseni.

Dokazali smo, da je v Sloveniji klop *I. ricinus* prenašalec bakterije *A. phagocytophilum*. Za prenos bakterije so odgovorni tako odrasli klopi kot nimfe. Pogostost okuženih klopov *I. ricinus* z anaplasmo v Sloveniji znaša za leto 2005 0,36 % in za leto 2006 0,40 %.

S filogenetsko analizo smo ugotovili, da v Sloveniji obstaja več genetskih različic bakterije *A. phagocytophilum*. Odkrili smo še morebitno novo genetsko različico bakterije *A. phagocytophilum* iz območja Mozirja, ki je tudi statistično podprta (95,5 %). Za dokončno potrditev domneve so potrebne dodatne raziskave vzorcev klopor in gostiteljev na tem območju.

7 VIRI

Albert B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1994. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York, Garland Publishing, inc.: 1294 str.

Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farmacevtski vestnik, 55: 215-220.

Assadian O., Stanek G. 2002. Theobald Smith-the discoverer of ticks as vectors of disease. Wiener Klinische Wochenschrift, 114,13-14: 479-81.

Bakken J.S., Dumler J.S. 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. Clinical Infectious Diseases, 31: 554-560.

Belozerov V.N. 2001. Regeneration of limbs and sensory organs in Ixodid ticks (*Acari*, *Ixodoidea*, *Ixodidae*, and *Argasidae*). Russian Journal of Developmental Biology, 32, 3: 129–142.

Black W.C, Piesman J. 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (*Acari: Ixodida*) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 21: 10034–10038.

Blanco J.R., Oteo J.A. 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Clinical Microbiology and Infection, 8: 763-772.

Chen S., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. 1994. Identification of granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. Journal of Clinical Microbiology, 32, 3: 589-595.

Duh D. 2002. Gozdnki klop (*Ixodes ricinus*) kot prenašalec babezij v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta: 62-62.

Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. 2001. Reorganization 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*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 2145-2165.

Dumler J.S., Brouqui P. 2004. Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. Expert Review of Molecular Diagnostics, 4, 4: 559-569.

Dumler J.S., Choi K.S., Garcia-Garcia J.C., Barat N.S., Scorpio D.G., Garyu J.W., Grab D.J., Bakken J.S. 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerging Infectious Diseases, 11, 12: 1828-1834.

Dumler J.S., Walker D.H. 2001. Tick-borne ehrlichiosis. A review. The Lancet Infectious Diseases, April: 21-28.

Dunning Hotopp J.C., Lin M., Madupu R., Crabtree J., Angiuoli S.V., Eisen J., Seshadri R., Ren Q., Wu M., Utterback T.R., Smith S., Lewis M., Khouri H., Zhang C., Niu H., Lin Q., Ohashi N., Zhi N., Nelson W., Brinkac L.M., Dodson R.J., Rosovitz M.J., Sundaram J., Daugherty S.C., Davidsen T., Durkin A.S., Gwinn M., Haft D.H., Selengut J.D., Sullivan S.A., Zafar N., Zhou L., Benahmed F., Forberger H., Halpin R., Mulligan S., Robinson J., White O., Rikihisa Y., Tettelin H. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. PloS Genetics, 2, 2: 208-223.

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. 3rd, Smith T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: Application for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 1: 165-256.

Foy A.C., Parkes H.C. 2001. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, 47, 6: 990-1000.

Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.

Goodman J.L. 2005. Human granulocytic anaplasmosis (ehrlichiosis). V: Tick-borne diseases of humans. Goodman J.L. (ed.). Washington, D.C., ASM Press: 218-238.

Goodman J.L., Nelson C., Vitale B., Madigan J.E., Dumler J.S., Kurtti T.J., Munderloh U.G. 1996. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *New England Journal of Medicine*, 334, 4: 209-215.

Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije-teoretični del. Ljubljana, Študentska založba: 59-64.

Horowitz H.W., Hsieh T.C., Aguero-Rosenfeld M.E., Kalantarpour F., Chowdhury I., Wormser G.P., Wu J.M. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 3: 786-788.

CDC. 2000. Human ehrlichiosis in the United States. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention-CDC.

http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/ehrlichia/Natural_Hx/Natural_Hx.htm (20.februar 2008): 1 str.

Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends in Molecular Medicine, 8: 257-260.

Korenberg E.I. 2000. Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus. Experimental and Applied Acarology, 24: 665-681.

Leskovec J. 2005. Vpeljevanje metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času za dokazovanje. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 7-7.

Logar L. 1999. Parazitologija v medicini. 1.izd. Ljubljana, DZS: 217-217.

Lotrič-Furlan S., Rojko T., Petrovec M., Avšič-Županc T., Strle F. 2006. Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. Wiener Klinische Wochenschrift, 118, 21-22: 708-713.

Lotrič-Furlan S., Petrovec M., Avšič-Županc T., Nicholson W.L., Sumner J.W., Childs J.E., Strle F. 1998. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: Clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. Clinical Infectious Diseases, 27: 424-428.

Louie M., Louie L., Simor A.E. 2000. The role od DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. Canadian Medical Association Journal, 163, 3: 301-309.

Maeda K., Markowitz N., Hawley R.C., Ristic M., Cox D., McDade J.E. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. New England Journal of Medicine, 316: 853-856.

McBride J.W., Walker D.H. 2006. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. V: New and evolving infections of the 21st century: emerging infectious diseases of the 21st century. Fong I.W., Alibek K. (eds.). New York, Springer Science+ -Business Media, LCC.: 93-117.

Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research, 30, 6: 1292-1305.

NCBI. 2008a. Blast. Bethesda, National Center for Biotechnology Information- NCBI.
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (12.marec 2008): 22 str.

NCBI. 2008b. Genome project home. Bethesda, National Center for Biotechnology Information- NCBI.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj> (15.februar 2008): 1 str.

Niesters H.G.M. 2001. Quantitation of viral load using real-time amplification technics. Methods, 25: 419-429.

Norval R.A., Andrew H.R., Yunker C.E. 1990. Infection rates with *Cowdria ruminantium* of nymphs and adults of the bont tick *Amblyomma hebraeum* collected in the field in Zimbabwe. Veterinary Parasitology, 36, 3-4: 277-83.

Parola P. 2004. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 27: 297-304.

Parola P., Davoust B., Raoult D. 2005. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. A review. Veterinary Research, 36: 469-492.

Parola P., Raoult D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. Clinical Infectious Diseases, 32: 897-928.

Petrovec M. 1999. Erlihioza v Sloveniji: molekularno - epidemiološke značilnosti. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta: 19-24.

Petrovec M. 2002. Erlihije. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A.(ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 317-320.

Petrovec M., Bidovec A., Sumner J.W., Nicholson W.L., Childs J.E., Avšič Županc T. 2002. Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: Evidence of two genotypic lineages. Wiener Klinische Wochenschrift, 114, 13-14: 641-647.

Petrovec M., Lotrič-Furlan S., Avšič Županc T., Strle F., Brouqui P., Roux V., Dumler S. 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. Journal of Clinical Microbiology, 35, 6: 1556-1559.

Petrovec M., Sumner J.W., Nicholson W.L., Childs J.E., Strle F., Barlič J., Lotrič-Furlan S., Avšič Županc T. 1998. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. Journal of Clinical Microbiology, 37, 1: 209-210.

Poljak M., Avšič Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo- nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. Medicinski razgledi, 33: 379-400.

Rikihisa Y. 1991. The tribe *Ehrlichiaeae* and ehrlichial diseases. Clinical Microbiology Reviews, 4, 3: 286-308.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 12: 5463- 5467.

Sonenshine DE. 1991. Biology of ticks. Vol 1. New York: Oxford University Press: 346 str.

Sonenshine DE. 1993. Biology of ticks. Vol 2. New York: Oxford University Press: 488 str.

Sparagano O.A.E., Allsop M.T.E.P., Mank R.A., Rijpkema S.G.T., Figueroa J.V., Jongejan F. 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. Experimental and Applied Acarology, 23: 929-960.

Spielman A., Hodgson J.C. 2000. The natural history of ticks: A human health perspective. V: Tickborne infectious diseases: diagnosis and management. Cunha B.A. (ed.). New York, Marcel Dekker: 1-13.

Steen N.A., Barker S.C., Alewood P.F. 2006. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): Pharmacological features and biological significance. Toxicon, 47, 1: 1–20.

Strašek Smrdel K., Bidovec A., Malovrh T., Petrovec M., Duh D., Avšič Županc T. 2008. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar in Slovenia. Clinical Microbiology and Infection: In print.

Strle F. 2004. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. International Journal of Medical Microbiology, 293, 37: 27-35.

Sumner J.W., Nicholson W.L., Massung R.F. 1997. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. Journal of Clinical Microbiology, 35, 8: 2087-2092.

Voet D., Voet J.G. 1995. Biochemistry. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 882-896.

Von Loewenich F.D., Baumgarten B.U., Shröppel K., Geißdörfer W., Röllinghoff M., Bogdan C. 2003. High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 11: 5033-5040.

Wilson M.L. 1994. Population ecology of tick vectors: Interaction, measurement, and analysis. V: Ecological dynamics of tick-borne zoonosis. Sonenshine D.E., Mather T. (eds.). Oxford, Oxford University Press, 20-41.

Woldehiwet Z. 2006. Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Veterinary Journal*, 175, 1: 37-44.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tatjani Avšič Županc, ker mi je omogočila izvajanje diplomskega dela na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo. Hvala tudi za strokovni pregled diplomskega dela.

Iskreno se zahvaljujem delovni mentorici dr. Darji Duh za potrpežljivost pri nastajanju diplomske naloge, za vse nasvete ter pomoč pri pisanju diplomskega dela.

Recezentu doc. dr. Miroslav Petrovcu se zahvaljujem za končno recenzijo diplomskega dela.

Za uvajanje v laboratorijsko delo, za vodenje in pomoč v laboratoriju se iskreno zahvaljujem Katji Strašek. Zahvala gre tudi Emini Durmiši in Nataši Knap za nasvete in pomoč v laboratoriju.

Celotnemu osebju laboratorija se zahvaljujem za prijaznost in prijetno delovno vzdušje v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi moji družini, še posebej mami Vidi in atiju Stanku. Hvala, da sta mi omogočila študij in me pri tem podpirala. Hvala za vso ljubezen in skrb.

In nenazadnje se zahvaljujem tudi tebi, Emil. Hvala, ker si mi stal ob strani in verjel vame.

Še enkrat hvala vsem, ki ste mi kakorkoli pomagali na poti do tega cilja, pa vas nisem omenila.