

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO
DOKAZ IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE *BORRELIA*
BURGDORFERI SENSU LATO V KLOPIH OBALNO-
KRAŠKE IN PRIMORSKO-NOTRANJSKE REGIJE

JANA ŠUŠNJAR

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Dokaz in identifikacija bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato v klopih
obalno-kraške in primorsko-notranjske regije**

(Detection and identification of bacteria *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks of obalno-
kraška and primorsko-notranjska regions)

Ime in priimek: Jana Šušnjar

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentor: doc. dr. Vladimir Ivović

Somentorica: asist. dr. Katja Kalan

Delovna somentorica: znan. sod. dr. Tjaša Cerar Kišek

Koper, september 2020

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Jana ŠUŠNJAR

Naslov magistrskega dela: Dokaz in identifikacija bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato v klopih obalno-kraške in primorsko-notranjske regije

Kraj: Koper

Leto: 2020

Število listov: 73

Število slik: 19

Število tabel: 19

Število referenc: 134

Mentor: doc. dr. Vladmir Ivović

Somentorica: asist. dr. Katja Kalan

Delovna somentorica: znan. sod. dr. Tjaša Cerar Kišek

UDK: 576.89:616-022(043.2)

Ključne besede: Klopi, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Lajmska borelioza, *Ixodes ricinus*, Kultivacija in osamitev, PCR v realnem času

Izvleček: Magistrska naloga temelji na raziskavah o pogostosti okuženih klopov z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato v obalno-kraški in primorsko-notranjski regiji. Klope smo vzorčili v spomladanskem času, ko je najvišja aktivnost klopov v Sloveniji, v letih 2018 in 2019. Klope smo določili do vrste na podlagi morfoloških znakov. Za dokaz *B. burgdorferi* v klopih smo uporabili dve različni metodi dela. Vzorce klopov iz leta 2018 smo analizirali na podlagi molekularnih metod. Z metodo kultivacije in osamitve borelij ter z molekularnimi tehnikami so bile opravljene analize vzorcev klopov iz leta 2019. Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je bila detekcija borelij v klopih bolj natančna z metodo PCR v realnem času kot z metodo kultivacije, saj so bila gojišča, v katerih smo želeli dokazati rast borelij, pogosto kontaminirana. Dokazali smo tudi, da je prisotnost *B. burgdorferi* v klopih primorsko-notranjske regije pogostejša kot pri klopih obalno-kraške regije.

Key document information

Name and SURNAME: Jana ŠUŠNJAR

Title of the thesis: Detection and identification of bacteria *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks of obalno-kraška and primorsko-notranjska regions

Place: Koper

Year: 2020

Number of pages: 73

Number of figures: 19

Number of tables: 19

Number of references: 134

Mentor: Assist. Prof. Vladimir Ivović, PhD

Co-Mentor: Assist. Katja Kalan, PhD

Working Co-Mentor: Znan. sod. dr. Tjaša Cerar Kišek

UDC: 576.89:616-022(043.2)

Keywords: Ticks, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus*, Cultivation and isolation, Real time PCR

Abstract: The master's thesis is based on research on the frequency of infected ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the primorsko-notranjska and obalno-kraška regions. The ticks were sampled in the spring, during the highest tick activity period in Slovenia, in 2018 and 2019. The collected tick species were determined based on morphological characters. Two different methods were used to prove the presence of borrelia in ticks. Tick samples from 2018 were analyzed just with molecular methods. Methods of cultivation and isolation as well as molecular techniques were used to analyze tick samples from 2019. From the obtained results we found that the detection of borrelia in ticks was more accurate when using real-time PCR method, than with the cultivation method, due to frequent contamination of culture growth mediums in which we wanted to prove the growth of borrelia. We have also shown that the presence of *B. burgdorferi* sensu lato in ticks of the notranjsko-primorska region is more frequent than in the ticks of obalno-kraška region.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Klopi	2
1.1.1	Taksonomija	2
1.1.2	Razširjenost	3
1.1.3	Anatomija in fiziologija klopa	3
1.1.4	Življenjski prostor	5
1.1.5	Aktivnost klopov	5
1.1.6	Življenjski cikel in razmnoževanje	6
1.1.7	Prehranjevanje in izbor gostitelja	8
1.1.8	Pomen klopov v ekosistemu	9
1.1.9	Navadni gozdni klop <i>Ixodes ricinus</i>	9
1.2	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	11
1.2.1	Taksonomija in filogenija	11
1.2.2	Morfološke značilnosti	11
1.2.3	Genom	12
1.2.4	Geografska razširjenost	13
1.2.5	Način prenosa borelij	16
1.3	Lajmska borelioza	17
1.3.1	Klinične značilnosti	17
1.3.2	Diagnostika lajmske borelioze	18
1.3.3	Zdravljenje lajmske borelioze	19
1.3.4	Lajmska borelioza pri živalih	19
2	MATERIAL IN METODE	21
2.1	Izbor lokacij	21
2.2	Vzorčenje klopov	25
2.3	Delo v laboratoriju	26
2.3.1	Kultivacija borelij	27
2.3.2	Genotipizacija osamljenih borelij	28
2.3.2.1	Rezanje DNA z restrikcijskim encimom <i>MluI</i>	29
2.3.2.2	Elektroforeza v utripajočem električnem polju	29
2.3.3	Izolacija nukleinske kisline	31
2.3.4	Metoda PCR v realnem času za dokaz <i>Borrelia</i> sp.	31
2.3.5	Statistična analiza s χ^2 - preizkusom	34
3.1	Vzorci klopov	35
3.2	Dokaz borelij z molekularnimi analizami – vzorci 2018	36
3.3	Dokaz borelij s kultivacijo in molekularnimi analizami – vzorci 2019	37
3.3.1	Genotipizacija izoliranih borelij (<i>MluI</i> -LRFP)	41

4	DISKUSIJA.....	44
5	ZAKLJUČEK.....	50
6	VIRI IN LITERATURA.....	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Različne vrste kompleksa <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato in njihova geografska razširjenost (Margos in sod. 2019).....	13
Preglednica 2: Vzorčenje kloпов obalno-kraške regije v letu 2018.....	21
Preglednica 3: Vzorčenje kloпов primorsko-notranjske regije v letu 2018.....	22
Preglednica 4: Vzorčenje kloпов primorsko-notranjske regije v letu 2019.....	23
Preglednica 5: Vzorčenje kloпов obalno-kraške regije v letu 2019.....	24
Preglednica 6: Določanje podskupin <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato z uporabo <i>MluI</i> restriktivskega odseka. (Številke, ki so poudarjene s krepko pisavo, predstavljajo velikost odsekov borelijske DNA, ki so značilni za vrsto in podtip borelij) (Ružić-Sabljić in Cerar 2016).....	29
Preglednica 7: Komponente za eno PCR reakcijo.....	32
Preglednica 8: Temperaturni profil za PCR v realnem času.	33
Preglednica 9: Izbor optičnega kanala za pomnoževanje posameznih tarč.....	33
Preglednica 10: Število kloпов znotraj lokacij obalno-kraške in primorsko-notranjske regije v letu 2018.....	35
Preglednica 11: Število kloпов znotraj lokacij obalno-kraške in primorsko-notranjske regije v letu 2019.....	36
Preglednica 12: Pregled vzorcev po lokacijah (vzorčenje 2018).	37
Preglednica 13: Pregled vzorcev po lokacijah (vzorčenje 2019).	38
Preglednica 14: Pregled vzorcev po regijah (vzorčenje 2019).....	40
Preglednica 15: Statistična analiza s χ^2 - preizkusom: Absolutne (N) in relativne (%) frekvence rezultatov med regijama v letu 2018. Razmerje verjetnosti (LR) med regijama. df – stopnja prostosti. SR – standardni rezidual (razlika med merjeno in pričakovano vrednost).....	40
Preglednica 16: Statistična analiza s χ^2 - preizkusom: Absolutne (N) in relativne (%) frekvence rezultatov med regijama v letu 2019. Razmerje verjetnosti (LR) med regijama. df – stopnja prostosti. SR – standardni rezidual (razlika med merjeno in pričakovano vrednost).....	41
Preglednica 17: Statistična analiza s χ^2 - preizkusom: Absolutne (N) in relativne (%) frekvence rezultatov med regijama v letu 2018 in 2019. Razmerje verjetnosti (LR) med regijama. df – stopnja prostosti. SR – standardni rezidual (razlika med merjeno in pričakovano vrednost).	41
Preglednica 18: Genotipizacija borelij z <i>MluI</i>	42
Preglednica 19: Pregled vzorcev po regijah, okuženih z <i>B. miyamotoi</i>	43

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Razširjenost klopov rodu <i>Ixodes</i> , ki prenašajo povzročiteljice lajmske borelioze (Stanek in sod. 2012).....	3
Slika 2: Ventralna stran trdega klopa (Centers for Disease Control and Prevention 2012)..	4
Slika 3: Aktivne razvojne stopnje vrste <i>Ixodes ricinus</i> : ličinka, nimfa, odrasel samec, odrasla samica (od leve proti desni) (Fotografija: Jana Šušnjar 2019).	7
Slika 4 : Življenjski cikel iksodidnih klopov s tremi gostitelji (Sonenshine in Roe 2014)...	7
Slika 5: (A) Dorzalna in (B) ventralna stran samice vrste <i>I. ricinus</i> (Bristol University Tick ID).	10
Slika 6: <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (Masuzawa 2004).....	12
Slika 7: Razširjenost <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto v Evropi (Hubalek in Halouzka 1997). 14	
Slika 8: Razširjenost <i>B. afzelii</i> v Evropi (Hubalek in Halouzka 1997).	14
Slika 9: Razširjenost <i>B. garinii</i> v Evropi (Hubalek in Halouzka 1997).	15
Slika 10: Zemljevid lokacij vzorčenja klopov obalno-kraške regije v letu 2018.....	22
Slika 11: Zemljevid lokacij vzorčenja klopov primorsko-notranjske regije v letu 2018....	23
Slika 12: Zemljevid lokacij vzorčenja klopov primorsko-notranjske regije v letu 2019....	24
Slika 13: Zemljevid lokacij vzorčenja klopov obalno-kraške regije v letu 2019.....	25
Slika 14: »Dragging« (Šušnjar, 2019).....	26
Slika 15: »Flagging« (Šušnjar, 2019).....	26
Slika 16: Klopa v tekočih gojiščih po dveh dneh inkubacije (levo: kontaminirano gojišče z usedlino polutantov, desno: čisto gojišče brez borelij) (Fotografija: Jana Šušnjar 2019)...	28
Slika 17: Mikroskopiranje borelij v temnem polju (Fotografija: Jana Šušnjar 2019).....	28
Slika 18: Primer analize pomnoževanja specifične borelijske tarče.	33
Slika 19: Primer analize pomnoževanja interne kontrole EAV.	34
Histogram 1: Analiza vzorcev po lokacijah primorsko-notranjske in obalno-kraške regije (vzorčenje 2018).....	37
Histogram 2: Analiza vzorcev po lokacijah primorsko-notranjske regije (vzorčenje 2019).	39
Histogram 3: Analiza vzorcev po lokacijah obalno-kraške regije (vzorčenje 2019).	40

SEZNAM KRATIC

Bp	bazni par
Ct	računalniška tomografija (angl. computed tomography)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
EAV	virus konjskega arteritisa (angl. Equine arteritis virus)
EIA	encimski imunotest (angl. enzyme immunoassay)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)
kbp	tisoč bazni pari
LRFP	metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov celotnega genoma (angl. large restriction fragment pattern)
Mbp	mega bazni pari
Osp	zunaj membranski proteini (angl. outer surface proteins)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
rRNA	ribosomska RNA (angl. ribosomal ribonucleic acid)

ZAHVALA

Zahvala gre delovni somentorici znanstveni sodelavki dr. Tjaši Cerar Kišek iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani za neizmerno pomoč pri raziskavah v laboratoriju ter strokovnemu vodstvu. Hvala, da ste bili na voljo za vsa moja vprašanja in stimulacijska posvetovanja. Zahvaljujem se tudi ostalemu osebju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, ki ste pripomogli k raziskavam magistrske naloge.

Velike zahvale gredo mentorju doc. dr. Vladimirju Ivoviću in somentorici dr. Katji Kalan iz Fakultete za matematiko naravoslovje in informacijske tehnologije v Kopru za strokovni pregled, usmerjanje pri pisanju, recenziji in prispevek h končnemu izgledu magistrske naloge. Hvala vama za vse dragocene nasvete, usmeritve in predloge.

Hvala vsem mojim domačim za vso podporo pri študiju, da ste mi stali ob strani in ves čas verjeli vame. Hvala mami, ki je z menoj občasno vzorčila "loske" in mi terene naredila še bolj zanimive. S tvojo pomočjo so rezultati dobili močnejši pomen.

Hvala mojim prijateljem za vse spodbude, pomoč pri tehnični pripravi magistrske naloge in podporo, ki sem jo potrebovala v lenih trenutkih pri študiju, ki jih na srečo ni bilo preveč. In hvala za najboljšo družbo z urami smeha ob skodelicah kave. Vesela sem, da ste se mi občasno pridružili na terenih, ker vem, da vam vzorčenje ne najbolj karizmatičnih živalic ni bilo nujno prijetno.

1 UVOD

Klopi (Ixodoidae) so pogosti ektoparaziti v tropskih predelih sveta in na območjih zmerno toplega pasu. Prenašajo širok nabor patogenih virusov, enoceličarjev, glist ter bakterij in tako presežejo vse druge členonožce v raznolikosti povzročiteljev okužb, ki jih prenašajo. Človek ni glavni gostitelj nobene vrste klopa, a so kljub temu nekatere vrste pomembne iz medicinskih in ekonomskih razlogov. Ena izmed pomembnejših vrst v Evropi je klop *Ixodes ricinus*, ki prenaša povzročitelje bolezni klopnega meningoencefalitisa in lajmske borelioze (Logar 1999). Poleg prenosa patogenih mikroorganizmov, lahko klopi povzročajo toksična stanja pri gostitelju, kot so paraliza, draženje in alergijska reakcija (Magnarelli 2009; Jongejan in Uilenberg 2004). V kmetijstvu jih označujemo tudi kot škodljivce kadar niso prenašalci povzročiteljev bolezni. S klopom okuženo mesto na koži je namreč lahko izpostavljeno drugim okužbam iz okolja zaradi odprte rane (Jongejan in Uilenberg 2004). Čeprav natančnih podatkov ni na voljo, je gospodarska izguba zaradi bolezni, ki se prenašajo s klopi, velika zaradi stroškov cepljenja ter zdravljenja ljudi in živali (Jongejan in Uilenberg 2004). Prisotnost klopov in število okužb v naravnem okolju lahko negativno vpliva tudi na vrednost rekreacijskih parkov in drugih naravnih območij (Jongejan in Uilenberg 2004).

Poleg velikega vpliva klopov na zdravje ljudi, igra njihova zmožnost prenašanja patogenih organizmov pomembno vlogo pri zmanjševanju fitnesa populacij v živalskem svetu (Littman in sod. 2018). Gostitelji klopov so pogosto ogrožene vrste vretenčarjev, ki se prav tako lahko okužijo z organizmi, ki povzročajo bolezni. Živali v naravi so vedno izpostavljene zunanjim parazitom in se same pred njimi ne morejo zaščititi. Prav tako divje živali težje prebolijo bolezen zaradi zdravstvene neoskrbe, zato je njihova populacija še toliko bolj ogrožena (Jongejan in Uilenberg 2004).

Ščitasti klopi iz rodu *Ixodes* so medicinsko in ekonomsko najpomembnejši klopi v Evropi, saj so prenašalci številnih patogenih organizmov: babezij, erlihij, rikecij, virusa klopnega meningoencefalitisa ter borelij (Dumpis in sod. 1999). V Sloveniji sta najbolj pogosti bolezni, ki ju posredno povzročajo klopi, klopni meningoencefalitis in lajmska borelioza (Ružič-Sabljić in sod. 1993; Lešničar in sod. 2003). Lajmska borelioza in številne druge bolezni, ki se prenašajo s klopi so zoonotske bolezni, pri katerih je klop prenašalec patogenega mikroorganizma iz živali na človeka. Povzroča jo skupina bakterij iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Burgdorfer in sod. 1982). Molekularne analize so v preteklosti pokazale, da ne gre le za eno vrsto borelije, temveč obstaja več vrst povzročiteljic lajmske borelioze. Takšen skupek različnih vrst, ki povzročajo lajmsko boreliozo, imenujemo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, kar v latinskem jeziku pomeni "v širšem smislu" (Kurtenbach in sod. 2002). Najpomembnejši prenašalci povzročiteljic lajmske borelioze so klopi iz rodu *Ixodes*: *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis* in *I.*

pacificus (Burgdorfer 1996). Borelije so izolirali tudi iz nekaterih drugih krvosesihi členonožcev, vendar je uspešnost prenosa patogenega mikroorganizma iz prenašalca na gostitelja vprašljiva (Magnarelli in Anderson 1988). Človek je le naključni gostitelj borelij, ki se lahko okuži, ko se giblje v habitatu njenih prenašalcev (Diuk-Wasser in sod. 2012). *Borrelia burgdorferi* sensu lato je klopno prenosljiva spiroheta (Burgdorfer in sod. 1982), katere najpomembnejši gostitelji so majhni sesalci, kuščarji in nekatere vrste ptic (Radolf in sod. 2012).

Z raziskavami smo želeli ugotoviti pogostost okuženih klopov *I. ricinus* z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato v obalno-kraški in primorsko-notranjski regiji. Klopi v Sloveniji so v naravnem okolju najštevilčnejši v spomladanskem času, zato smo jih vzorčili od maja do julija. Za dokaz borelije v klopih smo uporabili dve različni metodi. Pridobljene rezultate smo primerjali med uporabljenima metodama ter med izbranimi regijama, kjer smo vzorčili klope.

Hipoteze:

1. Po pregledu literature smo predvidevali, da bomo z molekularno metodo dokazali prisotnost bakterije *B. burgdorferi* sensu lato v približno 30% vzorcev (Cerar in sod. 2015).
2. Predvidevali smo, da bo prisotnost patogenih bakterij v vzorcih z metodo kultivacije in osamitve borelij manjša kot pri vzorcih z molekularnimi analizami.
3. Pričakovali smo, da bo več klopov okuženih v primorsko-notranjski regiji kot klopov obalno-kraške regije.

1.1 Klopi

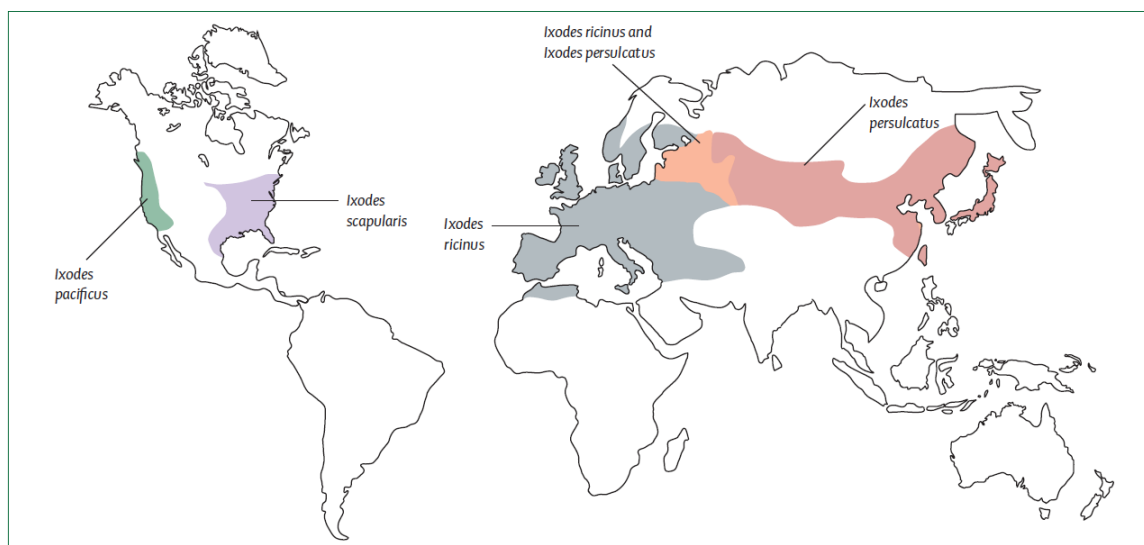
1.1.1 Taksonomija

Klopi so naddružina pajkovcev (Arachnida) poddebla pipalkarjev (Chelicerata) iz debla členonožcev (Arthropoda). Uvrščamo jih v podrazred Acari, ki ga delimo v red Acariformes in Parasitiformes. Med slednje uvrščamo parazitske in plenilske pršice, med drugim tudi podred Ixodida. Ixodida delimo na tri družine. Večji družini sta Ixodidae (trdi ali ščitasti klopi) in Argasidae (mehki ali usnjati klopi), ki skupaj zajemata okoli 900 vrst klopov (Sonenshine 1991). Tretja družina Nuttalliellidae zajema le eno vrsto klopa, *Nuttalliella namaqua*, ki živi v južnih delih Afrike in ima lastnosti obeh večjih družin (Bedford 1931; Black in Piesman 1994; El Shoura 1990).

1.1.2 Razširjenost

Klopi so široko razširjeni po svetu, vendar je več vrst prisotnih v regijah s toplim in vlažnim podnebjem (Magnarelli 2009). Vrste klopov se širijo in pojavljajo na novih območjih zaradi različnih vzrokov: nenadzorovanih premikov domačih ali divjih živali, podnebnih sprememb ter spremembe v rabi zemlje, ki omogočajo povečanje števila gostiteljev (Estrada-Peña 2015). Ko je vrsta klopa uvedena v novo okolje, se le-ta uspešno ohrani, če klimatske razmere ustrezajo njenim zahtevam in če je na voljo dovolj gostiteljev (Estrada-Peña in Salman 2013).

Veliko število vrst trdih klopov je bilo prepoznanih kot prenašalcev *B. burgdorferi*, povzročitelja bolezni lajmske borelioze. Naslednje štiri vrste rodu *Ixodes* so priznane kot pomembni prenašalci patogene bakterije po vsem svetu: *I. ricinus* in *I. persulcatus* v starem svetu ter *I. pacificus* in *I. scapularis* v novem svetu (Slika 1) (Stanek in sod. 2012).



Slika 1: Razširjenost klopov rodu *Ixodes*, ki prenašajo povzročiteljice lajmske borelioze (Stanek in sod. 2012).

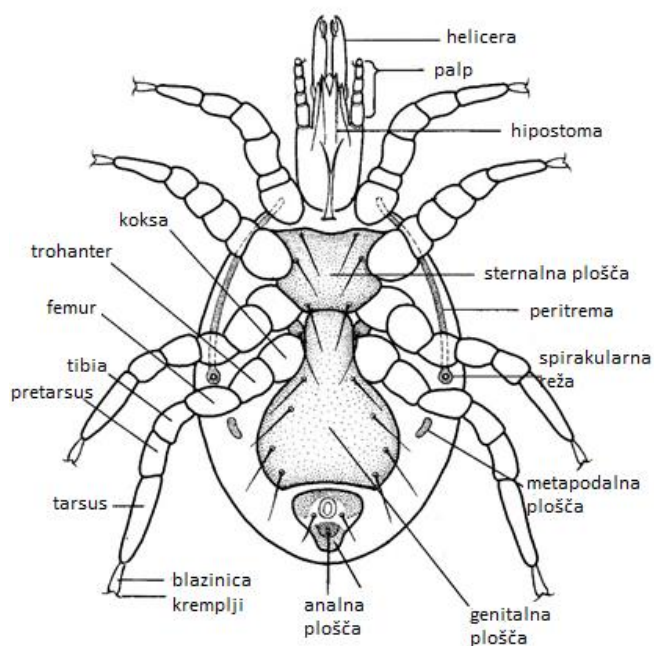
V Sloveniji je bilo do sedaj zabeleženih 16 vrst trdih klopov. Med njimi je najbolj poznana in pogosta vrsta gozdni klop, *Ixodes ricinus*. Splošno razširjene vrste v Sloveniji so tudi *Ixodes trianguliceps*, *I. hexagonus* in *I. vespertilionis* (Tovornik 1990; Tovornik 1991).

1.1.3 Anatomija in fiziologija klopa

Telo klopa je sestavljeno iz neprave glave (kapitulum), telesa (idiosoma) in štirih parov nog pri odraslih klopih in nimfah ter treh parov nog pri ličinkah. Kapitulum vsebuje kapitulo, ki ga pritrja na idiosomo, helicerice, ki pomagajo pri trganju in rezanju kože gostitelja, par palpov in hipostomo z vrstami ponavljajočih se zob, ki so na proksimalnem

delu večji kot na distalnem. Zobci hipostome pomagajo pri pritrditvi na kožo gostitelja. Proboscis klopov, s katerim vbadajo, se imenuje rostrum. Ta je sestavljen iz hipostome in para helicer (Logar 1999; Sonenshine in Roe 2014). Telo klopa (idiosoma) (Slika 2) je razdeljeno na sprednji del (podosoma) in zadnji del (opistosoma). Na podosomi klop nosi štiri (ličinka tri) pare nog in genitalno poro na dorzalni strani. Na ventralnem delu opistosome se nahajata spirakularni reži in analna odprtina (Sonenshine in Roe 2014). Pri trdih klopih se na dorzalnem delu telesa nahaja trda sklerotizirana plošča - ščitek (skutum), ki pri odraslih samcih prekrije celotno hrbtno stran telesa. Skutum pri odraslih samicah, nimfah in ličinkah pokriva le sprednjo polovico hrbtne površine telesa. Pri teh se zaradi manjše pokritosti površine telesa s ščitkom, telo med hranjenjem lahko močno razširi (Sonenshine 1991, Sonenshine in Roe 2014). Samce in samice ločimo le pri odraslih klopih (Sonenshine 1991).

Vsi pari nog so razdeljeni na šest členov in se pritrdijo s kolčkom na telo klopa. Drugi člen se imenuje stegence, sledijo golence, predstopalce, stopalce in blazinica, na kateri so krempljčki, s katerimi se klop prime gostitelja. Na stopalcu je prisoten Hallerjev organ. To je pomemben čutilni aparat, ki vključuje čutila za zaznavanje vonjav in toplote (Sonenshine in Roe 2014). Večina vrst klopov nima oči, ampak imajo poleg Hallerjevega organa še številne druge čutilne organe; kot so čutilni laske na površini telesa in nog ter palpi, ki vsebujejo kemoreceptorje. Čutilni organi so zelo pomembni za klope, saj jim omogočajo komunikacijo z ostalimi klopi in iskanje gostitelja (Sonenshine in Roe 2014).



Slika 2: Ventralna stran trdega klopa (Centers for Disease Control and Prevention 2012).

Notranji organi klopov so nameščeni v prosto krožeči hemolimfi. Najpomembnejši notranji organi so: prebavni trakt (vključuje žrelo, požiralnik, srednje črevo in rektalno vrečo), žleze slinavke, reproduktivni organi, povezan osrednji živčni sistem, Malphigijeve cevke (izločala) in traheje (dihala). Srednje črevo je na splošno največji organ v telesu. Poleg vloge pri prebavi krvi deluje tudi kot organ za shranjevanje hrane, saj klopi prebavljajo krvni obrok zelo počasi (Sonenshine in Roe 2014).

1.1.4 Življenjski prostor

Prisotnost klopa v prostoru se navezuje na visoko relativno vlažnost okolja ter prisotnost gostitelja, ki omogoča preživetje vsem trem aktivnim razvojnim oblikam klopa (Daniel in sod. 1998). Za preživetje v obdobju, ko se ne hranijo na gostitelju, zahtevajo vsaj 80 % relativno vlažnost življenjskega prostora. Omejeni so na območja z zmernimi do visokimi količinami padavin z vegetacijo, ki ohranja visoko vlažnost. Potreba po takšni vegetaciji, prisotnost gostiteljev za vse aktivne stopnje in sposobnost razpršitve klopov znotraj in med življenjskimi prostori so pomembni predpogoji za preživetje klopov in dokončanje njihovega življenjskega cikla (Gassner in sod. 2011). V poletnem času na območjih zmernega pasu lahko nastopijo dolga obdobja visokih temperatur in suše. Če klop ne najde dovolj hitro gostitelja, se klop spusti v nižje predele vegetacije (na primer pod odpadno listje), kjer je vlažnejša mikroklima (Sonenshine in Roe 2014).

Habitati klopov se v Evropi med seboj razlikujejo, vendar se klopi najpogosteje nahajajo v listnatih gozdovih (Burgdorfer 1995). Najdemo jih tudi v gozdovih iglavcev, če je tam dovolj podrasti, ki ohranja vlažno mikroklimo (Daniel in sod. 1998). Klopi so pogosti tudi v vlažnih travnikih in pašnikih, močvirjih in mestnih parkih (Medlock in sod. 2013).

1.1.5 Aktivnost klopov

Aktivnost klopov se razlikuje med posameznimi vrstami in znotraj posamezne vrste zaradi različnih podnebnih razmer na območjih, kjer je vrsta razširjena. Sezonsko pojavljanje in preživetje klopov določajo predvsem klimatske razmere. Večina vrst v zmerno toplem pasu ima najvišjo sezonsko aktivnost v spomladanskem času (Estrada-Peña in de la Fuente 2014). Klopi vrst *I. ricinus* in *I. persulcatus* postanejo aktivni zgodaj spomladi do sredine poletja, *I. pacificus* so aktivni v zimskem času. Pri *I. ricinus* je drugi porast aktivne dobe v jeseni. Do razlik prihaja tudi v aktivnosti med različnimi razvojnimi stopnjami ene vrste (Stanek in sod. 1986). V poletnem času so lahko dolga obdobja visokih temperatur (z visoko sušilno močjo zraka), zaradi katerih se zmanjša aktivnost in poveča smrtnost vseh razvojnih stopenj klopov. Dolge zime in nizke temperature lahko povzročijo visoko smrtnost v populacijah, ki prezimujejo v zemlji. Sneg ima izolacijski učinek, saj tako ščiti klope pred mrazom, ki prezimujejo v tleh. Da bi klopi zmanjšali smrtnost zaradi nizkih

temperatur, le-ti mirujejo (Estrada-Peña in de la Fuente 2014). Pri aktivnosti ektoparazita gre za ravnotežje med porabo energije za iskanje gostitelja in tveganji, povezanim s smrtnostjo zaradi neprimernih vremenskih razmer. Tak način obstoja je nekatere vrste vodil k razvoju stanja diapavze (Jensen in sod. 1999). To je stanje hormonsko nadzorovanega ustavljenega razvoja (Belozеров 1982). Z diapavzo se uravnava življenjski cikel klopov tako, da ga podaljšajo, če vstopijo v diapavzo ali skrajšajo, ko se pred tem obdobjem hranijo in levijo v naslednjo razvojno stopnjo (Gray in sod. 2016). Ločimo dve glavni vrsti diapavze v svetu klopov. Prva je razvojna ali morfogenetska, vključno z reproduktivnim vedenjem, druga pa je vedenjska. Razvojna diapavza opisuje prenehanje razvoja klopa zaradi onemogočenja nekaterih korakov v razvojnem procesu, ki so pod hormonsko kontrolo. Kaže se lahko kot zamuda pri nastajanju jajčec, ličink ali nimf. Vedenjska diapavza vključuje začasno ukinitve iskanja gostiteljev zaradi neugodnih razmer (Belozеров 1982). V nekateri literaturi se ta izraz uporablja za prezimovanje klopa, ki ni nujno v pravi diapavzi, ampak je lahko v mirovanju, ki ga uravnava temperatura (Gray in sod. 2016).

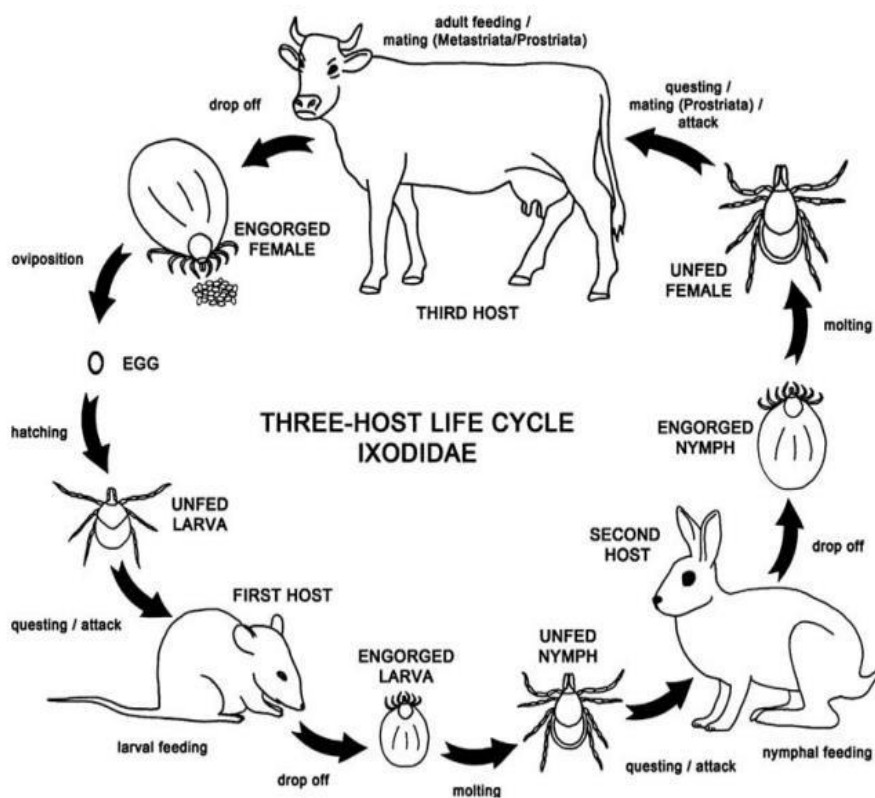
1.1.6 Življenjski cikel in razmnoževanje

Vsi klopi so začasni paraziti vretenčarjev. Življenjski krog (samca in samice) je kompleksen in zajema štiri razvojne stopnje: oplojeno jajčece, ličinko, nimfo in odraslo žival (Slika 3). Razvoju členonožcev, kjer buba ni prisotna in splošna oblika nezrelih osebkov spominja na telesno obliko odraslih klopov, pravimo hemimetabolen razvoj. Za prehod v naslednjo razvojno stopnjo se mora klop hraniti na gostitelju. Nahranjen klop zapusti gostitelja, da se lahko prelevi v naslednji razvojni stadij (Logar 1999). Način razvoja in trajanje življenjskega cikla sta odvisna od družine klopov, temperaturnih razmer, sezone, v kateri se klop razvija ter razpoložljivosti gostiteljev (Estrada-Peña 2015, Logar 1999). Življenjska doba iksodidnega klopa običajno traja dve ali tri leta, v skrajnih primerih tudi več. Argasidni klopi živijo več let (lahko tudi do 20 let). Zaradi večkratnih levitev med razvojnimi stopnjami in večkratnega hranjenja se njihov življenjski cikel zaključi kasneje (Sonenshine in Roe 2014).



Slika 3: Aktivne razvojne stopnje vrste *Ixodes ricinus*: ličinka, nimfa, odrasel samec, odrasla samica (od leve proti desni) (Fotografija: Jana Šušnjar 2019).

Pri večini iksodidnih klopov so v življenjskem krogu vključeni trije različni gostitelji (Slika 4). Po uspešnem hranjenju ličinka zapusti gostitelja ter se prelevi v nimfo. Kmalu za tem nimfa išče gostitelja za ponovno hranjenje. Prisesa se lahko na istega gostitelja, na katerem se je hranila kot ličinka, lahko pa si poišče drugega. Po hranjenju ga zapusti in se prelevi v odraslega klopa, ki si ponovno poišče ustreznega gostitelja. Na njem se samice hranijo in pariyo. Po obilnem krvnem obroku odpadejo iz gostitelja, poiščejo primerno mesto za izlego jajc in izležejo jajca ter umrejo (Sonenshine in Roe 2014).



Slika 4: Življenjski cikel iksodidnih klopov s tremi gostitelji (Sonenshine in Roe 2014).

Klopi, ki so omejeni na bivališča njihovih gostiteljev imajo endofilno vedenje, saj živijo v neposredni bližini primerne vira hrane in na njihov razvoj ne vpliva vreme zunanjega prostora. Vsi klopi iz družine Argasidae in nekatere vrste družine Ixodidae so endofilni. Nasproten tip vedenja imajo eksofilni klopi, ki se nahajajo v življenjskem prostoru gostitelja, vendar izven njihovega prebivališča. Njihovo obnašanje med aktivnim iskanjem gostitelja uravnavajo vremenske spremembe (Estrada-Peña 2015).

Klopi se razmnožujejo spolno. Odrasla samica potrebuje obilen krvni obrok za odleganje oplojenih jajčec. Samec se v zadnjem razvojnem stadiju navadno ne prehranjuje ali pa lahko zaužije majhen obrok krvi (Oliver 1982). Parjenje se pojavi na gostitelju po hranjenju samca. Telesna masa samcev se poveča le za enkrat do dvakrat. Večina odraslih samcev skupine Prostriata ne potrebuje krvnega obroka in se lahko pari s samico na gostitelju ali brez njegove prisotnosti (Sonenshine in Roe 2014). Da bi samec našel samico za parjenje se ob priložnosti prav tako oklene gostitelja. Samci se lahko tudi večkrat pariyo. Klopi se pariyo pred hranjenjem ali med hranjenjem samice. Dvorjenje in razmnoževanje se uravnava na podlagi feromonov, ki jih zaznavajo s kemoreceptorji na palpih. Ko samica pride v stik s samcem, ki ji ustreza za razmnoževanje, dvigne svoje telo in ob tem zagotovi dovolj prostora samcu za dostop do njene ventralne površine telesa (Kiszewski in sod. 2001). Samice iksodidnih klopov se hranijo le enkrat. Po hranjenju poiščejo primerno mesto za odlaganje jajčec. To je ponavadi temen in vlažen prostor, na primer na tleh pod odmrlim listjem ali drugim odpadnim rastlinskim materialom. Število odloženih jajčec se giblje med 2000 in 10000. Za izlego ličink v toplih razmerah sta potrebna dva tedna. V mrzlih klimatih samica lahko potrebuje mesec dni za izleganje jajčec, ličinke pa se izležejo po treh do štirih mesecih (Sonenshine in Roe 2014).

1.1.7 Prehranjevanje in izbor gostitelja

Gostiteljeva kri je edina hrana, ki jo klopi zaužijejo. Prilagoditev na tak način hranjenja je vključevala razvoj kompleksnih sestavin sline. Te pomagajo preprečevati obrambo gostiteljev pred izgubo krvi (hemostaza) in razvoj vnetne reakcije na mestu hranjenja, ki lahko moti pretok krvi ali zaradi občutka bolečine ali srbenja sproži obrambno vedenje gostitelja (Francischetti in sod. 2009).

Obustni aparat trdih klopov je jasno viden z ventralne strani klopa. Med hranjenjem se palpi premikajo bočno in ne vstopajo v kožo, medtem ko so helicere in hipostoma med hranjenjem v telesu gostitelja. Hipostoma je groba struktura, na kateri je veliko kljunastih tvorb, ki so usmerjene nazaj. To preprečuje enostavno odstranitev pritrjenega klopa (Sonenshine in Roe 2014).

Klopi čakajo gostitelje na izpostavljenih mestih (na primer na vrhu travne bilke, zunanjem listju grmovja in nižjega drevja). Bližino gostitelja zaznajo s kemo- in mehanoreceptorji (Hallerjev organ) (Foelix 1985). Ko pride gostitelj mimo, se ga klop oklene s prvim parom nog. Nekateri klopi aktivno zasledujejo gostitelja na tleh. Ko klop pride v stik s primernim vretenčarjem, si na njem aktivno išče ugodno mesto za hranjenje. Pri sesalcih si klopi najpogosteje izberejo mesto vboda na notranji strani sklepov, pri ptičih največkrat okoli oči in kljuna ter plazilcih okoli bobniča, oči in okoli ramenskega sklepa (v prepegibu sprednje okončine). Večina trdih klopov izloča »cementno« snov mlečno-bele barve, ki jo proizvajajo žleze slinavke. Z njo se klopi utrdijo na kožo v času hranjenja. Po hranjenju se »cementna« snov raztopi (Estrada-Peña 2015).

Ličinke in nimfe iksodidnih klopov se hranijo od tri do šest dni, medtem ko se odrasli hranijo od nekaj dni do dva tedna. Prebava krvnega obroka se začne v prvih nekaj urah po začetku hranjenja in traja več tednov ali mesecev (Estrada-Peña 2015).

1.1.8 Pomen klopov v ekosistemu

Klopi igrajo pomembno vlogo v prehranjevalnem spletu. V ekosistemu imajo številne oblike sovražnikov, kot so plenilci, parazitoidi in patogeni organizmi. Z vsemi razvojnimi stopnjami klopov se prehranjujejo mravlje, ptice, glodavci, kuščarji, nekateri hrošči in pajki (Samish in Rehacek 1999; Mwangi in sod. 1991). Številni plenilci klopov so hkrati tudi njihovi gostitelji. Znani parazitoidi so ose skupine Hymenoptera, iz rodu *Ixodiphagus* in *Hunterellus* (Mwangi in sod. 1991). Vse aktivne razvojne stopnje klopov so vektorji patogenih organizmov (Estrada-Peña 2015). S pomočjo klopa kot prenašalca in nekaterih vrst vretenčarjev je patogen mikroorganizem zmožen zaključiti svoj življenjski krog. S sesanjem krvi na gostitelju zagotavljajo idealno možnost za širjenje mikroparazitov in s prenosom različnih prenašalcev bolezni med organizmi skrbijo za nekakšno naravno cepljenje prostoživečih živali (Sonenshine in Roe 2014).

1.1.9 Navadni gozdni klop *Ixodes ricinus*

Navadni gozdni klop *Ixodes ricinus* (Slika 5) je nedvomno najbolj poznana preučevana vrsta klopa v Evropi. Tu se vrsta najpogosteje pojavlja in je široko razširjena. Navadni gozdni klop je med klopi poznan kot najpomembnejši prenašalec patogenih mikroorganizmov (Petney in sod. 2012).

Življenjski cikel navadnega gozdnega klopa se navadno zaključi v treh letih. V toplejših klimatih je njegova življenjska doba lahko krajša zaradi daljše aktivnosti čez letom (Dantas-Torres in Otranto 2013). *I. ricinus* ima dva vrhova sezonske aktivnosti v letu. Nimfe se najpogosteje pojavljajo spomladi in jeseni. Ličinke so pogostejše v poletnem in

jesenskem obdobju. Odrasli klopi so bolj ali manj aktivni skozi celotno sezono njihove aktivnosti (Petney in sod. 2012).

I. ricinus spada med eksofilne klope. Njegov naravni habitat so gozdovi listavcev in mešani gozdovi. Nahaja se tudi v iglastih gozdovih, gozdnem robu in vlažnih travnikih. Je na klimatske razmere občutljiva vrsta klopa (Bowman in Nuttall 2008).

Vrsta je prisotna v vseh državah zahodne Evrope. Območje razširjenosti se razteza od Velike Britanije proti vzhodu do Turčije. Drugi koridor razširjenosti poteka od Finske do juga Italije in nekaterih delov severne Afrike (Filippova 1999). Nedavne raziskave so pokazale, da se vrsta širi v severnejša območja Evrope, kot tudi v območja z višjimi nadmorskimi višinami (Materna in sod. 2008), kar je najverjetneje posledica globalnega segrevanja.

I. ricinus je prenašalec širokega nabora vrst patogenih mikroorganizmov. Med njimi sta najbolj znana borelija in virus klopnega meningoencefalitisa. Med znanimi so tudi *Anaplasma phagocytophilum* (povzročča granulocitno anaplazmozo), *Francisella tularensis* (povzročča tularemijo), *Rickettsia helvetica* in *Rickettsia monacensis* (povzročata točkovno mrzlico), *Babesia divergens* in *Babesia microti* (povzročata babeziozo), *Neoehrlichia mikurensis*, »Louping ill« virus (LIV) in Tribeč virus (TRBV) (Medlock in sod. 2013). Iz navadnega gozdnega klopa so bili do sedaj izolirani tudi virusi Lipovnik, Erve, Uukuniemi (Estrada-Peña in sod. 2017) in bakterija *Bartonella henselae* (Schouls in sod. 1999; Halos in sod. 2005).



Slika 5: (A) Dorzalna in (B) ventralna stran samice vrste *I. ricinus* (Bristol University Tick ID).

1.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Borrelia burgdorferi sensu lato je bakterija spiralne oblike s številnimi periplazemskimi bički, imenovanimi tudi endoflageli ali aksialne fibrile. Bakterijo uvrščamo med spirohete (Barbour in Hayes 1986).

1.2.1 Taksonomija in filogenija

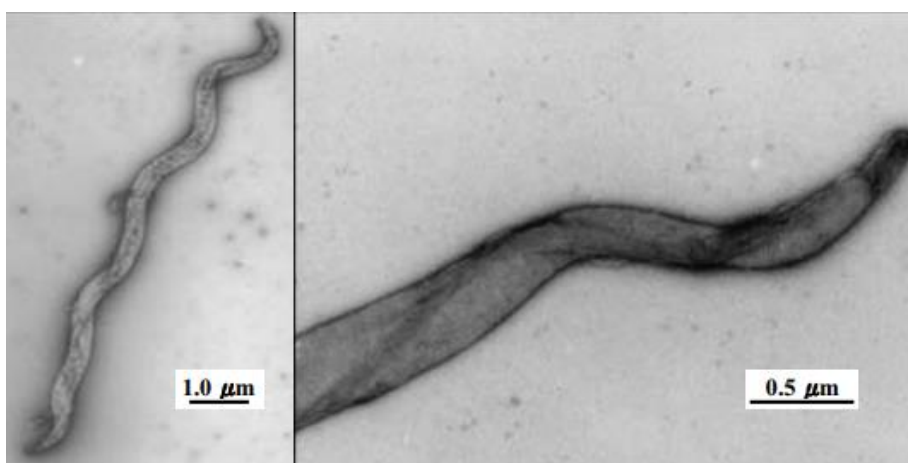
Po taksonomski klasifikaciji uvrščamo borelije v deblo Spirochates, razred Spirochaetes in red Spirochaetales. Red Spirochaetales se deli v štiri družine: Brachyspiraceae, Leptospiraceae, Brevinemataceae in Spirochaetaceae. Rodovi *Borrelia*, *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema* in *Brachyspira* spadajo v družino Spirochaetacea (Karami 2012 Wolfgang in sod. 2010). V preteklosti so vrste borelij znotraj rodu ločevali glede na njihove prenašalce (Barbour in Hayes 1986). Z razvojem molekularne biologije se je pojavila možnost natančnejših analiz vsake vrste in njihovih taksonomskih porazdelitev (Burgdorfer 1996; Wang in sod. 1999; Olsen in sod. 2000). Taksonomske skupine borelij so oblikovali na podlagi 16S rRNA zaporedij (Wolfgang in sod., 2010).

Povzročiteljico lajmske borelioze so prvi izolirali in opisali William Burgdorfer in njegovi sodelavci (1982). Dve leti kasneje so bakterijo poimenovali po odkritelju *B. burgdorferi* (Johnson in sod. 1984). Danes se rod *Borrelia* deli v tri filogenetske skupine, ki so bile oblikovane na osnovi razlik med njihovimi genetskimi in ekološkimi značilnostmi (Olsen in sod. 2000). Prva skupina povzroča povratno mrzlico, prenašalci so mehki klopi rodu *Ornithodoros*. Sem spadajo *B. caucasica*, *B. crocirudae*, *B. duttonii*, *B. hermsii*., *B. hispanica* in nekatere druge vrste borelij. Druga skupina so povzročiteljice lajmske borelioze, katerih prenašalci so trdi klopi iz rodu *Ixodes* in spadajo v kompleks *B. burgdorferi* sensu lato. Predstavnici tretje skupine sta *B. turcica* in »*Candidatus Borrelia tachyglossi*« (Margos in sod. 2018). Gostitelji borelij *B. turcica* so plazilci ter *B. tachyglossi* kljunati ježki. Prenašalci tretje skupine borelij so ščitasti klopi, njihova patogenost pa je neznana (Gofton in sod. 2018). Spiroheta *B. miyamotoi* pripada kompleksu borelij povratne mrzlice (Scoles in sod. 2001), njeni prenašalci pa so iksodidni klopi, ki so tudi prenašalci povzročiteljev lajmske borelioze (Barbour in sod. 2009). *B. miyamotoi* se pojavlja v Evropi, Aziji in Severni Ameriki (Gugliotta in sod. 2013)

1.2.2 Morfološke značilnosti

Borelije so podolgovate, tanke ter valovite celice, katerih dolžina znaša od 10 do 30 μm , v širino pa merijo od 0,2 do 0,5 μm (Slika 6) (Barbour in Hayes 1986). Zunanjo površinsko plast borelij sestavljajo zunanje membrane, ki obdajajo periplazemski prostor. Ta ponavadi vsebuje od sedem do enajst periplazemskih bičkov in notranji predel, protoplazemski

cilinder (Hayes in Burgdorfer 1993). Bakterije si pri gibanju pomagajo s svojo spiralno obliko, s krhko zunanjo celično membrano (obdaja jo protoplazemski kompleks cilindrov, ki je sestavljena iz citoplazme, notranje celične membrane in sloja peptidoglikana) ter bipolarnimi bički. Ti se nahajajo v periplazemskem prostoru. Tu se pritrdijo na pol in ovijajo okoli celičnega cilindra. Povzročiteljice lajmske borelioze so po Gramu negativne anaerobne bakterije, vendar so *in vitro* uspešne tudi v mikroaerobnih razmerah. Na zunanji membrani se nahajajo membranski proteini (angl. outer surface proteins, Osp), ki služijo preživetju borelij v gostitelju (Paster in sod. 2010).



Slika 6: *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Masuzawa 2004).

1.2.3 Genom

Genom borelije spada med kompleksnejše genome v skupini bakterij, saj ima več oblik DNA molekul. Sestavljen je iz linearnega kromosoma, ki vsebuje od 946 do 952 kbp (Sherwood in sod 1993; Davidson in sod. 1992) ter veliko krožnih in linearnih plazmidov od 5 do 55 kbp (Servent in sod. 1993). Celoten genom povzročiteljice lajmske borelioze v povprečju vsebuje okoli 1,3 Mbp (Schutzer in sod. 2011) in domnevno kodira 1283 genov (Qiu in sod. 2004). Linearni kromosomi so zelo stabilni, saj je med izolati borelij le malo razlik. Starejše domneve glede podobnosti med genomi temeljijo na teoriji, da so se genetske spremembe dogajale le s počasnejšimi mutacijami. Z novejšimi molekularnimi tehnikami (na primer sekvenciranje celotnega genoma) so odkrili, da so za spremembe med genomi odgovorne predvsem horizontalne izmenjave genetskih informacij (rekombinacija alelov, genetski zdrs, naravna selekcija) in ne zgolj točkovne mutacije (Qiu in sod. 2004). Stopnja mutacije pri borelijah je relativno nizka, saj so zelo počasi rastoče bakterije (Gatewood Hoen in sod. 2009).

1.2.4 Geografska razširjenost

Populacijo borelij oblikuje dinamika in demografski procesi populacije gostiteljev in prenašalcev ter zunanji abiotski dejavniki (kombinacija temperature in vlažnosti ter tip podnebja in pokrajine), ki prav tako vplivajo na geografsko razširjenost vektorjev in gostiteljev (Margos in sod. 2011). V Evropi so najbolj razširjene vrste, ki povzročajo lajmsko boreliozo pri ljudeh, *B. burgdorferi* sensu stricto (Slika 7), *B. afzelii* (Slika 8) in *B. garinii* (Slika 9), sledita *B. spielmanii* in *B. bavariensis* (Stanek in Reiter 2011). Vrsta bakterije, ki povzroča lajmsko boreliozo pri kuščarjih družine Lacertidae in je pogosta v Evropi, je *B. lusitaniae*. Značilna je za Mediteran, vendar so jo odkrili tudi v državah na severo-zahodu Evrope (Vollmer in sod. 2011). Globalno najbolj razširjena povzročiteljica lajmske bolezni je *B. garinii*. Vrsta bakterije je geografsko razširjena od zahodne Evrope do vzhodne Azije ter zajema tudi nekatere otoke na južni polobli, ki segajo v zmerno hladno podnebje. Poleg sesalcev so njeni gostitelji tudi nekatere vrste morskih ptic. Klop *Ixodes uriae* je prenašalec *B. garinii* in se hrani na nekaterih vrstah ptic (Smith in sod. 2006). Preglednica 1 prikazuje razširjenost različnih vrst borelij, vrst kloпов, ki prenašajo našete borelije ter gostitelje posameznih vrst borelij.

Preglednica 1: Različne vrste kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato in njihova geografska razširjenost (Margos in sod. 2019).

Vrsta borelije	Geogr. razširjenost	Vrsta prenašalca	Gostitelj
<i>B. afzelii</i>	Azija, Evropa	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. hexagonus</i>	glodalci, insektivori
<i>B. americana</i>	Severna Amerika	<i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>	ptice, glodalci
<i>B. andersonii</i>	Severna Amerika	<i>I. dentatus</i>	zajci, ptice
<i>B. bavariensis</i>	Evropa, Azija	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. uriae</i>	glodalci
<i>B. bissetiae</i>	Evropa, Severna Amerika	<i>I. ricinus</i> , <i>I. spinipalpis</i> , <i>I. pacificus</i>	glodalci
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Evropa, Severna Amerika	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. affinis</i> , <i>I. minor</i> , <i>I. hexagonus</i>	glodalci, ptice, insektivori, karnivori
<i>B. californiensis</i>	Severna Amerika	<i>I. pacificus</i> , <i>I. jellisoni</i> , <i>I. spinipalpis</i>	glodalci
<i>B. carolinensis</i>	Severna Amerika	<i>I. minor</i>	glodalci
<i>B. chilensis</i>	Južna Amerika	<i>I. stilesi</i>	glodalci
<i>B. garinii</i>	Azija, Evropa	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. uriae</i>	ptice
<i>B. japonica</i>	Azija	<i>I. ovatus</i>	glodalci
<i>B. kurtenbachii</i>	Severna Amerika	?	glodalci
<i>B. lanei</i>	Severna Amerika	<i>I. spinipalpis</i> , <i>I. pacificus</i>	zajci?
<i>B. lusitaniae</i>	Evropa	<i>I. ricinus</i>	kuščarji
<i>B. mayonii</i>	Severna Amerika	<i>I. scapularis</i>	glodalci?

Vrsta borelije	Geogr. razširjenost	Vrsta prenašalca	Gostitelj
<i>B. sinica</i>	Azija	<i>I. ovatus</i>	glodalci
<i>B. tanukii</i>	Azija	<i>I. tanuki</i>	glodalci
<i>B. turdi</i>	Azija, Evropa	<i>I. turdus</i> , <i>I. frontalis</i> , <i>I. ricinus</i>	ptice
<i>B. spielmani</i>	Evropa	<i>I. ricinus</i> , <i>I. hexagonus</i>	glodalci
<i>B. valaisiana</i>	Evropa	<i>I. ricinus</i>	ptice
<i>B. yangtzensis</i>	Azija	<i>I. granulatus</i>	glodalci



Slika 7: Razširjenost *B. burgdorferi* sensu stricto v Evropi (Hubalek in Halouzka 1997).



Slika 8: Razširjenost *B. afzelii* v Evropi (Hubalek in Halouzka 1997).



Slika 9: Razširjenost *B. garinii* v Evropi (Hubalek in Halouzka 1997).

Podnebne razmere se skozi leta spreminjajo, spreminja se tudi razširjenost klopov in ostalih prenašalcev borelij. Glede na to, da imajo povzročiteljice bolezni širok nabor gostiteljev, lahko povežemo povečanje obolelih z lajmsko boreliozo z večanjem številčnosti prenašalcev in njihovim geografskim širjenjem (Franke in sod. 2013).

1.2.5 Način prenosa borelij

Glavni prenašalci *B. burgorferi* sensu lato so klopi (Radolf in sod. 2012). Borelija je bila dokazana tudi v nekaterih vrstah komarjev rodu *Aedes* in *Culex* (Kosik-Bogacka in sod. 2002; Halouzka in sod. 1999), v bolhah (rodova *Ctenophthalmus* in *Ctenocephalides*) ter konjskih in jelenovih muhah. Prenos borelij iz komarjev, muh in bolh na gostitelja in obratno je vprašljiv (Magnarelli in Anderson 1988).

Za vzdrževanje zapletenega enzooskega cikla se mora borelija prilagoditi na izrazito različna okolja (klopi, sesalci in ptice). Beljakovine na zunanji strani membrane *B. burgorferi* sensu lato imajo ključno vlogo pri uspešnosti razmnoževanja in prehajanja iz enega gostitelja na drugega. Med sezono neaktivnosti klopov spirohete preživijo v mirujočem stanju v srednjem črevesju nimf. Takrat se na membrani bakterije izraža predvsem beljakovina OspA (Schwan in Piesman 2000).

Med hranjenjem se klop okuži z gostiteljevo krvjo, če je v njej prisoten patogen organizem. S prebavo pridejo mikroorganizmi do črevesne stene, kjer se vključijo v krvni obtok hemolimfe in vdrejo v somatske celice klopa (Radolf in sod. 2012). Pri prehodu v celice gostitelja sodeluje več različnih proteinov: OspA, OspB in OspD (Schwan in Piesman 2000). OspA spodbuja vezavo borelije na klopov protein TROSPA, ki je prisoten na epitelnih celicah v črevesju (Pal in sod. 2004). Bakterijski protein OspB ima vlogo tudi pri pritrjevanju bakterije na črevo klopa (Neelakanta in sod. 2007).

Prenos borelij iz klopa na vretenčarja se začne od 24 do 48 ur po vbodu klopa (Radolf in sod. 2012). Ko se z borelijo okužen klop hrani na gostitelju, se spirohete v črevesju klopa začnejo hitro razmnoževati. Večina jih preneha izločati beljakovino OspA, sočasno pa začnejo izločati beljakovino OspC ter se z njeno pomočjo začnejo seliti iz črevesja v žleze slinavke. OspC je ključna beljakovina za transport borelij iz klopa v vretenčarja. Pri nekaterih vrstah borelij se izločata tudi beljakovini OspE in OspF, ki imata enako vlogo kot OspC (Hefty in sod. 2002). Porast beljakovine OspC doseže vrh po dveh dneh hranjenja (Schwan in Piesman 2000).

Ker se klopi na vsaki aktivni razvojni stopnji hranijo enkrat (velja predvsem za trde klope), se mora povzročitelj bolezni obdržati v klopu po njegovi levitvi telesa v naslednji razvojni stadij in s tem tudi biti sposoben, da med hranjenjem naslednje stopnje klopa preide v novo

skupino vretenčarjev. Taka oblika prehoda patogenih organizmov se imenuje transstadialni prehod. Druga ključna značilnost je transovarialni prehod oziroma prenos borelije iz samice klopa na oplojena jajčeca (Hartemink in sod. 2008).

1.3 Lajmska borelioza

Lajmska borelioza je kompleksna bolezen, ki je posledica okužbe z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Burgdorfer in sod. 1982).

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je bila lajmska borelioza v Združenih državah Amerike priznana kot človeška bolezen kjer so poročali o nekaj sto primerih na leto (Sonenshine in Roe 2014). Ime je dobila po mestu Old Lyme (Connecticut, ZDA), kjer je bila leta 1977 prepoznana kot epidemična bolezen sklepov (oligoartikularni artritis) pri otrocih, živečih na tem območju (Steere in sod. 1976; Steere in sod. 1977). Pojavnost lajmske borelioze se je v zadnjih treh desetletjih dramatično povečala na več kot 100 000 zabeleženih primerov na leto pri ljudeh po vsem svetu (Steere in sod. 2004; Lindgren in Jaenson 2006). Do leta 2017 je bilo identificiranih 52 vrst borelij. Od tega je 21 vrst znanih kot povzročiteljice lajmske borelioze, katerih prenašalci so klopi (Cutler in sod. 2017).

V Severni Ameriki se bolezen najpogosteje pojavlja v Novi Angliji ter srednji in severni Kaliforniji (Oregon). Na teh območjih je letno zabeleženih med 15 000 in 20 000 obolelih ljudi (Steere in sod. 2004). V Evropi je bolezen endemična v večini severnih in srednjih držav. Najvišje stopnje prevalence so bile zabeležene v Nemčiji, Avstriji, Sloveniji in Švedski. Število prijavljenih primerov v Evropi vsako leto presega 85 000 (Lindgren in Jaenson 2006). Tudi celotno Azijo pokrivajo primeri okužb z borelijami, ki povzročajo lajmsko bolezen. Največ primerov je bilo zabeleženih v nekaterih delih Rusije, Kitajske in Japonske. Zaradi določenih jurisdikcij v nekaterih državah in regijah podatki o prevalenci lajmske borelioze niso na voljo, vendar se domneva, da je bolezen zelo razširjena tudi na ostalih območjih Azije (Davidson in sod. 2003; Stanek in Strle 2003, WHO 2005).

1.3.1 Klinične značilnosti

Bolezen lahko prizadene številne organske sisteme. Okužba z *B. afzelii* povzroči spremembe na koži pri ljudeh. *B. garinii* in *B. bavariensis* povzročata nevroboreliozo, medtem ko je *B. burgdorferi* sensu stricto znana povzročiteljica artritisa. Nekaterne vrste borelij le redko povzročijo bolezen pri ljudeh, lahko pa prizadenejo nekatere živali in obratno (Rudenko in sod. 2011; Strle in Stanek 2009).

Borelije so prisotne v slini klopa in se ob vbodu sprostijo v kožo gostitelja. Slina vsebuje snovi, ki zavirajo gostiteljev imunski odziv ob mestu vboda. Začasno nedelujoč imunski odziv omogoči, da se borelije lahko razmnožujejo (Steere in sod. 2004). Možnost okužbe s povzročiteljico lajmske borelioze nastane vsaj 24 ur po tem, ko se klop prične hraniti na gostitelju. Bolezen se pojavi v treh stopnjah: v lokalizirani, razširjeni in kronični obliki. Pri prvi stopnji se v začetnem obdobju borelije razmnožujejo ob mestu vboda klopa. Sledi ji razširjena oblika okužbe. Če se bolezen ne zdravi, lahko čez mesece ali leta nastopi pozno obdobje, ko okužba postane kronična. Oboleli ima lahko vse ali posamezne oblike bolezni (Steere 1989; Strle in Stanek 2009). V prvi stopnji lajmske borelioze se pri 90 % bolnikov pojavi klinični znak okužbe – potujoči eritem (angl. erythema migrans) (Nadelman in Wormser 1998). Vnetni odziv gostitelja na patogeno bakterijo (potujoči eritem) se po nekaj dneh po vbodu klopa začne širiti navzven v ovalni obliki, v centru pa zbledi (Steere in sod. 2004). Spremljajo ga lahko glavobol, vročina, bolečine v mišicah in sklepih, slabo počutje in otečene področne bezgavke. Na mestu znaka okužbe se pogosto pojavita srbečica in bolečina (Stanek in sod. 1996). Drugi znak lajmske borelioze, ki je ponavadi redek, je borelijski limfocitom. To je neboleča bulica na ušesni mečici, prsnih bradavicah ali modih. Ta klinični znak je pogostejši pri otrocih. Vzrok nastanka je proliferacija (rast in delitev) limfocitov B v podkožju (Stanek in sod. 2010). Kronični atrofični akrodermatitis se večkrat pojavi pri starejših in je pozna oblika lajmske borelioze. Pojavi se na okončinah v obliki kožnih poškodb. Izrazi se lahko od pol leta do nekaj let po okužbi z borelijo (Strle in sod. 2014). Lajmska borelioza se največkrat izraža v kožnih oblikah obolenja in se največkrat kaže v akutni obliki. Bolezen lahko prizadene obrazne in možganske živce (mielitis, encefalitis, cerebralni vaskulitis), oči, sklepe, možna, vendar zelo redka, je tudi okužba ploda preko okužene matere (Stanek in sod. 2010; Steere 1989).

1.3.2 Diagnostika lajmske borelioze

Nekatere okužbe z borelijami iz kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato lahko povzročajo nespecifične klinične znake z odsotnostjo tipičnega kožnega obolenja – potujočega eritema, zato so za diagnozo potrebne laboratorijske preiskave.

Borelije se lahko neposredno dokazuje z različnimi pristopi v diagnostiki: z dokazovanjem specifičnih borelijskih beljakovin, dokazovanjem specifičnih nukleinskih kislin, kultivacijo v posebnem gojišču in mikroskopiranjem v temnem polju. Žive bakterije se lahko opazuje z mikroskopiranjem v temnem polju ali s fazno kontrastno mikroskopijo (Aguero-Rosenfeld in sod. 2005).

Kultivacija in osamitev borelij se kot neposredni metodi v zdravstvu uporabljata pri klinični diagnostiki bolezni, predvsem ko gre za potrditev pri neodločnih primerih (Aguero-Rosenfeld in sod. 2005; Stanek in sod. 2010). Metodi veljata za »zlati standard«

potrditve aktivne okužbe. Uspešnost metode je odvisna od prave izbire gojišča, števila gibljivih borelij, ki so prisotne v tkivu, ter možnosti kontaminacije vzorca. Rezultati so pogosto negativni, kar pa ne izključuje okužbe. Ob tem je kultivacija dolgotrajen postopek z omejeno občutljivostjo (Maraspin in sod. 2001; Stanek in sod. 2010). Za osamitev se pogosto uporablja modificirano Kelly-Pettenkoferjevo (MKP) gojišče, ki med drugim vsebuje CMRL-1066, faktor 5 iz govejega seruma (služi kot bogat vir proteinov in uravnava pH), N-acetilglukozamin (prekurzor za sintezo celične stene), zajčji serum, citrat in piruvat.

Posredni pristopi za dokazovanje borelij temeljijo na dokazu protiteles proti bakterijskim antigenom, ki se tvorijo do enega meseca po vbodu (6-8 tednov protitelesa razreda IgM, po 3 mesecih protitelesa razreda IgG) in lahko ostanejo v telesu še nekaj let po zdravljenju bolezni. Serološke preiskave pogosto sestavljajo dvostopenjsko testiranje. Prvi del je presejalni test, najpogostejše uporabljen je EIA test (ang. Enzyme linked immunosorbent assay). Če so rezultati dvoumni je potreben še potrditveni test (Aguero.Rosenfeld in sod. 2005).

1.3.3 Zdravljenje lajmske borelioze

Zdravljenje lajmske borelioze je priporočljivo v vseh fazah bolezni. Če se bolezen prične dovolj zgodaj zdraviti z antibiotiki je običajno malo zapletov in večina bolnikov popolnoma okreva. Potujoči eritem praviloma na koži izgine po nekaj tednih tudi brez antibiotičnega zdravljenja, vendar se borelije lahko razširijo po telesu in lahko povzročijo okužbe centralnega živčevja, srca in sklepov (Stanek in Strle 2018).

1.3.4 Lajmska borelioza pri živalih

V večini habitatov so predstavniki jelenjadi in srnjadi glavni gostitelji, ki lahko nahranijo zadostno število odraslih klopov za vzdrževanje njihove populacije, kljub temu se lahko okužijo z *B. burgorferi* sensu lato, vendar niso njeni glavni gostitelji (Gern in sod. 1998; Wodecka 2007). Najpogostejši gostitelji in glavni rezervoar patogene bakterije so mali sesalci (miši, voluharji) in nekatere vrste ptic (Stanek in sod. 2012). Z borelijo se lahko okužijo tudi ostale večje gozdne živali. Med živinorejnimi živalmi so pogostejši gostitelji borelij živali drobnice (Gray in sod. 1995; Stanek in sod. 2012). Če se populacija jelenjadi in srnjadi v naravi zmanjša, se klopi hranijo na drugih vrstah živali, ki ponavadi ne predstavljajo pogostih gostiteljev (Stanek in sod. 2012). S tem pa lahko število okuženih malih sesalcev naraste zaradi spremembe v številčnosti glavnih gostiteljev klopov v naravi. Različni gostitelji borelij kažejo bolezenske znake zaradi okužbe z določeno vrsto borelije, kar pomeni, da so na nekatere borelijske vrste bolj občutljivi kot na druge (Bykowski in sod. 2008).

Pri živalih so lahko klinični znaki lajmske borelioze precej nespecifični, zato se jih lahko pogosto zamenja z znaki kakšnih drugih bolezni. Pri sesalcih, ki se lahko okužijo s patogeno bakterijo, so med bolezenskimi znaki najpogosteje prizadeti sklepi, kar se kaže v obliki artritisa. Poleg poškodbe sklepov lahko privede tudi do okvar živčevja, srca, oči in ledvic. V najhujših primerih nezdravljene bolezni lahko žival tudi pogine (Fritz in Kjemtrump 2003).

Pri raziskavah borelij v kopitarjih so odkrili, da ima več kot 20 % predstavnikov te skupine prisotna protitelesa proti *B. burgdorferi* sensu lato (Magnarelli in Anderson 1989). Okužbe z *B. burgdorferi* sensu lato so na podlagi seroloških raziskav dokazali pri psih. Na določenih območjih so za pozitivnost borelij testirali od 25 % do 90 % vseh psov (Guerra in sod. 2000; Magnarelli in sod. 1990). Kljub detekciji spirohet, se klinični znaki lajmske borelioze niso razvili pri vseh psih. Klinični znaki so bili pogostejši pri mlajših psih. Prizadeti psi pogosto izgubijo apetit in telesno težo, pojavi se tudi povišana telesna temperatura in artritis (Fritz in Kjemtrup 2003). Če se bolezen ne zdravi pravočasno, v času od dveh do petih mesecev od okužbe, pogosto nastopi ohromelost. Možnost okužbe z borelijo pri mačkah je manjša, saj so proti boreliji razvile dobro imunost. Mačke redko razvijejo klinične znake bolezni, tudi če se okužijo večkrat (Littman in sod. 2018).

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Izbor lokacij

Klope smo nabirali spomladi in zgodaj poleti v letih 2018 in 2019 med najvišjo sezonsko aktivnostjo klopov v obalno-kraški in primorsko-notranjski regiji. V letu 2018 smo izbrali sedem različnih lokacij obalno-kraške regije (Preglednica 2, Slika 10), v primorsko-notranjski regiji pa smo klope nabirali na štirinajstih lokacijah (Preglednica 3, Slika 11). Vzorčenje je v letu 2018 potekalo od maja do junija (lokacijo Rakov Škocjan smo vzorčili v juliju), naslednje pa v maju. V letu 2019 smo v primorsko-notranjski regiji vzorčili na dvanajstih različnih lokacijah (Preglednica 4, Slika 12), v obalno-kraški regiji pa smo zbrali vzorce na desetih določenih lokacijah (Preglednica 5, Slika 13). Več lokacij smo izbrali na področju primorsko-notranjske regije, saj je bila na tem območju v preteklosti zabeležena višja prevalenca lajmske borelioze pri ljudeh kot v obalno-kraški regiji (Nacionalni inštitut za javno zdravje). Zaradi vpliva vremenskih razmer je bilo število vzorčenih klopov na lokacijah vzorčnih mest različno.

Preglednica 2: Vzorečenje klopov obalno-kraške regije v letu 2018.

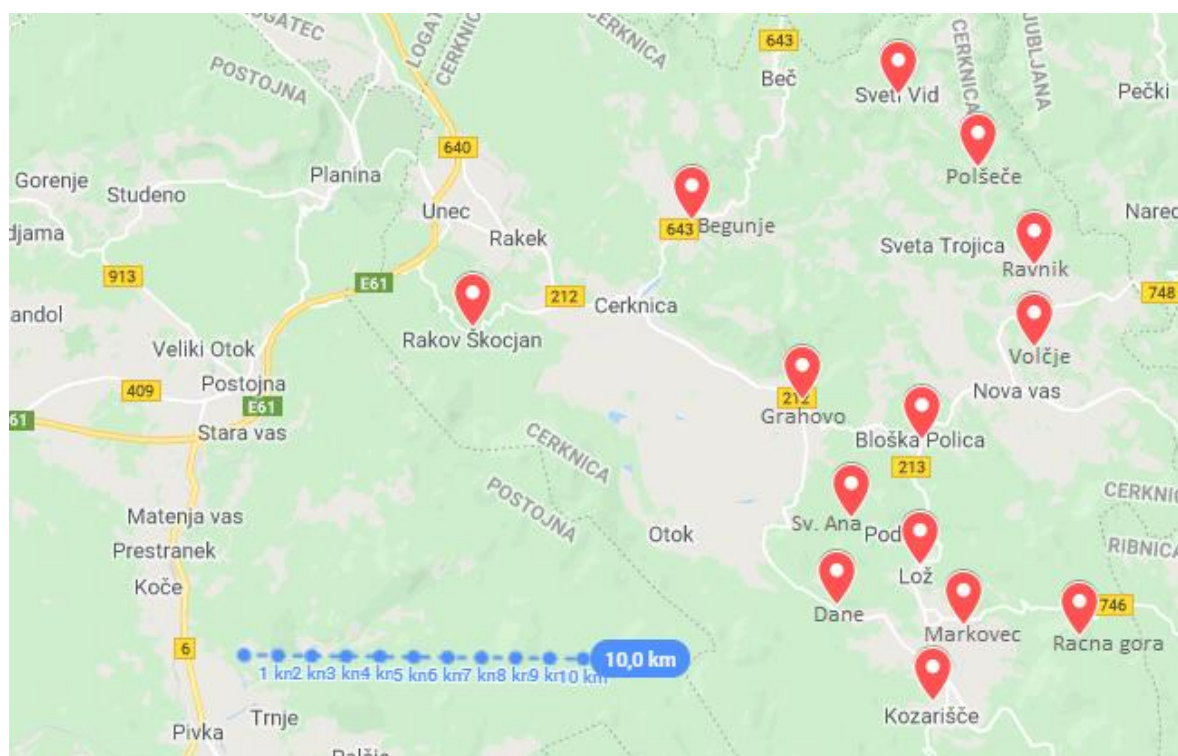
Lokacija	Datum vzorčenja	Habitat
Koštabona	1.6.2018	Travnik
Šmarje	1.6.2018	rob gozda
Babiči	28.5.2018	gozd, vinograd
Marezige	28.5.2018	rob gozda
Vanganel	28.5.2018	gozd ob jezeru
Koper	19.5.2018, 20.5.2018	gozd, rob gozda, travnik
Korte	19.5.2018	Travnik



Slika 10: Zemljevid lokacij vzorčenja klopi obalno-kraške regije v letu 2018.

Preglednica 3: Vzorčenje klopi primorsko-notranjske regije v letu 2018.

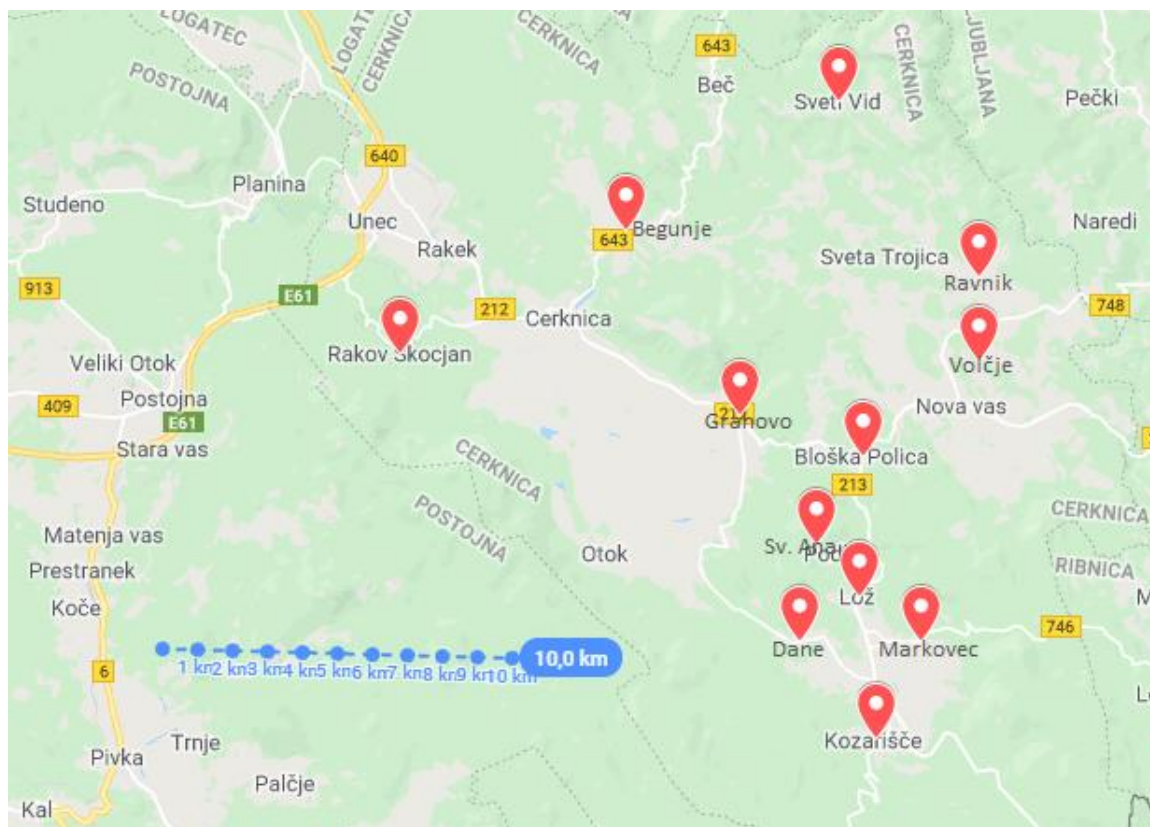
Lokacija	Datum vzorčenja	Habitat
Begunje	10.5.2018	travnik, rob gozda
Bloška Polica	19.5.2018	rob gozda, mačka in pes
Kozarišče	20.5.2018	Gozd
Racna gora	20.5.2018	gozd
Grahovo	28.5.2018	travnik, rob gozda
Volčje	19.6.2018	gozd
Ravnik	19.6.2018	travnik, rob gozda
Polšeče	19.6.2018	gozd
Sv. Vid	19.6.2018	rob gozda
Lož	23.6.2018	gozd
Sv. Ana	23.6.2018	gozd, rob gozda
Markovec	23.6.2018	rob gozda
Dane	23.6.2018	gozd
Rakov Škocjan	9.7.2018	gozd



Slika 11: Zemljevid lokacij vzorčenja klopov primorsko-notranjske regije v letu 2018.

Preglednica 4: Vzorčenje klopov primorsko-notranjske regije v letu 2019.

Lokacija	Datum vzorčenja	Habitat
Bloška Polica	16.5.2019	travnik, mačka in pes
Kozarišče	16.5.2019	gozd, rob gozda
Markovec	16.5.2019	rob gozda
Dane	16.5.2019	gozd
Lož	16.5.2019	gozd, rob gozda
Sv. Ana	16.5.2019	gozd
Grahovo	17.5.2019	travnik, rob gozda
Begunje	17.5.2019	travnik
Rakov Škocjan	17.5.2019	gozd
Volčje	18.5.2019	gozd
Ravnik	18.5.2019	travnik, rob gozda
Sv. Vid	18.5.2019	rob gozda



Slika 12: Zemljevid lokacij vzorčenja klopov primorsko-notranjske regije v letu 2019.

Preglednica 5: Vzorčenje klopov obalno-kraške regije v letu 2019.

Lokacija	Datum vzorčenja	Habitat
Koštabona	22.5.2019	Travnik
Šmarje	22.5.2019	rob gozda
Korte	22.5.2019	rob gozda
Dragonja	22.5.2019	rob gozda, travnik
Glem	22.5.2019	rob gozda
Vanganel	22.5.2019	gozd ob jezeru
Sv. Anton	23.5.2019	rob gozda
Gračišče	23.5.2019	travnik, rob gozda
Osp	23.5.2019	rob gozda
Koper	23.5.2019	travnik, rob gozda



Slika 13: Zemljevid lokacij vzorčenja klopov obalno-kraške regije v letu 2019.

2.2 Vzorčenje klopov

Klope smo vzorčili s pomočjo metode zastave na lokacijah obeh regij. Za vzorčenje klopov s tovrstno metodo smo uporabili bel kos flanelaste tkanine v velikosti 1 m², ki je na eni strani pritrjena na palico. Zastavo smo počasi vlekli po površini vegetacije. Po nekaj vlekah smo tkanino obrnili in jo pregledali. Način nabiranja klopov na grmičevju in nižje rastočemu drevju je spominjal na nežno mahanje z zastavo po rastlinju. Metodo zastave s tujko imenujemo »dragging« (Slika 14) in »flagging« (Slika 15) (Estrada-Peña in sod. 2017). Klope vseh razvojnih stopenj, ki so se prijeli na tkanino, smo s pinceto pobrali iz zastave in jih primerno shranili za nadaljnje raziskave. Na tkanini smo našli neprisrane primerke vseh aktivnih razvojnih stopenj, ki na rastlinju aktivno prežijo na gostitelje. Vsako lokacijo smo vzorčili 30 minut. Po končanemu vzorčenju vsake lokacije smo vzorce označili ter jim priložili listek s podatki o lokaliteti, datumu vzorčenja in tipu habitata. Klope smo vzorčili na travnikih, gozdu in robu gozda.



Slika 14: »Dragging« (Šušnjar, 2019).



Slika 15: »Flagging« (Šušnjar, 2019).

Klope iz leta 2018 smo shranili v mikrocentrifugirke s 70 % etanolom ter jih spravili v zamrzovalnik do molekularnih raziskav. Klope, ki smo jih vzorčili spomladi 2019, smo žive shranili v mikrocentrifugirke za raziskave z uporabo metode kultivacije in osamitve borelij. Iz vzorcev, ki so se kontaminirali tekom kultivacije in iz vzorcev, ki so ostali negativni smo izolirali celokupno nukleinsko kislino in borelije dokazovali z metodo PCR v realnem času.

2.3 Delo v laboratoriju

V laboratoriju Fakultete za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije v Kopru smo shranjene klope pregledali s stereolupo ter jih določili do vrste na podlagi morfoloških značilnosti s pomočjo določevalnega ključa Tick of Europe and North Africa (Estrada-Peña in sod. 2017). Določili smo 391 klopov iz leta 2018, od teh je bilo 81 nabranih na območju obalno-kraške regije in 310 v primorsko-notranjski regiji. V vzorcih iz leta 2019 je bilo določenih 559 primerkov - 452 klopov iz primorsko-notranjske ter 107 iz obalno-kraške regije. Med vsemi vzorčenimi razvojnimi oblikami so bile najbolj pogoste nimfe. Po številčnosti so sledili odrasli klopi, kjer je bilo vzorčenih več samic kot samcev.

Nadaljnje laboratorijske raziskave so potekale na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete (laboratorij za diagnostiko borelioz in leptospiroze in laboratorij za molekularno bakteriologijo in mikologijo) v Ljubljani.

2.3.1 Kultivacija borelij

Klope, ki smo jih nabrali spomladi 2019, smo žive shranili v mikrocentrifugirke za nadaljnje raziskave z uporabo metode kultivacije in osamitve borelij. V laboratoriju v Ljubljani smo klope površinsko očistili v petrijevkah s 70 % etanolom in destilirano vodo (vsakega klopa smo namakali po 10 minut v vsaki raztopini) ter jih z uporabo aseptične tehnike v laminariju prenesli v tekoče gojišče, modificiran Kelly-Pettenkofer medij, ki smo ga predčasno razdelili v mikrocentrifugirke. Ob vnosu klopa v tekoče gojišče smo vsakega prebodli s sterilno iglo z namenom, da bi se bakterije iz klopa sprostile v gojišče. Vse vzorce smo inkubirali pri temperaturi 33 °C od 9 do 12 tednov. Nekatera gojišča so se kontaminirala že po nekaj dneh inkubacije in se pri tem obarvala v motno rumeno barvo, na dnu mikrocentrifugirke pa je nastala usedlina (Slika 16). Gojišča smo spremljali dnevno. Sprememba barve iz rdeče v rumeno ob bistrem gojišču pomeni rast borelij, zato smo ob spremembi pregledali kapljico gojišča z mikroskopiranjem v temnem polju (Slika 17). Prisotnost gibljivih borelij kaže na uspešnost kultivacije (Ružić-Sabljić in sod. 2002). Pregledane vzorce smo precepili v dve sveži gojišči. Če po enem mesecu do spremembe barve gojišča ni prišlo, smo gojišče centrifugirali in sediment precepili v sveže gojišče ter nadaljevali z inkubacijo pri temperaturi 33 °C. Če po dvanajstem tednu gojišče še vedno ni spremenilo barve, smo vzorec ponovno centrifugirali in usedlino pregledali z mikroskopiranjem v temnem polju. Negativne in kontaminirane vzorce smo uporabili še za nadaljnje molekularne raziskave z metodo izolacije nukleinske kisline in PCR v realnem času. Postopki molekularnih analiz vzorcev 2019 so enaki postopkom analiz vzorcev klopov iz leta 2018.



Slika 16: Klopa v tekočih gojiščih po dveh dneh inkubacije (levo: kontaminirano gojišče z usedlino polutantov, desno: čisto gojišče brez borelij) (Fotografija: Jana Šušnjar 2019).



Slika 17: Mikroskopiranje borelij v temnem polju (Fotografija: Jana Šušnjar 2019).

2.3.2 Genotipizacija osamljenih borelij

Osamljene borelije smo genotipizirali z metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov in elektroforeze v utripajočem električnem polju (*MluI*-LRFP).

Pozitivne vzorce smo precepili v več gojišč in namnožili borelije do količine primerne za nadaljnje analize. Gojiščne epruvete smo združili in koncentrirali s centrifugiranjem. Sediment smo sprali s pufrom TN in spektrofotometrično določili koncentracijo borelij. Vzorec borelij smo zmešali z enako količino 2 % agaroze UltraPure LMP Agarose pripravljene s TN pufrom (10 mM Tris HCl - pH 7,6 in 1 M NaCl). Zmes smo nalili v modelčke za izdelavo agaroznih kock ter počakali, da se strdi. Strjeno zmes smo prenesli v epruvete, kamor smo dodali tudi 50 ml pufru za lizo (1 M NaCl; 20 mM Tris HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA; 0,5 % Brij 58; 0,2 % deoksiholat; 0,5 % N-laurilsarkozin; RNAza 10 µg/ml; lizocim 1 mg/ml). Agarozne kocke smo 24 ur inkubirali na stresalniku pri temperaturi 37 °C. Po zaključku inkubacije smo jih spirali s TE pufrom (10 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA) ter jim dodali pufer za razgradnjo (20 mM Tris HCl pH 8,5; 466 mM EDTA; 1 % N-laurilsarkozin; 0,5 mg/ml proteinaze K). Vse skupaj smo pri 50 °C inkubirali na stresalniku 72 ur. Po inkubaciji smo agarozne kocke dobro sprali s TE pufrom ter jih v čistem TE pufru shranili v hladilnik pri 4 °C (Ružić-Sabljić in sod. 2002; Ružić-Sabljić in sod. 2008).

2.3.2.1 Rezanje DNA z restrikcijskim encimom *MluI*

DNA vklopljeno v agarozne kocke smo premestili iz TE pufra, kjer so bile shranjene, v mikrocentrifugirke. Kockam smo dodali enkrat koncentrirani pufer, ki je specifičen za encim in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo zamenjali pufer z dvakrat koncentriranim pufrom ter dodali 2,5 µl encima *MluI* (25 E/ml). Čez noč smo v stresalniku inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo agarozne kocke ločili od pufra z encimom in jih shranili v TE pufer ter jih spravili v hladilnik (Ružić-Sabljić in sod. 2002; Ružić-Sabljić in sod. 2008).

2.3.2.2 Elektroforeza v utripajočem električnem polju

Za elektroforezo smo pripravili 1 % agarozni gel. Za mešanico smo uporabili 2 g agaroze Pulse Field Certified Agarose (Bio-rad, ZDA), 190 ml destilirane vode in 10 ml 10 x pufra TBE (0,89 M Tris; 0,89 M borova kislina; 0,02 M EDTA). Mešanico smo v erlenmajerici v mikrovalovni pečici segrevali dokler se ni raztopina zbistrila. Zmes smo hladili 20 minut in jo nato vlili v model za agarozni gel. V vsako luknjico strjenega gela smo vstavili po eno kocko, ki vsebuje razrezano DNA z encimom *MluI*, in označevalce Pulse Marker (Sigma-Aldrich). Gel smo položili v kad za elektroforezo z 0,5 x pufrom TBE. Elektroforeza (CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis System; Bio-rad Technologies, ZDA) je potekala v utripajočem električnem polju 1-40 s. Jakost električnega polja je bila 6 V/cm, kot 120° in trajanje elektroforeze 24 ur pri 14 °C (Ružić-Sabljić in sod. 2002; Ružić-Sabljić in sod. 2008).

Po zaključku elektroforeze smo gel prelili z raztopino etidijevega bromida, katero smo pustili delovati 20 minut. Gel z DNA odseki smo pregledali pod UV-transiluminatorjem ter ga dokumentirali s sistemom za GelDoc (Bio-Rad, ZDA). Vrsto borelije smo opredelili glede na velikost odsekov iz agaroznega gela. Za določanje vrste smo si pomagali s preglednico 6.

Preglednica 6: Določanje podskupin *Borrelia burgdorferi* sensu lato z uporabo *MluI* restrikcijskega odseka. (Številke, ki so poudarjene s krepko pisavo, predstavljajo velikost odsekov borelijske DNA, ki so značilni za vrsto in podtip borelij) (Ružić-Sabljić in Cerar 2016).

Borelijski podtip		<i>MluI</i> - LRFP (kb)			
<i>B. afzelii</i>	Mla1	440	320	90	
	Mla2	440	350	90	
	Mla3	440	350	320	90
	Mla4	470	320	90	

Borelijski podtip		MluI- LRFP (kb)				
<i>B. garinii</i>	Mlg1	260	220	140		80
	Mlg2	390	220		100	80
	Mlg3		225 220 170		100	80
	Mlg4	390	220			80
	Mlg5		260 220	140	100	80
	Mlg6		225 220 170			80
	Mlg7	390	330	220		100 80
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Mlb1	410		160	140	
	Mlb2	410		160	140	110
	Mlb3	400			140	130 100
	Mlb4	380			140	130 100
	Mlb5	400			140	130 100 80
	Mlb6	400		160	140	100
	Mlb7	400			140	110 100
	Mlb8		310		160	140 110 100
	Mlb9		320			140 110 100 90
	Mlb10	410			140	130 100
	Mlb11	410			140	110
	Mlb12			210	140	110 100
	Mlb13		290		140	110 100
	Mlb14		300 290		140	110 100
	Mlb15			210 160	140	100 90
<i>B. spielmanii</i>	Mls1		320	230	210	70
	Mls2		320	230	140	70
<i>B. valaisiana</i>	Mlv1	360	340			90
	Mlv2		340	300		90
<i>B. lusitaniae</i>	Mll1		320	300		100 90
	Mll2		320	300		100

2.3.3 Izolacija nukleinske kisline

Iz 183 klopov pridobljenih na desetih različnih lokacijah v letu 2018, smo osamili celokupno nukleinsko kislino ter borelije dokazovali z metodo PCR v realnem času (Briciu in sod. 2014; Ferdin in sod. 2010). Iz preostalih vzorcev klopov (208) nismo uspeli uspešno izolirati nukleinske kisline zaradi systemske napake aparature za avtomatsko izolacijo nukleinskih kislin. Iz vzorčenih klopov iz leta 2019 smo po končani kultivaciji izolirali celokupno DNA, kot pri klopih vzorčenih v letu 2018, ter prisotnost borelij dokazovali z metodo PCR v realnem času.

Pred izolacijo nukleinskih kislin smo predhodno shranjenega klopa v 70 % etanolu očistili z deionizirano vodo. Nato smo vsakega vstavili v svojo mikrocentrifugirko s keramičnimi kroglicami (MagNA Lyser Green Beads, Roche, Nemčija) za mehansko lizo tkiva. V vsako mikrocentrifugirko s klopom smo odpipetirali 600 µl BLB pufru za razgradnjo tkiva (MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer, Roche, Nemčija) in izvedli homogenizacijo v aparatu za homogenizacijo vzorcev Magna Lyser pri 7000 obratih 60 sekund. Vzorce smo kratko centrifugirali, dodali v vsakega 50 µl encima proteinaze K (Roche, Nemčija). Inkubirali smo jih čez noč v termo inkubatorju in mešalniku pri 65 °C. V tubice za izolacijo nukleinskih kislin, ki se prilegajo aparaturi za avtomatsko izolacijo DNA (MagNA Pure 24 System, Roche, Nemčija), smo prenesli 400 µl suspenzije vsakega vzorca. Celokupno nukleinsko kislino smo osamili z uporabo aparature za avtomatsko izolacijo DNA (Magna Pure 24 System, Roche, Nemčija) in kita za izolacijo nukleinskih kislin (MagNA Pure 24 Total Nucleic Acid Kit, Roche, Nemčija). V vse osamitve nukleinske kisline smo vključili interno kontrolo EAV (diagnostični komplet LightMix Modular EAV RNA Extraction control, Roche, Nemčija), ki smo jo dokazovali skupaj z borelijsko tarčo. Interna kontrola nam je omogočila spremljanje uspešnosti osamitve nukleinske kisline ter morebitno PCR inhibicijo (Cerar in sod. 2015).

2.3.4 Metoda PCR v realnem času za dokaz *Borrelia* sp.

Za dokaz *B. burgdorferi* sensu lato smo uporabili diagnostični komplet LightMix Modular for detection of *Borrelia* spp. (TIB, MOLBIOL, Nemčija), ki vsebuje liofilizirane začetne oligonukleotide in sondo s katerimi pomnožujemo in dokazujemo specifični odsek gena za 23S ribosomalno RNA. PCR v realnem času smo izvedli s pomočjo aparature LightCycler 480 Instrument II (Roche, Nemčija). Rezultati so bili analizirani med pomnoževanjem in merjenjem fluorescence v aparaturi za PCR v realnem času. V vsako reakcijo smo vključili tudi pozitivno in negativno kontrolo.

Reakcijsko mešanico smo pripravili v mikrobiološki komori z ločenimi pripomočki. S tem smo želeli preprečiti kontaminacijo reagentov in posledično lažno pozitivne rezultate. Za

pripravo reagentov smo kompletoma LightMix Modular for detection of *Borrelia* spp. in LightMix Modular EAV RNA Extraction control dodali 50 µl vode v vialo in premešali z vorteksiranjem dokler se liofiliziran material ni raztopil in kratko centrifugirali.

V sterilno mikrocentrifugirko smo dodali ustrezno količino reagentov iz preglednice 7, premešali s pipetiranjem in kratko centrifugirali. V mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali po 10 µl reakcijske mešanice. V pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo v ločenem prostoru dodali po 10 µl ustrezne osamljene nukleinske kisline. Ploščo smo prelepili z optično samolepilno folijo in jo centrifugirali 30 sekund pri 2000 obr/min.

Preglednica 7: Komponente za eno PCR reakcijo.

Delovni volumen za eno reakcijo [µl]	Komponenta
4,9	Voda, PCR-grade
0,5	LightMix Modular <i>Borrelia</i> spp.
0,5	LightMix Modular EAV RNA Extraction control
4,0	LightCycler® Multiplex RNA Virus Master – RT-PCR Reaction Mix, 200x konc.
0,1	LightCycler® Multiplex RNA Virus Master – RT- Enzyme Solution, 200x konc.
10	DNA

S pomočjo programske opreme Lightcycler® 480 SW smo pripravili protokol za pomnoževanje, tako da smo s klikom na ikono »New Experiment from Template« odprli pogovorno okno. V delu »Template« smo izbrali program »Gastro Light Mix Run protokol«, ki definira pomnoževanje navedeno v preglednici 8. S pritiskom na ikono »Subset editor« smo oblikovali odgovarjajoč set, ga poimenovali ter potrdili pripadajoča polja s pritiskom na gumb »Apply«. Zatem smo pritisnili na ikono »Sample editor«: v razdelku »Step 1: Select workflow« smo označili »Abs quant«, v razdelku »Step 2: Select Samples« smo označili svoj set in nato na desni strani napisali pod »Sample Name« oznake izolatov nukleinskih kislin, negativno kontrolo in pozitivno kontrolo. V razdelku »Select Filter Combinations« smo potrdili filter kombinacije 465-510 in 618-660.

S pritiskom na ikono »Save«, smo zagon shranili pod imenom testa in tekočim datumom. Ploščo smo vstavili v aparaturo za PCR v realnem času LightCycler 480 Instrument II in s pritiskom na ikono »Start Run« zagnali test. Pomnoževanje je potekalo približno 90 minut.

Preglednica 8: Temperaturni profil za PCR v realnem času.

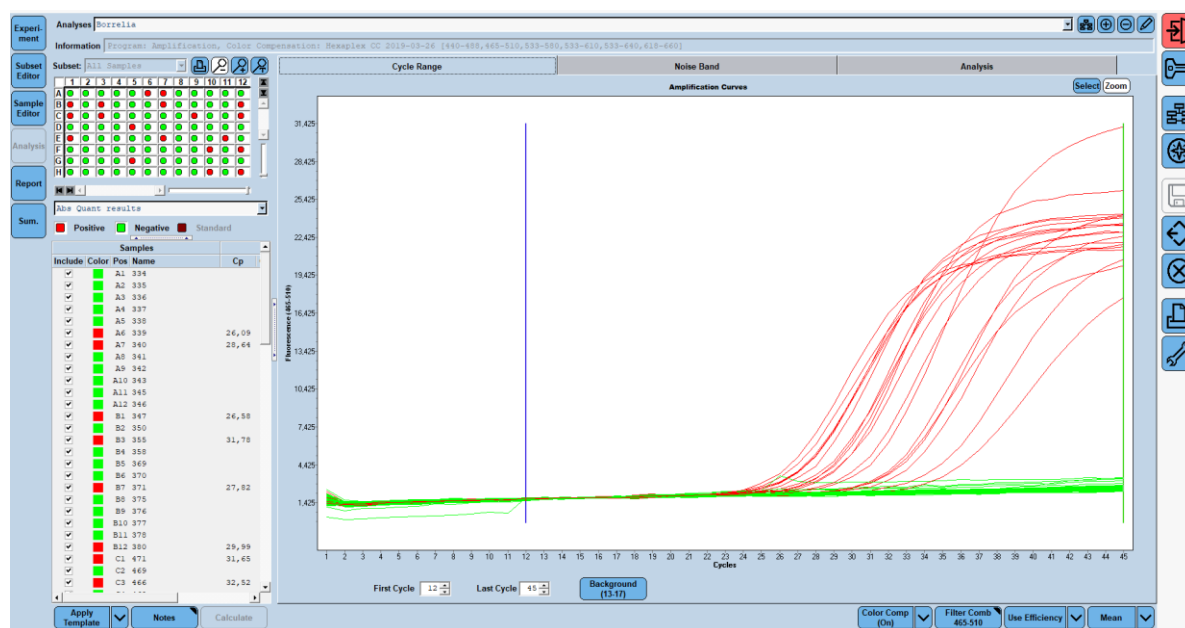
	Temperatura	Čas	Št. ciklov
Reverzna transkripcija	55 °C	5 min	1
Denaturacija	95 °C	5 min	1
Denaturacija	95 °C	5 s	45
Prileganje	60 °C	15 s	45
Podaljševanje	72 °C	15 s	45
Ohlajanje	40 °C	30 s	1

Pomnoževanje posameznih tarč smo spremljali na optičnih kanalih: *Borrelia* sp. – 530 in EAV – 660. Po končanem testu smo rezultate analizirali s pritiskom na ikono »Analysis« in izborom »Absolute quantification«. Vključili smo barvno kompenzacijo (Hexaplex CC) in izbrali ustrezen optični kanal (Preglednica 9).

Preglednica 9: Izbor optičnega kanala za pomnoževanje posameznih tarč.

Optični kanal	500	530	580	610	640	660
Tarča		<i>Borrelia</i> spp.				EAV

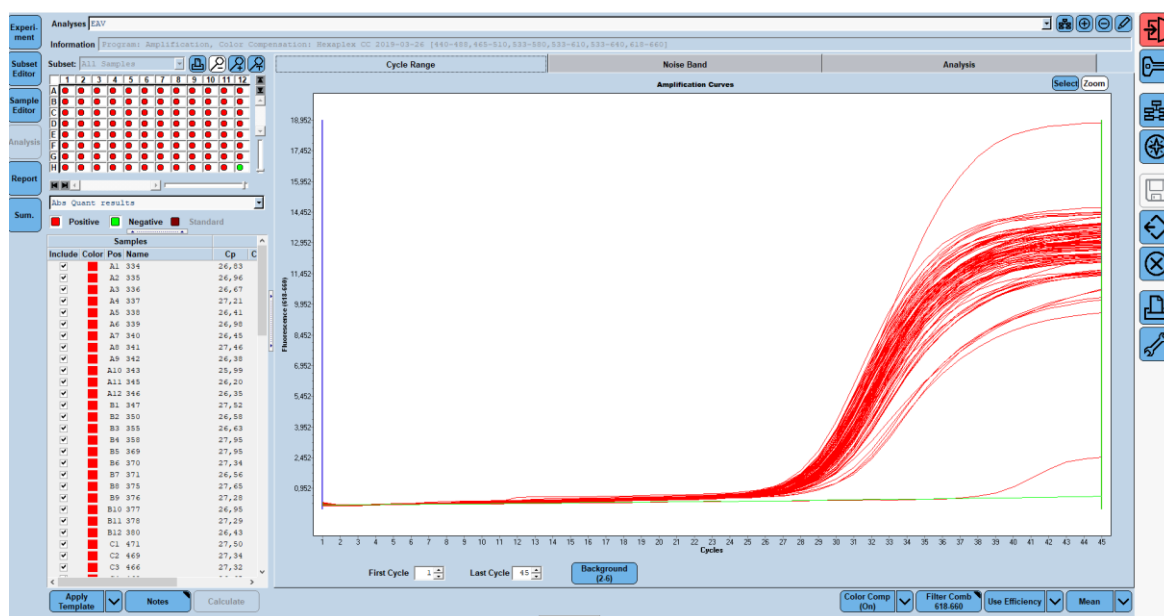
S pritiskom na ikono »Calculate« so se izpisale Ct vrednosti pri pozitivnih vzorcih (Slika 18). Rdeče amplifikacijske krivulje prikazujejo pomnoževanje borelijske nukleinske kisline v vzorcu, zelene ravne črte pa odsotnost le-tega. Prisotnost borelijske nukleinske kisline v vzorcih smo dokazali v kolikor je prišlo do pomnoževanja tarčnega dela gena za 23S rRNA pri Ct vrednostih, manjših od 41.



Slika 18: Primer analize pomnoževanja specifične borelijske tarče.

Z analizo pomnoževanja interne kontrole EAV smo spremljali morebitno inhibicijo reakcije (Slika 19). V kolikor je prišlo do inhibicije smo osamljeno nukleinsko kislino redčili v razmerju 1:10 in test ponovili. V kolikor je kljub redčenju prišlo do inhibicije smo vzorec označili kot inhibiran.

Rdeče amplifikacijske krivulje prikazujejo pomnoževanje EAV tarče v vzorcu in s tem odsotnost inhibicije. Zelena ravna črta prikazuje odsotnost pomnoževanja EAV tarče in s tem označuje inhibiran vzorec.



Slika 19: Primer analize pomnoževanja interne kontrole EAV.

Opravili smo dodatno raziskavo o prisotnosti *B. miyamotoi*, ki smo jo dokazovali z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidi, ki ciljajo na 16S rRNA gen. Prisotnost *B. miyamotoi* v vzorcih klopov smo dokazovali z metodo PCR v realnem času po protokolu, ki ga je opisal Platonov in sod. 2011.

2.3.5 Statistična analiza s χ^2 - preizkusom

V SPSS programu (IBM, 1989–2016, ver. 24) smo opravili χ^2 - preizkus, s katerim smo dokazovali razlike med regijama glede prevalence borelij lajsmske borelioze v klopih v letu 2018 in 2019. Frekvenco negativnih in pozitivnih vzorcev klopov smo primerjali med regijama v obeh letih posebej. Zanimalo nas je, ali je med pogostost okužb klopov z borelijo statistično značilno različna med regijama, če uporabimo podatke negativnih in pozitivnih frekvenc za obe leti skupaj.

3 REZULTATI

3.1 Vzorci klopov

Od 319 klopov iz leta 2018 smo 7 primerkov določili na podlagi morfoloških značilnosti do vrste *Haemaphysalis punctata*, ostalih 184 klopov je pripadalo vrsti *Ixodes ricinus* (Preglednica 10). V letu 2019 smo iz vzorcev določili 4 klope *H. punctata* in 547 navadnih gozdnih klopov (Preglednica 11). Vse klope vrste *H. punctata* smo vzorčili v obalno-kraški regiji.

Preglednica 10: Število klopov znotraj lokacij obalno-kraške in primorsko-notranjske regije v letu 2018.

Številka lokacije	Lokacija	Datum vzorčenja	Število	
			<i>I. ricinus</i>	<i>H. punctata</i>
1	Begunje	10.5.2018	51	0
2	Bloška Polica	različno	51	0
3	Kozarišče	22.5.2014	10	0
4	Racna gora	20.5.2018	10	0
5	Grahovo	28.5.2018	17	0
6	Vanganel	28.5.2018	21	0
7	Marezige	28.5.2018	7	0
8	Babiči	28.5.2018	4	0
9	Koper	različno	6	5
10	Šmarje	1.6.2018	3	0
11	Koštabona	1.6.2018	0	1
12	Volčje	19.6.2018	16	0
13	Ravnik	19.6.2018	20	0
14	Polšeče	19.6.2018	11	0
15	Sveti Vid	19.6.2018	5	0
16	Lož	23.6.2018	34	0
17	Sveta Ana	23.6.2018	18	0
18	Markovec	23.6.2018	33	0
19	Dane	23.6.2018	32	0
20	Rakov Škocjan	9.7.2018	2	0
21	Korte	različno	33	1

Preglednica 11: Število kloпов znotraj lokacij obalno-kraške in primorsko-notranjske regije v letu 2019.

Številka lokacije	Lokacija	Datum vzorčenja	Število	
			<i>I. ricinus</i>	<i>H. punctata</i>
1	Bloška Polica	16.5.2019	46	0
2	Kozarišče	16.5.2019	28	0
3	Markovec	16.5.2019	80	0
4	Dane	16.5.2019	24	0
5	Lož	16.5.2019	39	0
6	Sveta Ana	16.5.2019	58	0
7	Grahovo	17.5.2019	40	0
8	Begunje	17.5.2019	22	0
9	Rakov Škocjan	17.5.2019	19	0
10	Volčje	18.5.2019	14	0
11	Ravnik	18.5.2019	46	0
12	Sveti Vid	18.5.2019	36	0
13	Šmarje	22.5.2019	13	0
14	Dragonja	22.5.2019	4	0
15	Korte	22.5.2019	20	2
16	Koštabona	22.5.2019	8	2
17	Glem	22.5.2019	5	0
18	Vanganel	22.5.2019	7	0
19	Sveti Anton	23.5.2019	12	0
20	Gračišče	23.5.2019	10	0
21	Osp	23.5.2019	15	0
22	Koper	23.5.2019	9	0

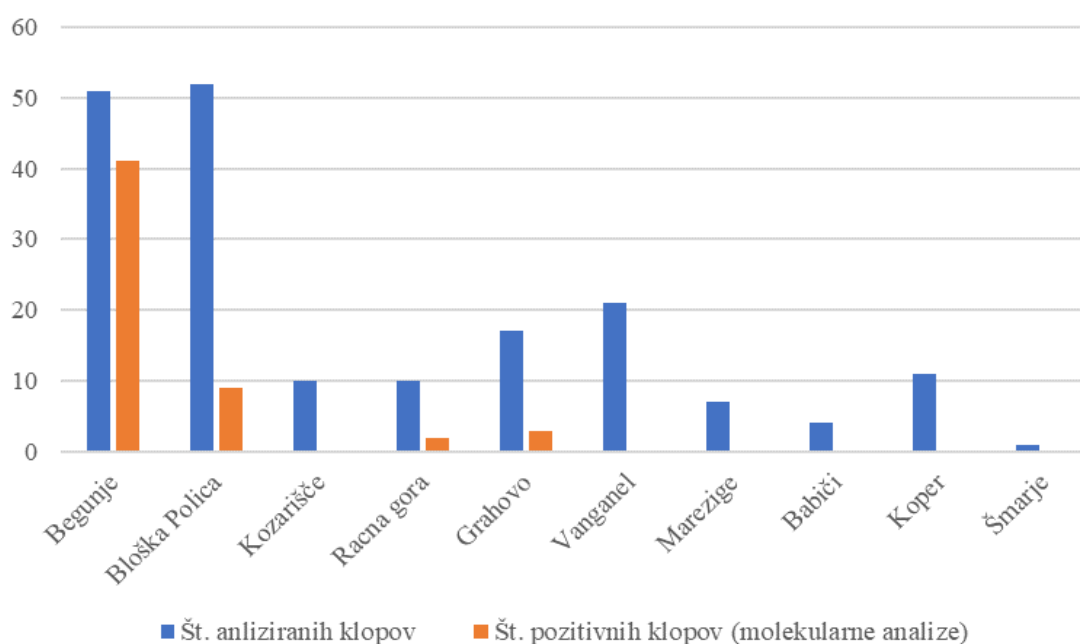
3.2 Dokaz borelij z molekularnimi analizami – vzorci 2018

Prisotnost *B. burgdorferi* sensu lato v 391 klopih iz leta 2018 smo dokazovali le z molekularnimi analizami. Zaradi težav pri osamitvi nukleinske kisline smo prisotnost borelij ugotavljali pri 184/391 (47 %) kloпов.

Iz primorsko-notranjske regije so bili analizirani vzorci petih različnih lokacij, celokupno 140 kloпов (Preglednica 12). V tej regiji je bilo okuženih 55 kloпов (39,3 % okuženost kloпов z *B. burgdorferi* sensu lato) na lokacijah: Begunje, Bloška Polica, Racna gora, Grahovo. Štiriinštirideset kloпов obalno-kraške regije je bilo podvrženim molekularnim analizam. Rezultati so pokazali, da niti en klop ni bil okužen. Histogram 1 prikazuje število analiziranih kloпов na podlagi molekularnih metod in število okuženih kloпов po lokacijah primorsko-notranjske in obalno-kraške regije.

Preglednica 12: Pregled vzorcev po lokacijah (vzorčenje 2018).

Regija	Št. Lokacije	Lokacija	Št. Klopov	Št. pozitivnih vzorcev (molekularne analize)
Primorsko-notranjska	1	Begunje	51	41
	2	Bloška Polica	52	9
	3	Kozarišče	10	0
	4	Racna gora	10	2
	5	Grahovo	17	3
Obalno-kraška	6	Vanganel	21	0
	7	Marezige	7	0
	8	Babiči	4	0
	9	Koper	11	0
	10	Šmarje	1	0
Regiji skupaj			184	55



Histogram 1: Analiza vzorcev po lokacijah primorsko-notranjske in obalno-kraške regije (vzorčenje 2018).

3.3 Dokaz borelij s kultivacijo in molekularnimi analizami – vzorci 2019

Prisotnost borelije (Preglednica 13) smo v 559 klopih dokazovali s kultivacijo v tekočih modificiranih Kelly-Pettenkoferjevih gojiščih. V primorsko-notranjski regiji je bilo od 452 kultivacij 23 pozitivnih, to je 5,1 % okuženost klopov z *B. burgdorferi* sensu lato. Od 107 vzorčenih živali obalno-kraške regije smo prisotnost borelije dokazali pri sedmih klopih,

kar predstavlja 6,5 % okuženost. Skupno število pozitivnih kultivacij predstavlja 5,4 % prevalenco v obeh regijah skupaj.

S kultivacijo borelij okuženih klopov iz obalno-kraške regije smo najvišji odstotek okuženih klopov dokazali na območju Kopra. Po odstotku okuženosti mu sledi kraj Osp, ki se nahaja v isti regiji. V primorsko-notranjski regiji je bila največja prevalenca borelije v okolici kraja Volčje, sledita mu vasi Dane in Grahovo. Od vseh 22 lokacij je bilo 9 lokacij, kjer s kultivacijo nismo dokazali prisotnosti borelije v nobenemu od vzorčenih klopov. Od tega sta le dve lokaciji iz celinske regije.

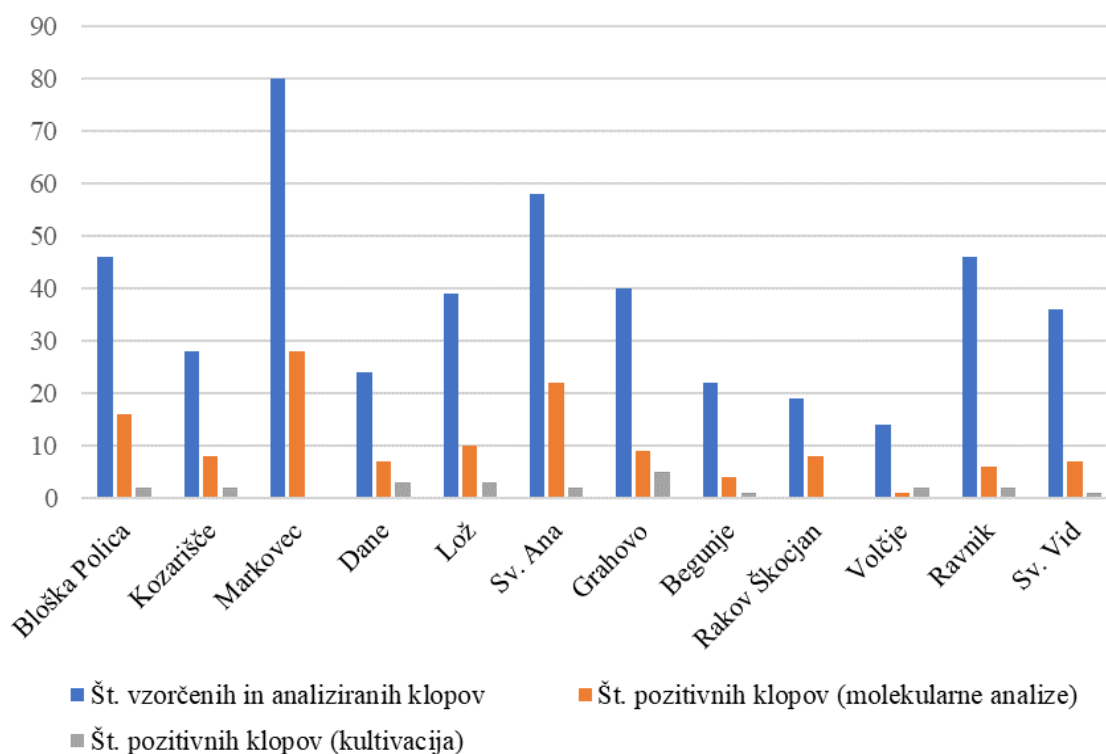
Z molekularno tehniko smo analizirali klope, ki so se tekom metode kultivacije in izolacije kontaminirali, in klope, v katerih se borelije niso namnožile ter je bil vzorec negativen. Pozitivnih vzorcev kultivacije nismo ponovno preverjali z molekularnimi tehnikami. V preglednici 13 je dodan stolpec nedefiniranih in inhibiranih vzorcev (ND/INH), ki so se med tehniko kultivacije in molekularnimi tehnikami izgubili ali pa je med samo tehniko prišlo do inhibicije. Nedefinirane vzorce smo med statističnim pregledom zanemarili. V primorsko-notranjski regiji je bila prisotnost borelije dokazana s pomočjo molekularnih metod v 127 klopih. Število pozitivnih klopov obalno-kraške regije se je z molekularnimi tehnikami povečalo za 28 vzorcev pri katerih smo uspeli dokazati prisotnost patogene bakterije.

Preglednica 13: Pregled vzorcev po lokacijah (vzorčenje 2019).

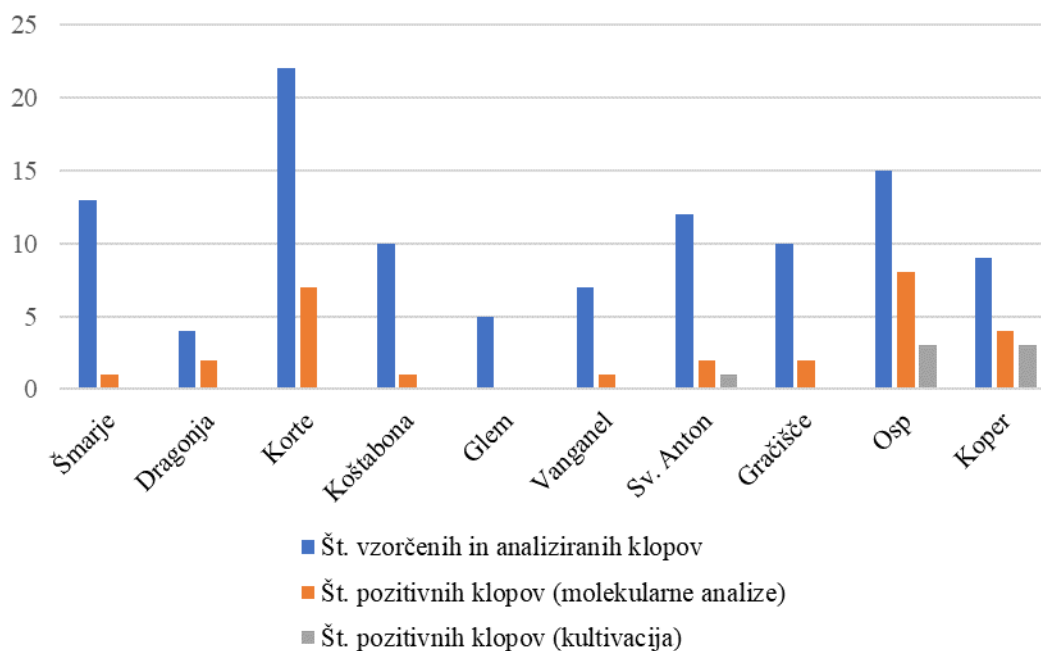
Regija	Št. Lokacije	Lokacija	Pozitivna kultivacija	Št. pozitivnih vzorcev (brez kultur)	ND/INH	Št. vseh klopov
Primorsko-notranjska	1	Bloška Polica	2	16	0	46
	2	Kozarišče	2	9	0	28
	3	Markovec	0	28	2	80
	4	Dane	3	7	0	24
	5	Lož	3	10	2	39
	6	Sveta Ana	2	22	2	58
	7	Grahovo	5	9	2	40
	8	Begunje	1	4	0	22
	9	Rakov Škocjan	0	8	1	19
	10	Volčje	2	1	1	14
	11	Ravnik	2	6	3	46
Obalno-kraška	12	Sveti Vid	1	7	0	36
	13	Šmarje	0	1	0	13
	14	Dragonja	0	2	1	4
	15	Korte	0	7	0	22
	16	Koštabona	0	1	0	10
	17	Glem	0	0	0	5

Regija	Št. lokacije	Lokacija	Pozitivna kultivacija	Št. pozitivnih vzorcev (brez kultur)	ND/INH	Št. vseh klopov
Obalno-Kraška	18	Vanganel	0	1	1	7
	19	Sveti Anton	1	2	1	12
	20	Gračišče	0	2	0	10
	21	Osp	3	8	0	15
	22	Koper	3	4	0	9
Regiji skupaj			30	155	16	559

Histogram 2 in Histogram 3 prikazujeta število vzorčenih klopov po lokacijah primorsko-notranjske in obalno-kraške regije in prisotnost borelije v številu klopov, ki je bila dokazana na podlagi dveh različnih metod.



Histogram 2: Analiza vzorcev po lokacijah primorsko-notranjske regije (vzorčenje 2019).



Histogram 3: Analiza vzorcev po lokacijah obalno-kraške regije (vzorčenje 2019).

V preglednici 14 smo primerjali delež okuženih klopov z *B. burgdorferi* sensu lato med regijama.

Preglednica 14: Pregled vzorcev po regijah (vzorčenje 2019).

Regija	Št. pozitivnih vzorcev	Št. negativnih vzorcev	ND/INH	Vsi vzorci	Okuženost
Primorsko-notranjska	150	291	11	452	34,0 %
Obalno-kraška	35	69	3	107	33,6 %

Preglednica 15 prikazuje, da je pogostost okužb klopov z *B. burgdorferi* sensu lato statistično značilno različna ($p < 0,001$) med regijama v letu 2018.

Preglednica 15: Statistična analiza s χ^2 - preizkusom: Absolutne (N) in relativne (%) frekvence rezultatov med regijama v letu 2018. Razmerje verjetnosti (LR) med regijama. df – stopinja prostosti. SR – standardni rezidual (razlika med merjeno in pričakovano vrednost).

Regija	Primorsko-notranjska			Obalno-kraška		
Frekvence skupaj	N = 140			N = 44		
χ^2	LR = 36,9		df = 1	p > 0,001		
Rezultati	N	%	SR	N	%	SR
Pozitivni vzorci	55	39,3	2,0	0	0	- 3,6
Negativni vzorci	85	60,7	- 1,3	44	100	2,4

Pogostost okužb klopov z borelijo, ki smo jih vzorčili v letu 2019, ni statistično značilna ($p > 0,05$) med regijama. Statistična analiza je prikazana v Preglednici 16. V obdelavo podatkov nismo vključili klopov, ki so tekom raziskav ostali nedefinirani – vključili smo le klope, ki so bili okuženi z borelijo in negativne vzorce.

Preglednica 16: Statistična analiza s χ^2 - preizkusom: Absolutne (N) in relativne (%) frekvence rezultatov med regijama v letu 2019. Razmerje verjetnosti (LR) med regijama. df – stopinja prostosti. SR – standardni rezidual (razlika med merjeno in pričakovano vrednost).

Regija	Primorsko-notranjska			Obalno-kraška		
Frekvence skupaj	N = 441			N = 104		
χ^2	LR = 36,9			df = 1	p > 0,05	
Rezultati	N	%	SR	N	%	SR
Pozitivni vzorci	150	34,0	0,0	35	33,7	- 0,1
Negativni vzorci	291	66,0	0,0	69	66,3	0,0

V Preglednici 17 je prikazana primerjava med regijama za obe leti skupaj. S statistično analizo smo ugotovili, da razlika v številu okužb med regijama obstaja ($p < 0,05$), vendar je statistično značilna različnost manjša kot v letu 2018 ($p < 0,001$).

Preglednica 17: Statistična analiza s χ^2 - preizkusom: Absolutne (N) in relativne (%) frekvence rezultatov med regijama v letu 2018 in 2019. Razmerje verjetnosti (LR) med regijama. df – stopinja prostosti. SR – standardni rezidual (razlika med merjeno in pričakovano vrednost).

Regija	Primorsko-notranjska			Obalno-kraška		
Frekvence skupaj	N = 581			N = 104		
χ^2	LR = 7,6			df = 1	p < 0,05	
Rezultati	N	%	SR	N	%	SR
Pozitivni vzorci	205	35,3	1,0	35	23,6	1,4
Negativni vzorci	376	64,7	- 0,7	113	76,4	- 2,0

3.3.1 Genotipizacija izoliranih borelij (*MluI*-LRFP)

S pomočjo kultivacije smo osamili borelije iz 30 vzorcev. Pet vzorcev, ki so označeni z ND, se je kontaminiralo, pri ostalih smo uspeli namnožiti borelije pozitivnih kultur. S pomočjo metode *MluI*-LRFP smo določili katerim vrstam borelij in podtipom vrst (podtip zapisan za vrsto borelije) pripadajo izolati (Preglednica 15).

Največ izolatov je pripadalo podtipu Mlg2 vrste *Borrelia garinii*. Izolati so pripadali še vrstam *B. afzelii*, *B. valaisiana* in *B. burgdorferi* sensu stricto.

Preglednica 18: Genotipizacija borelij z *MluI*.

Št. Lokacije	Lokacija	Datum izolacije	<i>MluI</i> identifikacija / ND (nedefiniran)
1	Bloška Polica	13.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
1	Bloška Polica	24.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
2	Kozarišče	4.7.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
2	Kozarišče	12.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
4	Dane	12.6.2019	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> Mlb2
4	Dane	17.6.2019	<i>B. afzelii</i> Mla1
4	Dane	17.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
5	Lož	21.6.2019	ND
5	Lož	17.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
5	Lož	27.6.2019	<i>B. valaisiana</i> Mlv2
6	Sv. Ana	17.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg6
6	Sv. Ana	16.7.2019	<i>B. afzelii</i> Mla1
7	Grahovo	14.6.2019	ND
7	Grahovo	13.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
7	Grahovo	12.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg6
7	Grahovo	15.7.2019	<i>B. afzelii</i> Mla1
7	Grahovo	24.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
8	Begunje	24.6.2019	ND
10	Volčje	21.6.2019	<i>B. afzelii</i> Mla1
10	Volčje	24.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
11	Ravnik	15.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
11	Ravnik	5.7.2019	<i>B. afzelii</i> Mla1
12	Sv. Vid	19.6.2019	<i>B. valaisiana</i> Mlv1
19	Sv. Anton	4.7.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
21	Osp	21.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg8
21	Osp	24.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg4
21	Osp	24.6.2019	ND
22	Koper	24.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg2
22	Koper	24.6.2019	<i>B. garinii</i> Mlg9
22	Koper	24.6.2019	ND

Preglednica 16 prikazuje okuženost klopov po regijah z bakterijo *Borrelia miyamotoi*. Stolpec, ki je označen z ND, prikazuje število nedefiniranih vzorcev, katerih število smo zanemarili pri izračunu okuženosti. V molekularne raziskave prekuženosti klopov z *B. miyamotoi* nismo vključili klopov, ki so se po kultivaciji borelije izkazali za pozitivne.

Preglednica 19: Pregled vzorcev po regijah, okuženih z *B. miyamotoi*.

Regija	Št. analiziranih vzorcev	ND	Št. pozitivnih vzorcev	Št. negativnih vzorcev	Okuženost
Primorsko-notranjska	429	113	6	287	1,9 %
Obalno-kraška	100	18	2	73	2,4 %

4 DISKUSIJA

V raziskavah razširjenost borelij v dveh izbranih regijah smo za testne živali izbrali klope *I. ricinus*, ker so v Evropi glavni prenašalci *B. burgorferi* sensu lato in tudi najpogostejša vrsta klopa v Sloveniji (Estrada-Peña in sod. 2017).

Izbor lokacij za vzorčenje klopov je bil naključen. Na vsaki lokaciji smo vzorčili na območju habitata, kjer se klopi najpogosteje nahajajo – gozd, rob gozda in vlažen travnik. Na vzorčevalnih območjih so bili najpogostejši listopadni gozd (najpogostejša drevesna vrsta bukev) ali mešani gozd smreke in bukve. Leska je bila pogosta na območju roba gozda. Med njimi ni bilo večjih razlik v številu ulova klopov.

Na lokacijah, kjer smo vzorčili več klopov, so bila večinoma vlažna območja (zaradi senčne strani izbrane lokacije). Kadar je bila zaradi vremenskih razmer v zraku visoka vlažnost, smo na terenu zbrali večje število klopov kot na terenu na bolj suhih območjih. Na število vzorčenih živali so vplivale vremenske razmere ter posledično stanje mikroklima. V obalno-kraški regiji je vrhunec aktivnosti klopov v zgodnjih spomladanskih mesecih (Knap in sod. 2009), zato bi bilo vzorčenje bolj priporočljivo v marcu in aprilu. V obalno-kraški regiji smo vzorčili večje število klopov v Vanganelu, ker smo si izbrali lokacijo ob Vanganelskem jezeru. Tu je bila zaradi bližine vode večja vlažnost okolja, zato so bili klopi tudi v sušnejših mesecih še vedno aktivni.

Tack in sod. (2011) so raziskovali učinke vzorčenja klopov z metodo zastave na območju različnih habitatnih tipov v naravnem rezervatu v Belgiji. Tam je zabeležena povprečna letna količina padavin 820 mm (Royal Meteorological Institute of Belgium), kar je v primerjavi z našima izbranimi regijama precej bolj sušno, saj je povprečna letna količina padavin v obalno-kraški regiji 1150 mm in v primorsko-notranjski regiji 2000 mm (ARSO 2006). V Belgiji so vsako lokacijo med aprilom in septembrom v letu 2008 vzorčili petkrat. Klope so uspešno vzorčili skozi vso sezono, saj v poletnem času ni visokih temperatur ozračja, ki bi izsuševale zrak. Vzorčili so s flanelastima odejama v velikosti 1 m². Prva je bila enaka naši pasti za vzorčenje klopov, druga past pa je bila na trakove razrezana odeja. Ličinke klopov se zadržujejo v nižjih slojih vegetacije (Gray 1985), zato je past s trakovi primernejša za vzorčenje ličink, saj tako globlje prodira v vegetacijo (Tack in sod. 2011). V naših raziskavah nismo prilagodili metode vzorčenja za vse aktivne stopnje klopov, saj smo uporabljali le flanelasto odejo, ki ni bila razrezana na trakove. V raziskavi Tack in sod. (2011) so bile ličinke najštevilčnejše med vzorci klopov (vsi so bili identificirani *I. ricinus*), razlog za to pa je najverjetneje primernejša past za ličinke in vzorčenje tudi v jesenskem času, ko so ličinke *I. ricinus* najbolj aktivne (Petney in sod. 2012).

V naših raziskavah smo vse klope iz leta 2019 kultivirali v modificiranem Kelly–Pettenkofer tekočem gojišču. Veliko gojišč se je med eksperimentom kontaminiralo, kljub temu, da smo bili pri sami izvedbi s sterilnostjo pazljivi. Kultivacija borelij je zahtevna metoda, zato je tudi pomembno, da klope primerno shranimo in transportiramo do trenutka, ko jih damo v gojišča. Pri gostiteljih borelij je okužba sistemska, zato se za dokaz borelije lahko uporabi različne organe gostitelja. V klopah se borelije nahajajo v prebavilih, zato smo le-te prebodi s sterilno iglo, da se borelije sprostijo neposredno iz prebavil klopa v gojišče. Zaradi počasne rasti borelij in dolgega medgeneracijskega časa je bila kultivacija v primerjavi z nekaterimi ostalimi bakterijami dolgotrajna. V zdravstvu se kultivacijo borelij uporablja le za potrditev okužbe, ko pride za neodločen primer (npr. neznačilni znaki bolezni pri pacientu), ni pa primerna izbira metode za klinično diagnostiko (Stanek in sod. 2010).

Neposredne tehnike za dokaz borelije v vzorcu so molekularne metode. Metoda PCR v realnem času velja za občutljivejšo in natančnejšo tehniko kot metoda vgnezditevne PCR, ki je prav tako pogosta metoda za dokazovanje borelij (Cerar in sod. 2015). LightMix komplet reagentov za uporabo pri PCR v realnem času ponuja hitro in enostavno izvedbo eksperimenta s sposobnostjo določitve borelij do vrste in manjšo možnostjo kontaminacije vzorca. Reagenti LightMix niso izrecno namenjeni določanju količine kopij *Borrelia* genoma, je pa zaradi priloženih standardov v kompletu možna groba ocena količine bakterij v tkivu organizma (Cerar in sod 2015).

Z osamitvijo borelij smo dokazali prisotnost *B. burgdorferi* sensu lato pri razvidno manjšem številu vzorcev kot smo jo uspeli dokazati z uporabo molekularnih tehnik, saj kultivacija velja za zelo občutljivo metodo. V letu 2018 je bilo veliko število okuženih klopov iz Begunj (80,4 %). V klopah, ki so bili vzorčeni na isti lokaciji v letu 2019, je bila veliko nižja stopnja prevalence (22,7 %). Razlog za takšno razliko v okuženosti je lahko naključje, velikost vzorca (51:22) ali vstop/prihod z borelijo okuženih gostiteljev (srnjad, jelenjad ter glodalci) na lokacijo. Po statistični analizi (hi-kvadrat preizkus) smo hipotezo, s katero smo pričakovali večje število okuženih klopov z borelijo v primorsko-notranjski regiji kot v obalno-kraški regiji, ovrgli za leto 2019. Če bi bila izračunana stopnja značilnosti enaka ali manjša stopnji značilnosti v višini 0,05, bi statistične razlike med regijama obstajale. Statistično značilno različnost smo ugotovili za leto 2018 in pri izračunu za obe leti skupaj. Razlogi za razlike med letoma so lahko naključje, velikost vzorca (v letu 2018 je bilo testiranih veliko manj vzorcev kot v letu 2019) ali spremembe v populaciji klopov in gostiteljev klopov.

Raziskavo in rezultate smo primerjali z rezultati nekaterih podobnih študij, kjer so v večini primerov za dokaz borelije v tkivu gostitelja ali prenašalca izvajali obe metodi (PCR in

kultivacijo borelij). Naše rezultate lahko primerjamo z rezultati drugih študij, ki so bile izvedene na tkivih glavnih gostiteljev *B. burgorferi* sensu lato (mali sesalci), človeških vzorcih (diagnostika) ter klopih.

Spremembe in prilagoditve, ki jih mora *B. burgorferi* sensu lato doživeti s prehodom iz živega biološkega materiala v umetni medij verjetno omejujejo stopnjo osamitve (Norris in sod. 1997). Poleg občutljivosti metode kultivacije na uspešnost osamitve borelij v gojiščih vpliva tudi količina tkiva ali vzorca, ki je okužen s patogeno bakterijo. V raziskavah Cerar in sod. (2008) so za dokaz lajmske nevroborelioze pri bolnikih uporabili metodi kultivacije borelij in vgnezditveno PCR. Za kultivacijo so od vsakega pacienta uporabili 5 ml krvi okuženo z borelijami in 1 ml cerebrospinalne tekočine. Iz krvnih vzorcev je bila kultivacija pozitivna pri 0,7 %, osamitev borelij iz cerebrospinalne tekočine pa pri 3,2 % vzorcev. V primerjavi z metodo vgnezditvene PCR (velja za manj natančno od metode PCR v realnem času za dokaz borelij) je bilo pri slednji metodi več vzorcev pozitivnih kot pri kultivaciji. V krvnih vzorcih je bilo 11,9 % pozitivnih, pri vzorcih s cerebrospinalno tekočino pa 15,4 %. Ugotovili so, da je za uspešnost osamitve borelij v gojiščih potrebna zadostna količina tkiva, kjer naj bi bile prisotne borelije ter da so borelije prisotne v različnih koncentracijah v različnih organih (Cerar in sod. 2008). Ker so borelije počasi rastoče bakterije in se počasi razmnožujejo, je velika verjetnost, da so nekateri klopi iz naših raziskav bili okuženi z borelijo, vendar je bilo le-teh premalo, da bi se uspešno sprostile iz klopa in razmnoževale v gojišču. Kljub temu, da je v rezultatih raziskav Cerar in sod. (2008) manjši delež okuženih vzorcev kot pri naši študiji, je korelacija med deležem pozitivnih kultur in PCR testov pri njih podobna naši.

Študija Cerar in sod. (2015) temelji na raziskavah prisotnosti borelije v glodalcih v Sloveniji. Dokaz spirohet v gostiteljih so izvajali s kultivacijo in z molekularnimi tehnikami na tkivih gostiteljev. Kultivirali so vzorce pljuč in src istih živali (mali sesalci). Iz pljučnih tkiv so uspeli osamiti manj borelij (4,3 %) kot iz vzorcev src (21,7 %). Iz obeh tkiv je bilo po kultivaciji manj pozitivnih vzorcev, kot vzorcev, ki so jih analizirali z molekularnimi tehnikami. Za dokaz borelije z molekularnimi analizami so uporabili dve tehniki, vgnezditveno PCR in PCR v realnem času. Skupno so dokazali OspA gen pri 39,1 % živali. Prevalenca povzročiteljice lajmske borelioze pri naših raziskavah je nekoliko nižja (v obeh letih), vendar vseeno primerljiva s študijo Cerar in sod. (2015). Glede na to, da so mali sesalci glavni rezervoar borelij v Evropi, lahko iz tega sklepamo, da je to razlog za večji delež okuženih živali njihovih raziskav kot pri naših raziskavah.

Podobne rezultate raziskav, ki temeljijo na razširjenosti okužbe z borelijo pri malih sesalcih so poročali Zore in sod. (1999), ki so dokazali prisotnost borelijske DNA kar pri 17 od 34 glodavcev (50 % razširjenost) v Sloveniji. Možnost za razlago večje prekuženosti

od naših raziskav je v uporabi različnih metod. Za molekularne analize so uporabili klasičen PCR za analizo gena za flagelin in gena za 16S rRNA, ki sta oba specifična za predstavnike borelij. Analizirali so tkivo mehurja malih sesalcev, kar lahko prav tako prispeva k večji številčnosti okužb z borelijo kot pri raziskavah Cerar in sod. (2015). Manjša prevalenca borelij kot v naših raziskavah je v študiji Schmidt in sod. (2014), v kateri je bila odkrita borelijska DNA pri 14,8 % malih sesalcev na severnem delu Avstrije.

Wolff in Gerritzen (2011) sta raziskovala okuženost klopov z *B. burgdorferi* sensu lato v Nemčiji. Vzorci klopov rodu *Ixodes*, ki so jih testirali za borelijo, so bili prineseni s strani ljudi, na katerih so se klopi hranili. Opravila sta molekularne analize z metodo izolacije nukleinskih kislin in verižne reakcije s polimerazo v realnem času na več kot 1000 vzorcih. Med njimi jih je bil 20,2 % okuženih s povzročiteljico lajmske borelioze. Študije so pripomogle k oceni tveganja prenosa borelije med prenašalcem in gostiteljem ter odločitvi preventivnega zdravljenja pacientov z antibiotiki. Prevalenca okuženih klopov v njihovih študijah je dosegla precej manjši odstotek kot v naših raziskavah v južni in jugozahodni Sloveniji.

Razlogov za razlike v razširjenosti med različnimi študijami je lahko več: različne metode odvzema vzorcev, velikost vzorcev, metode odkrivanja borelij, različne geografske lokacije in različna časovna obdobja (Mannelli in sod 2012). Zanesljiv in standardiziran pristop za take študije ni opredeljen (Cerar in sod. 2015).

Prisotnost *B. miyamotoi* smo dokazovali pri vzorcih, ki so bili nabrani v letu 2019. Povzročiteljico povratne mrzlice smo dokazali v dveh klopih iz obalno-kraške regije ter v šestih *I. ricinus* v primorsko-notranjski regiji. V analizo nismo vključili klopov, ki so se izkazali za pozitivno kultivacijo *B. burgdorferi* sensu lato, ker z njimi nismo nadaljevali z molekularnimi analizami ter tistih, ki so se skozi raziskave izgubili in ostali nedefinirani. Nedoločenih vzorcev je bilo iz obeh regij skupaj kar 131. Od 398 klopov jih je bilo osem okuženih z *B. miyamotoi*, kar skupaj predstavlja 2 % okuženost, zato lahko z gotovostjo potrdimo da se *B. miyamotoi* pojavlja tudi na slovenskih tleh. Zaključimo lahko, da je v Sloveniji veliko več klopov okuženih s povzročiteljico lajmske borelioze kot z *B. miyamotoi*. Cerar in sod. (2015) so dokazali bakterijo *B. miyamotoi* v 0,4 % vzorcev pljuč in 2,2 % vzorcev src malih sesalcev v Sloveniji, kar je primerljivo z rezultatom naših raziskav.

S kultivacijo smo uspešno namnožili 30 kultur. Iz pozitivnih kultur smo s pomočjo metode *MluI*-LRFP dokazovali vrste *B. burgdorferi* sensu lato ter njihove podtippe. Dokazali smo (preglednica 15), da je *B. garinii* najbolj razširjena borelija na področju južne in jugozahodne Slovenije, saj kar 17 od 30 kultur pripada tej vrsti, od tega jih 12 pripada

podtipu Mlg2. *B. afzeli* je bila v preteklih raziskavah izolirana iz ljudi, klopov in malih sesalcev, ki so glavni rezervoar borelij in velja za prevladujočo vrsto borelije v patogenosti (Cerar in sod. 2015; Lagal in sod. 2003; Logar in sod. 2004; Ružič-Sabljić in sod. 2002; Stanek in Strle 2003). *MluI*-LRFP izolatov *B. afzelii* kaže izrazito homogen restriksijski vzorec in večina (> 99 %) jih pripada podtipu Mla1, medtem ko izolati ostalih vzorcev kažejo heterogen restriksijski vzorec. Rezultati genotipizacije borelijskih izolatov v naših raziskavah se razlikujejo od ostalih raziskav, saj je med našimi rezultati po številu določenih vrst borelij prevladovala *B. garinii*, medtem ko je pri drugih študijah prevladovala *B. afzelii*. Na razliko v prevladovanju vrst povzročiteljic lajmske borelioze lahko vpliva velikost vzorca, kdaj je potekalo vzorčenje, klimatske spremembe in naravna dinamika populacije rodu *Borrelia* na področju Slovenije.

Rezultate terenskega dela bi lahko izboljšali z meritvami vlažnosti in temperature okolja na vsaki lokaciji. S temi podatki bi lažje povezovali številčnost ulova klopov. Študijo bi lahko obogatili s primerjavo v številčnosti različnih razvojnih stopenj klopov med različnimi vegetacijskimi tipi. V raziskave bi lahko vključili tudi razliko med spoloma odraslih klopov v številu okužb z *B. burgdorferi* sensu lato ter med posameznimi razvojnimi stopnjami klopov.

V prihodnje je predvidenih vedno več raziskav klopov v povezavi s patogenimi organizmi, ki jih prenašajo. Razumevanje odnosa klopa z naravnim okoljem in mikroklimo v kateri prebiva, bi pripomoglo k izdelavi zemljevidov z območji porazdelitve pomembnih vrst klopov skupaj s predvideno izpostavljenostjo ljudi. Pri terenskem vzorčenju bi bilo pomembno izpostaviti temperaturo okolja, fotoperiodo in vlažnost okolja. Na razširjenost patogenih mikroorganizmov, ki jih prenašajo klopi, malo manj vplivajo vremenske razmere, so pa povzročitelji bolezni bolj odvisni od številčnosti in raznolikosti gostiteljev v življenjskem prostoru klopa.

Ocenjevanje prisotnosti in aktivnosti patogenih organizmov, katerih prenašalci so klopi, je vključeno v večino raziskav, ki so povezani s človeškimi primeri obolenj. Raziskav na primeru ljudi je zaradi medicinskih in ekonomskih interesov veliko, a je kljub temu nemogoče natančno določiti prisotnost in aktivnost patogenih mikroorganizmov. Vzrok za pomanjkanje podatkov je pomanjkanje raziskav na primeru divjih živali, ki so lahko potencialni gostitelji parazitov. Na podlagi raziskav z domačimi in divjimi živalmi ter medicinskimi raziskavami s človeškimi primeri, bi ugotovili katere vrste klopov sodelujejo pri prenosu in določili areale, kjer je prisoten patogen organizem ter kako se širi in premika. Pridobitev tovrstnih informacij zahteva dolgoročne študije in veliko število ljudi, ki bi opravljalo terenska vzorčenja. S takšnimi raziskavami bi lahko določili resnično

tveganje za ljudi z izpostavljenostjo okuženim klopom, ki temeljijo na aktivnih in kombiniranih raziskavah prenašalcev, patogenov in gostiteljev.

5 ZAKLJUČEK

Ščitasti klopi so najpomembnejši prenašalci borelij, najpogostejša vrsta prenašalca v Sloveniji je *I. ricinus*. *Borrelia burgdorferi* sensu lato je kompleks borelij, ki povzročajo lajmsko borelioza. Lajmska borelioza je zoonoza, široko razširjena po severni polobli. Najpomembnejši gostitelji borelij so mali sesalci. Z njo se lahko okuži tudi človek, ki pa je le naključni gostitelj.

Z raziskavami smo dokazali, da je v povprečju z borelijo okuženih več klopov notranjsko-primorske regije kot v obalno-kraški regiji. Trditev smo dokazovali z obema metodama, po pričakovanju pa se je molekularni pristop pokazal za precej bolj učinkovitega. Z metodo kultivacije in osamitve smo dokazali veliko manj okužb kot z molekularnimi tehnikami, ki so zanesljivejše in hitrejše, vendar cenovno težje dostopne. Po pregledu literature smo pričakovali, da bo največ klopov okuženih z *B. afzelii*, vendar smo z genotipizacijo dokazali, da je bila v naših vzorcih *B. garinii* najpogostejša povzročiteljica lajmske borelioze.

Zatiranje klopov in okužb, ki se lahko pojavijo po vbodu klopa, predstavlja prednostno nalogo za izboljšanje zdravja ljudi in živali. Raziskave molekularnih procesov v svetu klopov (hranjenje, razmnoževanje in imunost na patogene) prispevajo k našemu razumevanju biološkega odnosa klopov in patogenov. Te informacije so izjemnega pomena za boljše razumevanje in razvoj orodij nadzora nad obema vrstama parazitov. Te potrebujemo, ker imajo direkten vpliv življenja tako prizadetih ljudi kot živali. Včasih celo na preživetje samo.

6 LITERATURA IN VIRI

Agencija Republike Slovenije za okolje (ARSO). Podnebne razmere v Sloveniji. 2006. Ljubljana.

Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*: 484-509.

Barbour A.G., Hayes S.F. 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews* 50: 381–400.

Barbour A.G., Bunikis J., Travinsky B., Gatewood Hoen A., Diuk-Wasser M.A., Fish D., Tsao J.I. 2009. Niche Partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the Same Tick Vector and Mammalian Reservoir Species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 1120–1131.

Bedford G.A.H. 1931. *Nuttalliella namaqua*, a new genus and species of tick. *Parasitology* 23: 230–232.

Belozerov V.N. 1982. Diapause and biological rhythms in ticks. *Physiology of Ticks*. Oxford, Pergamon Press: 469-500.

Black IV 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: 10034-10038.

Bowman A., Nuttall P. 2008. *Ticks: biology, disease and control*. Cambridge University Press, Cambridge.

Briciu V.T., Meyer F., Sebah D., Tatulescu D.F., Coroiu G., Lupse M., Carstina D., Mihalca A.D., Hizo-Teufel C., Klier C., Huber I., Fingerle V. 2014. Real-time PCR-based identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in ticks collected from humans in Romania. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5: 575-581.

Bristol University Tick ID. University of Bristol. <http://www.bristoluniversitytickid.uk> (datum dostopa: 16.12.2019)

Burgdorfer W. 1995. Lyme disease (borreliosis): a global perspective. *Alpe Adria Microbiology Journal* 4: 227-233.

Burgdorfer W. 1996. Lyme borreliosis: of ticks and spirochetes. Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica, Et Adreiatica 5: 87-92.

Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwaldt E., Davis J.P. 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis?. Science 216: 1317-1319.

Bykowski T., Woodman M.E., Cooley A.E., Brissette C.A., Wallich R., Brad V., Kraiczy P., Stevenson B. 2008. *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal-tick infection cycle. International Journal of Medical Microbiology 298 (suppl 1): 249–56.

Cerar T., Ogrinc K., Cimperman J., Lotrič-Furlan S., Strle F., Ružič-Sabljić E. 2008. Validation of Cultivation and PCR Methods for Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. Journal of Clinical Microbiology 46(10): 3375–3379.

Cerar T., Korva M., Avšič-Županc T., Ružič-Sabljić E. 2015. Detection, identification and genotyping of *Borrellia* spp. in rodents in Slovenia by PCR and culture. BMC Veterinary Research 11: 188.

Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), Pratt H.D. 2012. Pictorial keys to arthropods, reptiles, birds, and mammals of public health significance (Vol-1), University of California Libraries

Cutler S.J., Ruzic-Sabljić E., Potkonjak A. 2017. Emerging borreliae – Expanding beyond Lyme borreliosis. Molecular and Cellular Probes 31: 22-27.

Daniel M., Kolar J., Zeman P., Pavelka K., Sadlo J. 1998. Predictive map of *Ixodes ricinus* high-incidence habitats and a tick-borne encephalitis risk assessment using satellite data. Experimental Applied Acarology 22: 417-433.

Dantas-Torres F., Otranto D. 2013. Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* on ground level and higher vegetation in a preserved wooded area in southern Europe. Veterinary Parasitology 192: 253-258.

Davidson D.E., Mac Dugall J., Girons I.S. 1992. Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi*, a causative agent of lyme disease, and localization of rRNA Genes. Journal of Bacteriology 174: 3766-3774.

Davidson M.M., Evans R., Ho-Yen D.O. 2003. Lyme disease: gold for Scotland and bronze for USA. Scottish Medical Journal 1: 6-9.

de la Fuente J., Estrada-Peña A., Venzal V.M., Kocan K.M., Sonenshine D.E. 2008. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience* 13: 6938-6946.

Diuk-Wasser M.A., Gatewood Hoen A., Cislo P., Brinkerhoff R., Hamer S.A., Rowland M., Cortinas R., Vourc'h G., Melton F., Hickling G.J., Tsao J.I., Bunikis J., Barbour A.G., Kitron U., Piesman J., Fish D. 2012. Human Risk of Infection with *Borrelia burgdorferi*, the Lyme Disease Agent, in Eastern United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86(2): 320–327.

Dumpis U., Crook D., Oksi J. 1999. Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 28: 882-890.

El Shoura S.M. 1990. *Nuttalliella namaqua* (Acarina: Ixodoidea: Nuttalliellidae) redescription of the female morphology in relation to the families Argasidae and Ixodidae. *Acarologia* 31: 349–355.

Estrada-Peña A. 2015. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 34: 53-65.

Estrada-Peña A., de la Fuente J. 2014. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research* 108: 104–128.

Estrada-Peña A., Salman M. 2013. Current limitations in the control and spread of ticks that affect livestock: a review. *Agriculture* 3: 221–235.

Estrada-Peña A., Mihalca A.D., Petney T.N. 2017. Ticks of Europe and North Africa. A Guide to Species Identification. Switzerland, Cham: Springer.

European Centre for Disease Prevention and Control. An agency of the European Union. <https://www.ecdc.europa.eu/en> (datum dostopa: 20.10.2019)

Ferdin J., Cerar T., Strle F., Ružić-Sabljić E. 2010. Evaluation of real-time PCR targeting hbb gene for *Borrelia* species identification. *Journal of Microbiological Methods* 82: 115-119.

Filippova N.A. 1999. Systematic relationship of the *Ixodes ricinus* species complex in the Palearctic Faunal Region. In: Meedham G.R., Mitchell R., Horn D.J., Welbourn W.C. (eds.) *Acarology IX*, volume 2. Ohio, Ohio Biological Survey, str. 355-361.

- Foelix R.F. 1985. Mechano- and Chemoreceptive Sensilla. *Neurobiology of Arachnids*: 118-137.
- Francischetti I.M.B., Sa-Nunes A., Mans B.J., Santos I.M., Ribeiro J.M.C. 2009. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience* 14: 2051-2088.
- Franke J., Hildebrandt A., Dorn W. 2013. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes – Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick-borne Diseases* 4: 11-25.
- Fritz C.L., Kjemtrup A.M. 2003. Lyme borreliosis. *JAVMA* 9: 1261-1270.
- Gassner F., Van Vliet A.J., Burgers S.L., Jacobs F., Verbaarschot P., Hovius E.K., Mulder S., Verhulst N.O., Van Overbeek L.S., Takken W. 2011. Geographic and temporal variations in population dynamics of *Ixodes ricinus* and associated *Borrelia* infections in The Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 11: 523-532.
- Gatewood Hoen A., Margos G., Bent S.J., Diuk-Wasser M.A., Barbour A., Kurtenbach K., Fish D. 2009. Phylogeography of *Borrelia burgdorferi* in the eastern United States reflects multiple independent Lyme disease emergence events. *PNAS* 106 (35): 15013-15018.
- Gern L., Estrada-Peña A., Frandsen E., Gray J.S., Jaenson T.G.T., Jongejan F., Kahl O., Korenberg E., Mehl R., Nuttall P.A. 1998. European Reservoir Hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt für Bakteriologie* 287: 196-204.
- Gofton A.W., Margos G., Fingerle V., Hepner S., Loh S.-M., Ryan U., Irwin P., Oskam C.J. 2018. Genome-wide analysis of *Borrelia turcica* and ‘*Candidatus* *Borrelia tachyglossi*’ shows relapsing fever-like genomes with unique genomic links to Lyme disease *Borrelia*. *Infection, Genetics and Evolution* 66: 72-81.
- Gray J.S. 1985. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. *Experimental and Applied Acarology* 1: 35–44.
- Gray J.S., Kahl O., Janetzki C., Stein J., Guy E. 1995. The spatial distribution of *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes ricinus* in the Connemara region of Co. Galway, Ireland. *Experimental Appl Acarol* 19: 163–72.
- Gray J.S., Kahl O., Lane R.S., Levin M.L., Tsao J.I. 2016. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7: 992-1003.

Guerra M.A., Walker E.D., Kitron U. 2000. Quantitative approach for the serodiagnosis of canine Lyme disease by the immunoblot procedure. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2628–2632.

Gugliotta J.L., Goethert H.K., Berardi V.P., Telford III S.R. 2013. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *New England Journal of Medicine* 368(3): 240-245.

Halos L., Jamal T., Maillard R., Beugnet F., Le Menach A., Boulouis H.J., Vayssier-Taussat M. 2005. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Veterinary Research* 36: 79-87.

Halouzka J., Wilske B., Stünzner D., Sanogo Y.O., Hubálek Z. 1999. Isolation of *Borrelia afzelii* from Overwintering *Culex pipiens* Biotype molestus Mosquitoes. *Infection* 4-5: 275-277.

Hartemink N.A., Randolph S.E., Davis S.A., Heesterbeek J.A.P. 2008. The basic reproduction number for complex disease systems: defining R0 for tick-borne infections. *The American Naturalist* 171: 743–754.

Hayes S.F., Burgdorfer W. 1993. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi*, str. 29–43. K. Weber, Burgdorfer W. (ed.), *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Hefty P.S., Brooks C.S., Jett A.M., White G.L., Wikel S.K., Kennedy R.C., Akins D.R. 2002. *OspE*-related, *OspF*-related, and Elp lipoproteins are immunogenic in baboons experimentally infected with *Borrelia burgdorferi* and in human lyme disease patients. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 4256-4265.

Hubalek Z., Halouzka J. 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *European Journal of Epidemiology* 13: 951–957.

Jensen P.M., Kaufmann U., Smirnova L., 1999. Diurnal activity of *Ixodes ricinus* in Denmark: aspects of physiological age and genotypic variation. *Hereditas* 130: 325–330.

Johnson R.C., Schmid G.P. Hyde F.W., Steingerwalt A.G., Brenner D.J. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. International Journal of Systematic Bacteriology 34: 496-479.

Jongejan F., Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. Parasitology 129: S3–S14.

Karami A. 2012. Lyme Disease. Rijeka, InTech.

Kiszewski A.E., Matuschka F.-R., Spielman A. 2001. Mating Strategies and Spermiogenesis in Ixodid Ticks. Annual Review of Entomology 46: 167-182.

Knap N., Durmiši E., Sakida A., Korva M., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. Veterinary Parasitology 164: 275–281.

Kosik-Bogacka D., Bukowska K., Kuzna-Grygiel W. 2002. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Mosquitoes (*Culicidae*) in Recreational Areas of the City of Szczecin. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 9: 55-57.

Kurtenbach K., Schäfer S.M., de Michelis S., Etti S., Sewell H.-S. 2002. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the vertebrate host V: Lyme borreliosis: Biology, epidemiology and contro.. Gray J., Kahl O., Lane R.S., Stanek G. (eds.). Wallingford, CABI Pub: 117-148.

Lagal V., Postić D., Ruzić-Sabljić E., Baranton G. 2003. Genetic diversity among *Borrelia* strains determined by single-strand conformation polymorphism analysis of the *OspC* gene and its association with invasiveness. Journal of Clinical Microbiology 41: 5059e5065.

Lešničar G., Poljak M., Seme K., Lešničar J. 2003. Pediatric tick-borne encephalitis in 371 cases from an endemic region in Slovenia, 1959 to 2000. The Pediatric Infectious Disease Journal 7: 612-618.

Lindgren E. Jaenson T.G.T. 2006. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate change, spidemiology, ecology and adaptation measures, CCASHH Project Report, EUR/04/5046250. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.

Littman M.P., Gerber B., Goldstein R.E., Labato M.A., Lappin M.R., Moore G.E. 2018. ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. Journal of Veterinary Internal Medicine: 887-903.

Logar J. 1999. Parazitologija v medicini. 1. izd. Ljubljana, DZS.

Logar M., Ružić-Sabljić E., Lotric-Furlan S., Cimperman J., Jurca T., Strle F. 2004. Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infection* 32: 15e19.

Magnarelli L.A., Anderson J.F. 1988. Ticks and Biting Insects Infected with the Etiologic Agent of Lyme Disease, *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*: 1482-1486.

Magnarelli L.A., Anderson J.F. 1989. Class-specific and polyvalent enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in equids. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195: 1365–1368.

Magnarelli L.A., Anderson J.F., Schreier A.B. 1990. Persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs of New York and Connecticut. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 196: 1064–1068.

Magnarelli L.A. 2009. Global Importance of Ticks and Associated Infectious Disease Agents. *Clinical Microbiology Newsletter* 31:5.

Mannelli A., Bertolotti L., Gern L., Gray J. 2012. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiology Reviews* 86: 633-44.

Maraspin V., Ružić-Sabljić E., Cimperman J., Lotrič Furlan S., Jurca T., Picken R.N., Strle F., 2001. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of patients with erythema migrans. *Infection* 29: 65–70.

Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 1545-1563.

Margos G., Gofton A., Wibberg D., Dangel A., Marosevic D., Loh S.-M., Oskam C., Fingerle V. 2018. The genus *Borrelia* reloaded. *PLoS One* 13(12): e0208432.

Margos G., Fingerle V., Reynolds S. 2019. *Borrelia bavariensis*: Vector Switch, Niche Invasion, and Geographical Spread of a Tick-Borne Bacterial Parasite. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10: 401.

Masuzawa T. 2004. Terrestrial Distribution of the Lyme Borreliosis Agent *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in East Asia. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57: 229-235.

Materna J., Daniel M., Metelka L., Harcarik J. 2008. The vertical, distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by climate changes (the Krkonose Mts., Czech Republic). *International Journal of Medical Microbiology* 298: 25-37.

Medlock J.M., Hansford K.M., Bormane A., Derdakova M., Estrada-Peña A., George J.C., Golovljova I., Jaenson T.G., Jensen J.K., Jensen P.M., Kazimirova M., Oteo J.A., Papa A., Pfister K., Plantard O., Randolph S.E., Rizzoli A., Santos-Silva M.M., Sprong H., Vial L., Hendrickx G., Zeller H., Van Bortel W. 2013. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors* 6: 1.

Mwangi E.N., Dipeolu O.O., Newson R.M., Kaaya G.P., Hassan S.M. 1991. Predators, parasitoids and pathogens of ticks: A review. *Biocontrol Science and Technology* 3: 147-156.

Nacionalni inštitut za javno zdravje. <http://www.nijz.si/sl> (datum dostopa: 18.4.2019)

Nadelman R.B., Wormser G.P. 1998. Lyme borreliosis. *Lancet* 352: 557-565.

Neelakanta G., Li X., Pal P., Liu X., Beck D.S., DePonte K., Fish D., Kantor F.S., Fikrig E. 2007. Outer Surface Protein B Is Critical for *Borrelia burgdorferi* Adherence and Survival within *Ixodes* Ticks. *PLoS Pathogens* 3(3): e33.

Norris D.E., Johnson B.J.B., Piesman J., Maupin G.O., Clark J.L., Black IV W.C. 1997. Culturing select for specific genotypes of *Borrelia burgdorferi* in the enzootic cycle in Colorado. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2359–2364.

Oliver J.H. 1982. Tick reproduction: sperm development and cytogenetics. *The Physiology of Ticks*: 245–275.

Olsen I., Paster B.J., Dewhirst F.E. 2000. Taxonomy of spirochetes. *Anaerobe* 6: 39-57.

Pal U., Li X., Wang T., Montgomery R.R., Ramamoorthi N., de Silva A.M., Bao F., Yang X., Pypaert M., Pradhan D., Kantor F.S., Telford S., Anderson J.F., Fikrig E. 2004. TROSPA, an *Ixodes scapularis* Receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119(4): 457-468.

Paster B.J. 2010. Phylum XV. Spirochaetes Garrity and Holt 2001. V: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Volume Four. The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*.

Krieg N.R., Staley J.T., Brown D.R., Hedlund B.P., Paster B.J., Ward N.L. Ludwig W., Whitman W.B., Parte A.C. (ur.). 2nd ed. New York, Springer:471-566.

Petney T.N., Pfäffle M.P., Skuballa J.D. 2012. An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *Systematic and Applied Acarology* 17: 115-170.

Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Fish D., Krause P.J. 2011. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerging Infectious Diseases* 17(10): 1816–1823.

Preac-Muršič V. 2000. Lymska borelioza. *Proteus*: 345-349.

Qiu W.-G., Schutzer S.E., Bruno J.F., Attie O., Xu Y., Dunn J.J., Fraser C.M., Casjens S.R., Luft B.J. 2004. Genetic exchange and plasmid transfers in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto revealed by three-way genome comparisons and multilocus sequence typing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:14150–14155.

Radolf J.D., Caimano M.J., Stevenson B., Hu L.T. 2012. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature Reviews Microbiology* 2: 87-99.

Royal Meteorological Institute of Belgium. <https://www.meteo.be/en/belgium> (datum dostopa: 23.3.2020)

Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J. H. J. 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2: 123-128.

Ružič-Sabljić E., Strle F., Cimperman J. 1993. The *Ixodes ricinus* tick as a vector of *Borrelia burgdorferi* in Slovenia. *European Journal of Epidemiology* 4: 396-400.

Ružič-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Jurca T., Logar M., Pikelj-Pečnik A., Strle F. 2002. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wien Klin Wochenschrift* 13–14: 544–550.

Ružič-Sabljić E., Zore A., Strle F. 2008. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates by pulsed-field gel electrophoresis after *MluI* restriction of genomic DNA. *Research in Microbiology* 159 (6): 441-448.

- Ružić-Sabljić E., Cerar T. 2016. *Borrelia* Genotyping in Lyme Disease. *The Open Dermatology Journal* 10 (Suppl 1: M2): 6-14.
- Samish M., Rehacek J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology* 44: 159-182.
- Schmidt S., Essbauer S.S., Mayer-Scholl A., Poppert S., Schmidt-Chanasit J., Klempa B., Henning K., Schares G., Groschup M.H., Spitzenberger F., Richter D., Heckel G, Ulrich R.G. 2014. Multiple Infections of Rodents with Zoonotic Pathogens in Austria. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 14(7): 467–75.
- Schouls L.M., Van de Pol I., Rijpkema S.G., Schot C.S. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2215-2222.
- Schutzer S.E., Fraser-Liggett C.M., Casjens S.R., Qiu W.-G., Dunn J.J, Mongodin E.F., Luft B.J. 2011. Whole-Genome Sequences of Thirteen Isolates of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology* 193: 1018-1020.
- Schwan T.G., Piesman J. 2000. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 382-388.
- Scoles G.A., Papero M., Beati L., Fish D. 2001. A Relapsing Fever Group Spirochete Transmitted by *Ixodes scapularis* Ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 1: 21-34.
- Servent A.A., Charachon S.Y., Bilak E.J., Karayan L., Ramuz M. 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Journal of Bacteriology* 175: 7869-7874.
- Sherwood C., Wai M.H. 1993. Linear chromosomal and genetic map of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Molecular microbiology* 5: 967-980.
- Smith R.P. Jr., Muzaffar S.B., Lavers J., Lacombe E.H., Cahill B.K., Lubelczyk C.B., Kinsler A., Mathers A.J., Rand P.W. 2006. *Borrelia garinii* in seabird ticks (*Ixodes uriae*), Atlantic Coast, North America. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1909–1912.
- Sonenshine D.E. 1991. *Biology of Ticks*. Vol 1. New York, Oxford University Press.
- Sonenshine D.E., Roe R.M. 2014. *Biology of ticks*. Vol 1. 2nd edition. New York, Oxford University Press.

Stanek G., Burger I., Hirsch A., Wewalka G., Radda A. 1986. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A263, 1-2: 29-33.

Stanek G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristoferitsch W., Granström M., Guy E., Gray J. 1996. European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. Wiener Klinische Wochenschrift 108: 741-747.

Stanek G., Strle F. 2003. Lyme borreliosis. Lancet 362: 1639-1647.

Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K. P., Jaulhac B., Kaiser R., Krause A., Kristoferitsch W., O'Connell S., Ornstein K., Strle F., Gray J. 2010. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. Clinical Microbiology and Infectious Diseases 17: 69-79.

Stanek G., Reiter M. 2011. The expanding Lyme *Borrelia* complex—clinical significance of genomic species? Clinical Microbiology and Infection 17: 487–493.

Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F. 2012. Lyme borreliosis. Lancet 379: 461-473.

Stanek G., Strle F. 2018. Lyme borreliosis—from tick bite to diagnosis and treatment. FEMS Microbiology Reviews 42: 233-258.

Steere A. C. 1989. Lyme disease. The New England Journal of Medicine 321: 586-596.

Steere A.C., Malavista S.E., Snyderman D.R., Andiman W.A. 1976. A duster of arthritis in children and adults in Lyme, Connecticut. Arthritis and Rheumatism 19: 824.

Steere A.C., Malavista S.E., Snyderman D.R., Shope R.E., Andiman W.A., Ross M.R., Steele F.M. 1977. Lyme arthritis. An epidemic of oligoarthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthritis and Rheumatism 20: 7-17.

Steere A.C. 1989. Medical progress. Lyme disease. New England Journal of Medicine 9: 586-596.

Steere A.C., Coburn J., Glickstein L. 2004. The emergence of Lyme disease. The Journal of clinical investigation 8: 1093-1101.

Strle F. 1991. Kakšna je možnost, da po vbodu klopa dobimo lymsko boreliozo? Zdravstveni Vestnik 60: 140-141.

Strle F., Stanek G. 2009. Clinical manifestations and diagnosis of lyme borreliosis. *Current Problems in Dermatology* 37: 51-110.

Strle F., Bogovič P., Cimperman J., Maraspin V., Ogrinc K., Rojko T., Stupica D., Lusa L., Avšič-Županc T., Strašek Smrdel K., Jelovšek M., Lotrič-Furlan S. 2014. Are Patients with Erythema Migrans Who Have Leukopenia and/or Thrombocytopenia Coinfected with *Anaplasma phagocytophilum* or Tick-Borne Encephalitis Virus? *PLoS One* 9(7): e103188.

Tack W., Madder M., De Frenne P., Vanhellefont M., Gruwez E., Verheyen K. 2011. The effects of sampling method and vegetation type on the estimated abundance of *Ixodes ricinus* ticks in forests. *Experimental and Applied Acarology* 54(3): 285-292.

Tovornik, D. 1990. *Ixodes (Eschatocephalus) vespertilionis* Koch, 1844 (Arachn., Ixodidae) regarding its specific hosts and natural habitats (Slovenia, Yugoslavia). *Acta Entomologica Jugoslavica* 23: 15-28.

Tovornik D. 1991. Data on ticks *Ixodes frontalis* Panzer 1798 and *Ixodes arboricola* Schulze et Schlottke 1929 found on birds in Yugoslavia. *Biološki vestnik* 39: 157–164.

Vollmer S.A., Margos G., Donaghy M., Bormane A., Drancourt M., Garnier M., Cornet M., Kurtenbach K. 2011. Phylogeographic Structuring and Evolutionary Relationships of Lyme Borreliosis Spirochetes in Europe as Revealed by MLSA. *Environmental Microbiology* 13: 184–192.

Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 633-653.

Wodecka B. 2007. Significance of red deer (*Cervus elaphus*) in the ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Wiadomosci Parazytologiczne* 53(3): 231-237.

Wolff D., Gerritzen A. 2011. Evaluation of a Real-Time PCR Assay for the Detection, Genotyping, and Quantification of *Borrelia Burgdorferi* Sensu Lato in *Ixodes* Ticks in a Routine Laboratory Setting. *Clinical Laboratory* 57(1-2): 67-73.

Wolfgang L., Euzéby J., Whitman W.B. 2010. Road map of the phyla *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. V: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Volume 4. The

Bacteroidetes, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. Krieg N.R., Staley J.T., Brown D.R., Hedlund B.P., Paster B.J., Ward N.L. , Ludwig W., Whitman W.B., Parte A.C. (ur.). 2nd ed. New York, Springer.

World Health Organisation (WHO). 2005. Impact of climate change on health: how to address new threats now. Factsheet EURO/15/5. WHO Regional Office for Europe, Rome.

Zore A., Petrovec M., Prosenc K., Trilar T., Ruzic-Sabljić E., Avsic-Zupanc T. 1999. Infection of small mammals with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Slovenia as determined by polymerase chain reaction (PCR). Wiener klinische Wochenschrift 111(22–23): 997–9.