

Streszczenie

Chlamydie są szeroko rozpowszechnionymi mikroorganizmami o wewnątrzkomórkowym, dwufazowym cyklu rozwojowym. Najczęściej wywołują infekcje układu oddechowego i moczowo-płciowego oraz worka spojówkowego. Rozwój metod molekularnych ułatwił prowadzenie badań, co doprowadziło do znaczących zmian w systematyce bakterii należących do rzędu *Chlamydiales*. Wykrycie nowych gatunków *Chlamydia* u ptaków i gadów wskazuje na ich znacznie większe zróżnicowanie u tych gospodarzy niż dotychczas sądzono. Brak jest jednak szczegółowych danych dotyczących zarówno rozprzestrzenienia, wpływu na ekonomikę produkcji jak i potencjału zoonotycznego nowo opisywanych gatunków. Zwiększa to ryzyko błędnego szacowania zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt.

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę częstości występowania i różnorodności genetycznej chlamydii występujących w populacjach ptaków wolno żyjących i hodowlanych na terenie naszego kraju oraz gadów bytujących w środowisku naturalnym, hodowlach i ogrodach zoologicznych. Podjęto również próbę oceny zagrożenia dla zdrowia ludzi wynikającego z siewstwa *Chlamydia* spp. przez ptaki.

Badania przesiewowe metodą real-time PCR, specyficzną dla bakterii z rodziny *Chlamydiaceae* wykazały, że występują one powszechnie, a siewstwo stwierdzono u 14,8% ptaków wolno żyjących, 15,9% ptaków hodowlanych i 25,0% żółwi. Próbkę *Chlamydiaceae* dodatkowo poddano dalszej analizie (real-time PCR, mikromacierze) w celu określenia gatunku chlamydii.

Najwyższy odsetek siewców *Chlamydiaceae* zanotowano u gatunków ptaków wolno żyjących z rodzin kaczkowatych i krukowatych. Wśród izolatów pochodzących od tej grupy potwierdzono obecność klasycznych genotypów *C. psittaci* (B, C, Mat116) oraz *C. avium*. Jednak najbardziej istotnym jest wykrycie nowych, dotąd nieopisywanych, a znacząco rozpowszechnionych genotypów G1 i G2 oraz genotypu 1V. Analiza filogenetyczna fragmentów genów rybosomalnych oraz analiza sekwencji genów metabolizmu podstawowego metodą MLST uzyskanych szczepów wykazała, że ich pozycja filogenetyczna jest zbliżona do klasycznych szczepów *C. abortus* oraz atypowych *C. psittaci*. Powyższe wyniki badań stanowią podstawę wnioskowania o rozszerzenie definicji gatunku *C. abortus*, tak aby obejmowała ona nie tylko klasyczne szczepy izolowane od ssaków, ale również te stwierdzane u ptaków określane dotąd jako atypowe *C. psittaci* lub avian *C. abortus*.

Badania monitoringowe wykazały obecność *C. gallinacea*, *C. psittaci* oraz *C. abortus* w stadach drobiu. *Chlamydia* spp. znacznie częściej identyfikowano u kur (23,0%) niż u kaczek (4,3%), gęsi (5,6%) czy indyków (3,6%). Badania dowiodły, że *C. gallinacea* jest gatunkiem występującym endemicznie w stadach kur w Polsce, a analiza sekwencji fragmentu genu głównego białka błonowego (*ompA*) wykazała wysokie zróżnicowanie genetyczne badanych izolatów. Ponadto, stwierdzono sporadyczne występowanie *C. psittaci* w stadach kaczek, gęsi i kur. Należy podkreślić również, że są to pierwsze badania, które wykazały obecność *C. abortus* u drobiu.

Chlamydia spp. stwierdzono także u żółwi lądowych i wodno-lądowych, zarówno wolnożyjących, jak i utrzymywanych w hodowlach prywatnych lub ogrodach zoologicznych. Sekwencjonowanie fragmentów genu 16S rRNA umożliwiło określenie pozycji taksonomicznej badanych izolatów. Wszystkie sekwencje pochodzące od żółwi ozdobnych (*Trachemys scripta*) oraz błotnych (*Emys orbicularis*) i wykazujące homologię 16S rRNA do niedawno scharakteryzowanego *Candidatus* *C. sanzinia* oraz *C. pecorum*, zaklasyfikowane zostały do Grupy 1. Pozostałe amplikony o wysokim podobieństwie sekwencji do szczepów *C. pecorum*, uzyskane z próbek pochodzących od żółwi lądowych, utworzyły Grupę 2. Powyższe wyniki, jak również pochodzenie poszczególnych izolatów od gadów z różnych lokalizacji geograficznych, dostarczają dodatkowych dowodów potwierdzających, że szczepy należące do Grupy 1 stanowią nowy, dotychczas nieopisywany gatunek *Chlamydia*. Ponadto izolaty z Grupy 2 należą do odrębnego gatunku rodziny *Chlamydiaceae*, co wcześniej sugerował już Hotzel i współpracownicy.

Przeciwciała przeciwko *Chlamydia* spp. wykryto u 19,2% osób z grupy badanej, narażonych na kontakt z ptakami, podczas gdy w populacji kontrolnej odsetek ten wyniósł 10,8%. Uzyskane wyniki wskazują na blisko dwukrotnie wyższe szanse stwierdzenia przeciwciał u osób narażonych na kontakt z ptakami w porównaniu z grupą kontrolną.

Prezentowane wyniki badań świadczą o znaczącym rozpowszechnieniu i wysokim zróżnicowaniu *Chlamydia* spp. obecnych w populacjach ptaków i gadów w Polsce. Potwierdzają również tezę, że zwierzęta te stanowią rezerwuar nowych gatunków chlamydii. Oryginalne rezultaty przedstawione w niniejszej pracy stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy ogólnej, a także mogą posłużyć za podstawę wprowadzenia zmian w taksonomii bakterii z rodziny *Chlamydiaceae*.

Summary

Chlamydia are widely distributed microorganisms characterised by intracellular, biphasic life cycle. Most often they cause infections of respiratory and genitourinary systems as well as conjunctival sack diseases. The development of molecular biology techniques facilitated chlamydia research and led to significant changes in the taxonomy of the order *Chlamydiales*. Detection of new *Chlamydia* species in birds and reptiles indicates higher diversity in these hosts than previously thought. However, there are no detailed data regarding both the spread, impact on production economics and the zoonotic potential of newly described species. Thus, the risk to human and animal health can be underestimated.

Therefore, the research was undertaken to assess the prevalence and genetic diversity of chlamydia occurring in populations of free-living birds and poultry in our country as well as reptiles, living both in the natural environment or private households and zoological gardens. An attempt was further made to assess the threat to human health posed by birds shedding *Chlamydia* spp.

Chlamydiaceae-specific real-time PCR used as screening method confirmed their common occurrence. High level of chlamydia prevalence was noted in all tested animals: 14.8% in free-living birds, 15.9% in poultry and 25.0% in free-living and captive reptiles. The further work focused on species identification in chlamydia-positive samples with multiple real-time PCR and microarray methods.

The highest percentage of *Chlamydiaceae* shedders was noted in free-living birds from Anatidae and Corvidae families. The research confirmed the presence of classical *C. psittaci* genotypes (B, C, Mat116) and *C. avium*. Nevertheless, the most important result was detection of new, widely disseminated genotypes G1, G2, noted here for the first time, as well as 1V. Phylogenetic analysis of the ribosomal gene fragments and MLST analysis of housekeeping genes sequences of obtained strains, placed them in the vicinity of the typical *C. abortus* and atypical *C. psittaci* strains. Thus, on the basis of above research a conclusion can be made to extend the *C. abortus* species definition to include not only the classical strains isolated from mammals, but also avian isolates so far referred to as atypical *C. psittaci* or avian *C. abortus*.

C. gallinacea, *C. psittaci* and *C. abortus* were found in samples from poultry. *Chlamydia* spp. were more frequently detected in chicken (23.0%) than in duck (4.3%), geese (5.6%) or turkey (3.6%) flocks. The results of the present study confirmed that *C. gallinacea* is endemic species in Polish chicken flocks. Furthermore, analysis of the

outer membrane protein (*ompA*) gene fragment showed a high genetic diversity of circulating strains. Moreover, occasional occurrence of *C. psittaci* was found in flocks of ducks, geese and chickens. It should also be emphasized that this is the first report confirming the presence of *C. abortus* in poultry.

Chlamydia spp. were also detected in terrestrial tortoises and semi aquatic turtles, both captive and free-living. Taxonomic position of the tested isolates was determined based on sequencing and phylogenetic analysis of 16S rRNA fragments. All sequences from pond sliders (*Trachemys scripta*) and European pond turtles (*Emys orbicularis*), showing the highest homology of 16S rRNA to the recently characterized *Candidatus* *C. sanzina* and *C. pecorum*, were classified as Group 1. The remaining amplicons, with high sequence similarity to *C. pecorum* strains, form Group 2 and were obtained from *Testudo* genus specimens. Obtained results and the geographically remote origin of samples provide further evidence that isolates belonging to Group 1 represent new *Chlamydia* species, described in the presented work for the first time. Group 2 constitute also a new, yet undescribed species within the *Chlamydiaceae* family, as was previously suggested by Hotzel and co-workers.

Chlamydial antibodies were detected in 19.2% human serum samples in the study group (declared contact with birds) whereas 10.8% positive results were noted in control population. Obtained results indicate almost twice as high chances of seropositivity in the study group than in controls.

Presented research results indicate high prevalence and diversity of *Chlamydia* spp. present in populations of birds and reptiles in Poland, confirming the thesis that these animals constitute considerable reservoir of new chlamydia species. Unique data shown in this thesis constitute important contribution to development of general knowledge and can serve as substantial basis to introduce changes in taxonomy of the family *Chlamydiaceae*.