

Streszczenie

Trichomonas foetus to pasożytniczy pierwotniak, należący do rodziny Trichomonadidae, rzędu Trichomonadorida, typu Sarcomastigophora. W przeszłości w Polsce rzęśistek był identyfikowany u bydła z wysoką prevalencją, zaś rzęśistkowica była jednym z głównych powodów bezpłodności i ronień u krów. Ponadto choroba ta stanowiła istotny problem ekonomiczny dla hodowców ze względu na straty finansowe ponoszone w celu zwalczania inwazji pasożyta. Obecnie nasz kraj jest wolny od zarazy rzęśistkowej bydła ze względu na wprowadzenie sztucznej inseminacji jako podstawowego sposobu rozmnażania tych zwierząt. Niemniej badania w kierunku rzęśistkowicy są w Polsce obowiązkowe a rzęśistkowica znajduje się na liście chorób zakaźnych notyfikowanych przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (O.I.E.), a także w wykazie chorób zakaźnych podlegających obowiązkowi rejestracji na terenie kraju (Załącznik nr 3 do Ustawy z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt). Ponadto, *T. foetus* jest komensalem występującym u świń. Jednak u tych zwierząt nie powoduje żadnych objawów chorobowych i nie istnieje obowiązek badania trzody chlewnej w kierunku rzęśistkowicy. W ciągu ostatnich kilkunastu lat pierwotniak jest stwierdzany również u kotów, u których może być przyczyną trudnych do leczenia uporczywych, chronicznych biegunek. W związku z tym, zwierzęta te wydają się być obecnie jedynym znanym rezerwuarem pasożyta w Polsce. Wzmożenie zainteresowania tematyką rzęśistkowicy kotów wśród hodowców oraz lekarzy weterynarii skłoniło do opracowania czułego, skutecznego i szybkiego testu służącego do identyfikacji materiału genetycznego *T. foetus* z kału kotów.

W toku prowadzonych badań opracowano dwa nowe testy tj. TF- β tub-LAMP oraz rt-TF-rDNA-2-PCR. Przy projektowaniu starterów do metody TF- β tub-LAMP po raz pierwszy na świecie użyto do tego celu nowego markera genetycznego tj. genu kodującego białko β -tubulinę, który okazał się być przydatny w diagnostyce molekularnej rzęśistkowicy. Ponadto analiza wyników z przeprowadzonych testów walidacji metody wskazywała na wysoką czułość amplifikacji równą 1 komórce *T. foetus* w badanej próbce (zarówno z kału jak i bezpośrednio z hodowli komórkowej). W pracach nad nowymi metodami molekularnymi służącymi do wykrywania *T. foetus* dostrzeżono również problem występowania fałszywie dodatnich wyników w reakcji z DNA *Simplicimonas* sp. we wcześniej opracowanym rt-TF-rDNA-1-PCR wg Frey (Frey i wsp., 2017) i w związku z tym stworzono jego nową wersję nazwaną rt-TF-rDNA-2-PCR. Dodatkowo, przydatność nowo opracowanych metod biologii molekularnej porównano z wcześniej istniejącymi tj.: c-TF-rDNA-PCR wg Felleisen (Felleisen i wsp., 1997), rt-TF-rDNA-1-PCR (Frey et al., 2017) oraz TF-elf1 α 1-LAMP wg Oyhenart (Oyhenart i wsp.,

2018). Otrzymane wyniki wskazywały jednoznacznie, że najwyższą czułość wykazał test rt-TF-rDNA-2-PCR (<1 komórki rzęśistka w próbce kału jak i hodowli komórkowej). W celu oceny diagnostycznej porównywanych testów do badań porównawczych włączono również materiał biologiczny pobrany od 20 kotów z podejrzeniem rzęśistkowicy. Analizy wyników ujawniły, że najwyższą skutecznością w wykrywaniu DNA rzęśistka charakteryzowały się dwa nowo opracowane testy tj. rt-TF-rDNA-2-PCR i TF- β tub-LAMP oraz wcześniej istniejący TF-elf1 α 1-LAMP wg Oyhenart (Oyhenart i wsp., 2018). Biorąc pod uwagę zalety dwóch nowych technik amplifikacji tj. wysoką czułość i specyficzność oraz przydatność do identyfikacji rzęśistków z trudnych matryc (kał) należy podkreślić, iż oba testy mogą być użytecznymi narzędziami do badań diagnostycznych rzęśistkowicy i mogą stanowić alternatywę dla stosowanych obecnie metod.

Zgodnie z celem rozprawy doktorskiej część badań dotyczyła analizy genetycznej szczepów rzęśistka pochodzących od trzech gospodarzy. Należy podkreślić, że kwestia odrębności genetycznej *T. foetus* pochodzącego od bydła, kotów i świń stanowi jedną z najbardziej intrygujących zagadek z dziedziny parazytologii. Ponadto nieznanne są formy przetrwalnikowe umożliwiające przeżycie pierwotniakowi w środowisku zewnętrznym. Eksperymentalnie potwierdzono, że istnieje możliwość zarażenia się bydła pasożytem izolowanym od kotów i świń. W związku z tym przeniesienie tych blisko spokrewnionych genotypów z jednego gatunku gospodarza na drugi uznano za realistyczny scenariusz. Jednakże, w aktualnej literaturze nie ma bezpośrednich dowodów na międzygatunkową transmisję *T. foetus* w środowisku naturalnym. Dotychczas przeprowadzone doświadczenia z zastosowaniem narzędzi biologii molekularnej tj. genotypowania wybranych fragmentów DNA przy użyciu różnych markerów wskazywały na jedynie niewielkie różnice między szczepami rzęśistka od bydła, kotów i świń. Dlatego w celu bliższego poznania struktury całych genomów *T. foetus* oraz wskazania potencjalnych podobieństw i różnic między szczepami w niniejszej pracy doktorskiej użyto metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS) z zastosowaniem technologii Illumina HiSeq 3000. W odniesieniu do wcześniej zsekwencjonowanego przez Benchimol (Benchimol i wsp., 2017) genomu rzęśistka bydłowego zidentyfikowano polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz insercje i delecje (InDels) między 3 szczepami. Największą liczbę różnic definiowaną jako InDel i SNP równą 338 803 stwierdzono między TF1 (genom *T. foetus* od bydła) a TF2 (genom *T. foetus* od kota) oraz między TF2 a TF3 (genom *T. foetus* od świni) - 338 916. Natomiast ilość różnic genetycznych między TF1 a TF3 była wyjątkowo mała i wyniosła 392. Podobną tendencję stwierdzono po analizie wariantów (InDel i SNP) mających wpływ na funkcję białka. W celu potwierdzenia

doświadczalnie uzyskanych wyników na podstawie sekwencji wyselekcjonowanych *in silico* z wyznaczonych miejsc z InDel i SNP w genomie *T. foetus* od kota opracowano 25 reakcji amplifikacji. Otrzymane produkty PCR różniły się między sobą długością co potwierdziło różnorodność genetyczną szczepów rżęsiśtków od bydła i kota. Należy podkreślić, że przeprowadzone analizy dostarczyły nowej wiedzy na temat genetycznej struktury genomów *T. foetus* od bydła, kota i świni, które mogą być przydatne w przyszłych badaniach nad transmisją rżęsiśtka w obrębie różnych gospodarzy. Ponadto, wyniki badań WGS mogą również posłużyć jako cenna podstawa do zastosowania nowoczesnych technologii z wykorzystaniem nauk „omicznych” do poznania relacji pasożyt-gospodarz.

Prowadzone badania obejmowały także ocenę występowania rżęsiśtka u zwierząt wrażliwych (bydła, kotów, świń oraz dzików) z Polski. Analizy nad występowaniem *T. foetus* w próbkach od kotów i świń nie były jak dotąd udokumentowane w naszym kraju, zaś ostatni przypadek rżęsiśtkowicy u bydła odnotowano w 1997. Ponadto do badań włączono próbki od dzików i wg dostępnej wiedzy była to pierwsza próba identyfikacji *T. foetus* u tych zwierząt. W celu lepszej skuteczności detekcji pasożyta, w diagnostyce wykorzystano dwa testy: PCR wg Felleisen (Felleisen i wsp., 1997) oraz nowo opracowany test TF- β tub-LAMP. Wyniki badań wykazały 20.51% wyników dodatnich u kotów oraz 16.28% u świń. W próbkach od bydła i dzików nie stwierdzono obecności rżęsiśtka. Uzyskane wyniki wskazują na wysoki odsetek występowania *T. foetus* u kotów i świń co może stanowić potencjalne zagrożenie również dla bydła, dlatego monitoring występowania pierwotniaka w populacji zwierząt wrażliwych wydają się być bardzo istotny.

Podsumowując, nowo opracowane metody molekularne okazały się skuteczne w identyfikacji *T. foetus*. Dzięki zastosowaniu nowych metod wykazano występowanie *T. foetus* u stosunkowo wysokiego odsetka kotów i świń w wybranych populacjach w Polsce. Analiza porównawcza genomów *T. foetus* ujawniła duże różnice genetyczne między izolatami pochodzącymi od kotów a izolatami pochodzącymi od bydła i świń. Jednocześnie stwierdzono duże podobieństwo DNA *T. foetus* pochodzącego od świń i bydła. Otrzymane wyniki mogą stanowić bazę dla dalszych badań nad relacją pasożyt-żywiciel, a także nad możliwością transmisji rżęsiśtka pomiędzy różnymi gatunkami żywicieli.

Summary

Tritrichomonas foetus is a protozoan parasite belonging to Trichomonadidae family, Trichomonadorida order, Sarcomastigophora phylum. In the past, tritrichomonosis was identified in Polish cattle population with high prevalence and presence of *T. foetus* was one of the main causes of infertility and abortion in cows. Moreover, the disease causes a significant economic problem for breeders due to financial losses incurred to combat parasite infection. At the present, our country is free of bovine tritrichomonosis- because of using artificial insemination as a main method of cattle reproduction. Nevertheless, examining cattle for the presence of parasite and reporting bovine tritrichomonosis is mandatory in Poland. Moreover, tritrichomonosis is on the list of diseases notified by the World Organization for Animal Health (OIE), as well as on the list of infectious diseases subjected for registration within the country (Annex 3 to the Act of 11 March 2004 on the protection of animal health and combating infectious animal diseases). *T. foetus* is a commensal of pigs and porcine infection in the most cases manifests any symptoms. Therefore there is no duty for testing tritrichomonosis in pigs. During the last few decades *T. foetus* has been also detected among cats. Feline tritrichomonosis leads to chronic diarrhoea, which is also difficult for treatment. Therefore, these animals act as the main reservoir of the disease in Poland. Nowadays feline tritrichomonosis became one of the most interesting parasitological problem among cat breeders and veterinarians which prompted development of a sensitive, effective and rapid test for DNA of *T. foetus* identification from feline fecal samples.

Our research involved the development of two new molecular methods, i.e. TF- β tub-LAMP and rt-TF-rDNA-2-PCR. For design TF- β tub-LAMP a new genetic marker was used for the first time. i.e. the gene encoding the β -tubulin protein, which proved to be useful in the molecular diagnosis of tritrichomonosis. Moreover, analysis of the results with validation tests shows high sensitivity of amplification with 1 trichomonad cell in the tested sample (both from faeces and from cell culture). In previous investigations on molecular tests for the detection of *T. foetus*, false positive results in the reaction with *Simplicimonas* sp. was noted in rt-TF-rDNA-1-PCR (Frey et al., 2017). Therefore, in the current study new version of rt-TF-rDNA-1-PCR with the modification (3'truncated derivatives of primers) called rt-TF-rDNA-2-PCR was developed. Additionally, methodical sensitivities of TF- β tub-LAMP and rt-TF-rDNA-2-PCR was compared with previously published i.e.: c-TF-rDNA-PCR according to Felleisen et al. (1997), rt-TF-rDNA-1-PCR (Frey et al., 2017) and TF-elf1 α 1-LAMP according to Oyhenart et al. (2018). The obtained results clearly showed that the highest sensitivity was demonstrated by

the rt-TF-rDNA-2-PCR test (<1 parasite from faecal sample as well as cell culture). For the determination of diagnostic sensitivities of the all molecular methods, amplification reactions were performed in duplicates with DNA extractions from the faecal samples representing 20 suspected feline tritrichomonosis cases. Analysis of the results revealed that two newly developed tests, i.e. rt-TF-rDNA-2-PCR and TF- β tub-LAMP and the previously known TF-elf1 α 1-LAMP according to Oyhenart et al. (2018) equally performed the best sensitivity with 8 positive results among 20 tested samples. Considering the advantages of two new amplification techniques, i.e. high sensitivity and specificity, and usefulness for *T. foetus* detection in difficult matrices (faeces), all evaluated tests are basically suited to perform a specific diagnosis of tritrichomonosis in different hosts. Moreover, both methods TF- β tub-LAMP and rt-TF-rDNA-2-PCR may be a diagnostic alternative for currently used techniques.

According to the purpose of the doctoral dissertation, part of the study was focused on genetic analysis of *T. foetus* from cattle, cat and pig. It should be noticed that genetic identity of *T. foetus* from cattle, cats and pigs still causes one of the most intriguing gap of knowledge in the field of parasitology. Although it is currently assumed that *T. foetus* pseudocyst formation is reversible and that it represents a response to stressful conditions, there are no reports showing the presence of this form *in vivo*. Experimental cross-infection of cats inoculated with *T. foetus* from cattle and pigs and *vice versa* gave positive results (Stockdale et al., 2009). Therefore, the transfer of these closely related genotypes from one species host to another should be considered as a realistic scenario. However, there is no direct evidence on interspecies *T. foetus* transmission in natural conditions. So far, *T. foetus* genotypes were characterized with only very few genetic markers i.e. genotyping selected DNA fragments and respective studies showed small differences between strains. Therefore, next generation sequencing approach was used to learn more about the genetic structure of *T. foetus* and to assess the genetic differences between bovine, feline and porcine isolates. In particular, we identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the insertion-deletion (InDel) variations within the genomes of the different strains. Interestingly, only a low degree of polymorphism (68 SNPs and indels) was found between the bovine and the porcine strains in terms of variants with a predicted impact of moderate or high and where one species is homozygous for one allele and the other homozygous for the other allele. Conversely, however, a 964 times higher number of such differences was detected by comparing the feline with either the bovine (65,569) or the porcine (65,615) strain. These data clearly indicated a close phylogenetic relationship between bovine and porcine *T. foetus* but a remarkable genetic distinctness of these two strains from the feline strain. The latter observation was confirmed by PCR-based sequencing of 20 *in silico*-selected

indel markers and 5 in silico-selected SNPs markers that uniformly demonstrated a relatively distant phylogenetic relationship of three independent feline *T. foetus* isolates in comparison to the bovine and porcine strains investigated. It should be emphasized that comparative genome sequencing approach provided new knowledge about the genetic structure of *T. foetus* from cattle, cat and pig. Furthermore, our study may be useful in the future investigations on parasite transmission between hosts and also serve as a valuable basis for the application of all methods using the omics technologies for the parasite-host relationship investigations.

The study also included estimation of the *T. foetus* prevalence in animal hosts (cattle, cats, pigs and wild boars) from Poland. Studies on occurrence of *T. foetus* in samples from cats and pigs have not been documented in our country so far, and the last case of tritrichomonosis in cattle was recorded in 1997. In addition, samples from wild boars were included in the study and according to available knowledge it was the first identification of *T. foetus* in these animals. For better efficacy, two tests, i.e. PCR according to Felleisen (Felleisen et al., 1997) and the newly developed TF- β tub-LAMP test were used as diagnostic methods in the studies. The study indicated that the percentage of positive samples in cats was 20.51% and 16.28% in pigs, whereas samples from cattle and wild boars were negative. The obtained results indicate a high percentage of *T. foetus* in cats and pigs, which may pose a potential threat to cattle, therefore monitoring of the presence of protozoa in the population of sensitive animals seems to be very important.

Summarizing, it should be mentioned that newly developed molecular methods have high efficacy in *T. foetus* identification. Thus, with using new molecular tools relatively high prevalence of *T. foetus* infection was found among selected populations of cats and pigs in Poland. . Whole genome sequencing of a feline strain of *Tritrichomonas foetus* reveals massive genetic differences to bovine and porcine isolates. Moreover high amount of similarities was found between *T. foetus* strains from pigs and cattle. The obtained results of WGS data may also serve as a valuable basis to the investigations on the parasite-host relationship, as well as on the possible transmission between different host species.