

## Streszczenie

Gorączka Q to zoonoza notowana u ludzi oraz wielu gatunków zwierząt na całym świecie. Czynnikiem etiologicznym tej choroby jest *Coxiella (C.) burnetii*, wysoce zakaźny i zaraźliwy drobnoustroj, uznawany za broń biologiczną kategorii B. Z uwagi na brak objawów patognomicznych, a także częsty subkliniczny przebieg infekcji u bydła, ostateczne rozpoznanie zakażeń tym patogenem wymaga zastosowania odpowiednich badań laboratoryjnych.

Celem badań było określenie seroprewalencji oraz prewalencji *C. burnetii* w stadach bydła hodowanego w Polsce połączone z charakterystyką molekularną szczepów terenowych przy zastosowaniu metod MLVA i MST. Do badań serologicznych i/lub molekularnych włączono także mleko i produkty mleczne, w tym mleko z mlekomatów dostępne w sprzedaży na terenie Polski. Ponadto, w celu oceny możliwości transmisji drobnoustroju drogą alimentarną, przeprowadzono doświadczenie na kawiach domowych.

Badania serologiczne 2635 próbek surowicy krwi bydłowej, pozyskanej od zwierząt z 969 stad, wykazały obecność przeciwciał anti-*C. burnetii* w 24,46% stad. Różnego rodzaju materiał biologiczny do badań molekularnych pobrano od bydła z terenu 15 województw. W sumie przebadano 1439 próbek, które pochodziły z 279 stad, w tym: 897 próbek mleka, 101 próbek mleka zbiorczego, 409 wymazów z dróg rodnych oraz 32 wycinki łożysk. Ponadto, badaniom poddano 12 próbek mleka dostępnego w handlu, w tym 2 próbki pochodzące z mlekomatów oraz 40 próbek produktów mlecznych. Materiał genetyczny patogenu (sekwencja insercyjna IS1111 kodująca transpozazę) wykryto metodą real-time PCR w 31,54% stad bydła objętych badaniami oraz w 69,2% badanych mlek i produktów mlecznych dostępnych w handlu. Stwierdzono również, że najczęstszą drogą siewstwa *C. burnetii* w stadach jest siewstwo z mlekiem.

Dodatkowo, przy użyciu testu chi-kwadrat, wykonano analizę porównawczą wyników badania zbiorczych oraz indywidualnych próbek mleka, które uzyskano metodami ELISA i real-time. Zarówno w przypadku uwzględnienia wyników wątpliwych, jak i bez nich, test chi-kwadrat wykazał istotną statystycznie zależność pomiędzy wynikami testu real-time PCR i ELISA, każdorazowo przy poziomie  $p < 0,0001$ . W przypadku analizy wartości Ct oraz OD indywidualnych i zbiorczych próbek mleka przy użyciu współczynnika korelacji Spearmana, otrzymano istotną statystycznie korelację ujemną (odpowiednio  $R = -0,49$  oraz  $R = -0,46$ ).

Kluczowy aspekt pracy stanowiło genotypowanie szczepów bakterii z zastosowaniem metod: multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) oraz multispacer sequence typing (MST). Zostało ono wykonane z wykorzystaniem DNA ekstrahowanego bezpośrednio z próbek, bez wcześniejszej izolacji patogenu na liniach komórkowych. Wszystkie zidentyfikowane genotypy MLVA oraz typy sekwencyjne MST zostały zweryfikowane oraz dodane do międzynarodowych internetowych baz danych przez ich administratorów. Metoda MLVA, charakteryzująca się większą zdolnością dyskryminacji, pozwoliła na identyfikację w próbkach terenowych 7 genotypów, w tym dwóch nowych, które nie były dotychczas opisywane. Najczęściej stwierdzany był genotyp I o liczbie STR 6-13-2-7-9-9, do którego należało 25% szczepów terenowych poddanych genotypowaniu. Nieco rzadziej zidentyfikowano genotyp J (6-13-2-7-9-10), którego odsetek stanowił 16% analizowanych próbek. Obydwa genotypy wykazują rozległy zasięg występowania geograficznego i są jednymi z najczęściej identyfikowanych u bydła nie tylko w Polsce, ale również na świecie. Każdy z dwóch nowych genotypów MLVA stanowił jedynie 2% w puli szczepów genotypowanych, natomiast w niektórych przypadkach nie udało się uzyskać pełnego genotypu bądź wykrywano genotyp mieszany. Genotypowanie z wykorzystaniem DNA uzyskanego z próbek mleka i produktów mlecznych dostępnych w sprzedaży, pozwoliło na identyfikację w jednej z próbek trzeciego nowego genotypu, natomiast w dwóch wykryto genotyp 6-13-2-7-9-9 (I). Minimalne drzewa rozpinające obrazują wysokie podobieństwo genetyczne nie tylko pomiędzy genotypami MLVA szczepów bydłych zidentyfikowanymi w niniejszych badaniach, ale także pomiędzy tymi występującymi w innych krajach, co może wskazywać na specyficzność gatunkową oraz klonalne rozprzestrzenianie się szczepów *C. burnetii* w populacji bydła. Za pomocą techniki MST wykazano przynależność szczepów terenowych do trzech typów sekwencyjnych: ST16, ST20 oraz jednego nowego, który opisano jako ST61. Z kolei w próbkach dostępnych w sprzedaży zidentyfikowano jedynie ST61. Analiza sekwencji nukleotydowych w 10 badanych loci metodą MST wykazała, że nowy typ sekwencyjny (ST61) różni się od ST20 delecją jednego nukleotydu na pozycji 420 w locus *Cox37*. Wysokie podobieństwo ST61 do ST20 może jedynie wskazywać na podobne cechy szczepów należących do obu typów sekwencyjnych. Niezwykle istotne, zwłaszcza w kontekście ochrony zdrowia publicznego, jest stwierdzenie w badanych próbkach genotypów oraz typów sekwencyjnych, które zidentyfikowano w innych krajach w materiale pochodzącym od ludzi cierpiących zarówno na ostrą, jak również chroniczną postać gorączki Q. Należy jednak podkreślić, że żaden z badanych szczepów

nie przynależał do tego samego genotypu, co wysoce patogenne szczepy będące przyczyną epidemii choroby w Holandii. Ponadto, genotypy stwierdzone obecnie w Polsce, są inne niż te izolowane w naszym kraju z ognisk choroby w XX wieku.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono trwające 5 tygodni doświadczenie, które miało na celu ocenę możliwości transmisji *C. burnetii* drogą pokarmową. Wykorzystano 15 dorosłych samców kawii domowej pochodzących z chowu własnego PIWet-PIB, a do zakażenia *per os* użyto szczepu referencyjnego *C. burnetii* Nine Mile fazy I. Zwierzęta zostały podzielone na pięć grup: grupę kontrolną oraz cztery grupy badane, o liczebności po 3 osobniki każda. Każde zwierzę z grupy kontrolnej otrzymywało co 48 godzin, 1 ml jałowego roztworu PBS, aplikowanego jałową strzykawką bezpośrednio do jamy ustnej. Z kolei osobnikom należącym do grupy I podano jednokrotnie 1 ml inokulatu zawierającego  $10^2$  komórek *C. burnetii*/ml. Zwierzęta z grupy II otrzymywały inokulat zawierający również  $10^2$  komórek *C. burnetii*/ml, ale podawany *per os* co 48 godz. Kawiom domowym należącym do grupy doświadczalnej III, został w ten sam sposób jednokrotnie podany 1 ml zawiesiny bakteryjnej zawierającej  $10^6$  komórek *C. burnetii*/ml. Zwierzęta z grupy IV otrzymywały po 1 ml inokulatu zawierającego taką samą liczbę komórek bakteryjnych co 48 godzin. Przeprowadzone doświadczenie nie wykluczyło możliwości transmisji patogenu drogą pokarmową. Po podaniu *C. burnetii per os*, u jednego z osobników stwierdzono serokonwersję, natomiast u innego zwierzęcia potwierdzono, metodą real-time PCR, obecność bakterii w tkance jądra, co wskazuje na rozprzestrzenienie zakażenia drogą hematogenną. U większości zwierząt nie wykazano obecności swoistych przeciwciał, ani materiału genetycznego patogenu, można więc domniemywać, że rozwój infekcji jest uzależniony od wielu czynników takich jak status immunologiczny danego zwierzęcia. Wyniki wykonanego doświadczenia, dostępne doniesienia literaturowe, a także wysoki odsetek produktów mlecznych, w których wykryto DNA *C. burnetii* wskazują, że konsumpcja niepasteryzowanego mleka oraz produktów z niego wytworzonych może stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka.

## Summary

Q fever is a zoonotic disease, which has been reported in humans and many animal species worldwide. The etiological agent of this disease is *Coxiella (C.) burnetii*, a highly infectious and contagious bacteria, which is classified as a category B bioterrorism agent. Due to the lack of specific symptoms and commonplace subclinical infections in cattle, the diagnosis needs to be made on the basis of results of appropriate laboratory tests.

The aim of this research was to determine the seroprevalence and prevalence of *C. burnetii* in dairy cattle herds in Poland and to perform molecular characterisation of the field strains using MLVA and MST methods. Serological and/or molecular tests were also performed on commercially available milk samples, including milk from vending machines and dairy products. Moreover, to assess the possibility of transmission of the pathogen *via* alimentary route, an experiment on guinea pigs was conducted.

Serological tests of 2635 bovine serum samples collected from 969 herds detected the presence of anti-*C. burnetii* antibodies in 24,46% of herds. Different types of biological specimens were collected from 15 voivodeships for molecular analyses. Overall, 1439 samples from 279 herds were tested including: 897 individual milk specimens, 101 bulk tank milk samples, 409 swabs from genital tract and 32 placentas. Furthermore, twelve commercially available milk samples, including two from vending machines and 40 milk products were also analysed. The presence of IS1111 element was confirmed by real-time PCR method in 31,54% of tested cattle herds and in 69,2% of milk and dairy products from the Polish market. The results of molecular analyses indicate that animals in tested herds shed *C. burnetii* predominantly in milk.

Additionally, a comparative analysis of the results of ELISA and real-time PCR obtained for individual and bulk tank milk samples was made using the chi-square test. The test showed statistically significant relationship between results of both methods ( $p$ -value < 0,0001) with and without considering doubtful ELISA's results. A Spearman's correlation coefficient between the Ct and OD values was negative and significant for individual and bulk tank milk samples ( $R = -0,49$  and  $R = -0,46$ , respectively).

Molecular characterisation of *C. burnetii* strains using 6-locus multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and multispacer sequence typing (MST) techniques was a crucial aspect of this research. Genotyping was performed directly on DNA extracted from samples, without previous isolation of the strains in cell lines. All MLVA genotypes and MST sequence types identified in this study were verified and added to publicly available

international databases by the administrators. MLVA method had more discriminatory power than MST and seven MLVA genotypes, including two new, were identified in field samples. The most commonly detected was genotype I with the number of STR 6-13-2-7-9-9, which was identified in 25% of tested strains. Genotype J (6-13-2-7-9-10) occurred less often and was present in 16% of samples. Both of this MLVA genotypes are widely distributed and are predominant in samples collected from cattle in many countries, including Poland. Each of two new genotypes was identified only in 2% of tested samples, whereas in some cases mixed infection was observed or determination of genotype was failed due to the lack of amplicons in one or more tested loci. Genotyping of commercially available milk and milk products allowed to identify third new genotype in one sample and genotype I in two of analysed specimens. Clustering of the MLVA data using the minimum spanning tree method depicts a high degree of genetic similarity not only between cattle-derived genotypes from Poland but also from other countries, suggesting the clonal spreading and host specificity of some *C. burnetii* strains. Three sequence types: ST16, ST20 and one newly discovered, named ST61, were identified in field samples using MST technique. In the commercially available milk and milk products only new ST61 was detected. Analyses of nucleotide sequences in 10 loci tested by MST, revealed that new sequence type (ST61) differs from ST20 only in allele 4 of locus *Cox37*, in which a deletion of one nucleotide at position 420 was observed. The fact that some of the genotypes and sequence types identified in this study were previously recognized in samples collected in other countries from humans suffered from both acute and chronic Q fever is essential in context of public health protection. It should be stressed that none of strains analysed in this research present the same genotype as highly pathogenic strains which were responsible for Q fever outbreak in the Netherlands. Moreover, genotypes of *C. burnetii* identified in Poland nowadays are different from genotypes of the outbreak strains isolated in our country in 20<sup>th</sup> century.

In the next phase of research, an experiment using guinea pig infection model was conducted to assess the possibility of transmission of the pathogen *via* alimentary route. Fifteen male guinea pigs (in-house breeding, PIWet-PIB) were divided into 5 groups: negative control and four experimental groups, each consisted of 3 individuals. An appropriate concentrations of the *C. burnetii* reference strain Nine Mile RSA 493 (phase I) suspended in PBS were administered *per os* for 5 weeks. Each animal in control group received 1ml of sterile PBS every 48h. Individuals in the first experimental group obtained a single dose of  $10^2$  *C. burnetii*/ml, the second group received the same amount of bacteria every two days during experiment. The solution containing  $10^6$  *C. burnetii*/ml was given once to animals in the third

group and every 48 hours to animals in the fourth group. The results of conducted experiment did not exclude the possibility of infection by alimentary route. After *per os* administration of the pathogen, one guinea pig developed seroconversion and the presence of *C. burnetii* DNA was detected using real-time PCR in testicular tissue of the other animal, what indicates that infection spread out hematogenously. In the majority of experimental animals a specific antibodies as well as genetic material of pathogen were not detected. This fact suggests that development of infection depends on many factors such as animal immune status. The results of conducted experiment, literature reports as well as high percentage of dairy products contaminated with bacterial DNA, indicate that consumption of raw milk and milk products may pose a potential threat for human's health.