

# **Analiza struktury genetycznej nicieni z rodzaju *Trichinella* występujących w Polsce i jej zastosowanie w dochodzeniach epidemiologicznych**

## **STRESZCZENIE**

Włośnica – choroba wywoływana przez nicienie z rodzaju *Trichinella*, wciąż stanowi problem epidemiologiczny, zarówno w Polsce, jak i w innych krajach w Europie i na świecie. Pomimo stosowania przepisów dotyczących badania poubojowego, co roku rejestruje się nowe przypadki tej zoonozy u ludzi. W przypadku wystąpienia tej choroby u ludzi jak też stwierdzenia pasożyta u trzody chlewnej w gospodarstwie, istnieje wymóg prowadzenia dochodzeń epidemiologicznych. Celem tych działań jest m.in. wykrycie i eliminacja źródła inwazji. Działania takie są jednak niełatwe. Dużą pomocą w tym zakresie mogłyby być badania laboratoryjne, które poprzez analizę podobieństwa genetycznego subpopulacji pasożytów występujących w ognisku włośnicy do subpopulacji pasożytów stwierdzanych u innych żywicieli na danym obszarze mogłyby potwierdzać lub wykluczać ich rolę, jako źródła inwazji.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest określenie możliwości zastosowania badań molekularnych, jako narzędzia wspomagającego dochodzenia epidemiologiczne w ogniskach włośnicy. Aby osiągnąć założony cel prace podzielono na trzy etapy. W pierwszym, przeprowadzono badania dotyczące rozprzestrzenienia włośni w populacji dzików, trzody chlewnej, lisów i szczurów. W drugim scharakteryzowano molekularnie wybrane subpopulacje włośni na podstawie analizy fragmentów genów 5s rDNA i COX1 oraz dokonano określenia zmienności genetycznej, zróżnicowania i struktury genetycznej populacji *T. spiralis* i *T. britovi* na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnego DNA. W trzecim etapie podjęto próbę zastosowania powyższych analiz w dochodzeniu epidemiologicznym w ognisku włośnicy trzody chlewnej.

Wykazano, że o ile w przypadku świń odsetek zwierząt zarażonych włośniami jest niski (śr. EI = 0,0001724), to w środowisku sylwatyicznym inwazja ta spotykana jest stosunkowo często. U dzików, uważanych obecnie za główne źródło zarażenia dla ludzi, ekstensywność inwazji wyniosła 0,34%, a u lisów 4,08%. Stwierdzono także wysoką ekstensywność inwazji

u szczurów pozyskanych z ognisk włośnicy u świń, co wskazuje na duże znaczenie tego gatunku, jako wektora włośnicy. Średnia intensywność inwazji była na ogół niska i wahała się od 2,3 lpg (lisy) do 11,48 lpg (dziki). Dominującym gatunkiem włośni u badanych zwierząt był *T. spiralis* i jedynie u lisów przeważały inwazje *T. britovi*. U dzików i lisów stwierdzano również inwazje mieszane *T. spiralis/T. britovi*. Pozostałe gatunki włośni (*T. pseudospiralis* i *T. nativa*) spotykane były jedynie sporadycznie.

W wyniku przeprowadzonej analizy uzyskanych w doświadczeniu sekwencji 5s rDNA oraz COX1 zaobserwowano występowanie w populacji *T. spiralis* w obu analizowanych fragmentach DNA tylko 3 mutacji punktowych, podczas gdy w populacji *T. britovi* aż 41 pojedynczych polimorfizmów nukleotydów. Ponadto, na podstawie analizy obu fragmentów genów stwierdzono wystąpienie larw będącymi hybrydami międzygatunkowymi *T. spiralis* i *T. britovi*.

Na podstawie analizy msDNA również stwierdzono znacznie większą zmienność genetyczną w populacji larw z gatunku *T. britovi* niż *T. spiralis*. Wyniki kalkulacji współczynnika zróżnicowania genetycznego  $F_{st}$  wskazały w obu przypadkach na możliwość odróżniania subpopulacji larw tego samego gatunku pochodzących od różnych żywicieli.

W ostatnim etapie uzyskane wyniki wykorzystano w analizie ogniska włośnicy. Analizy sekwencji fragmentów genów 5s rDNA oraz COX1 wskazują na identyczność larw pozyskanych z ogniska włośnicy względem siebie, ale także względem większości larw z innych subpopulacji spoza ogniska. Zastosowanie wyników analizy msDNA okazało się znacznie bardziej przydatne i pozwoliło na wyodrębnienie i odróżnienie izolatów larw pochodzących z ogniska włośnicy od pozostałych subpopulacji *T. spiralis* poddanych analizie w niniejszej pracy.

Uzyskane podczas pracy wyniki badań wskazują, że zastosowanie badań genetycznych, szczególnie analiz msDNA, daje nadzieję na wykorzystanie tej techniki w dochodzeniach epidemiologicznych w ogniskach włośnicy, co ułatwi walkę z tą pasożytniczą.

## ABSTRACT

Trichinellosis, zoonosis caused by *Trichinella* nematodes, is an epidemiological problem in Poland and throughout other countries in Europe and the rest of the world. Despite regulatory controls, new cases of this zoonosis are registered every year in humans. In addition to the detection of the disease in humans, finding the parasite in farmed pigs requires that epidemiological investigations be instigated. The purpose of these activities is the detection and elimination of the source of infection. However, such activities are difficult. Laboratory analysis regarding the genetic similarity of the individual subpopulation of *Trichinella* species detected in outbreak of infection to subpopulations of *Trichinella* spp. found in other hosts on an examined area could be useful in epidemiological investigation and confirm or exclude their role as a source of invasion.

The aim of the present study is to determine the possibility of using molecular techniques as a tool to support epidemiological investigations in *Trichinella* outbreaks. To achieve this goal, the work was divided into three stages. In the first stage, the prevalence of *Trichinella* spp. in the population of domestic pigs, wild boars, red foxes and rats were assessed. In the second stage, selected *Trichinella* subpopulations based on 5s rDNA and COX1 gene fragments were characterized molecularly, and the genetic variability, diversity and genetic structure of *T. spiralis* and *T. britovi* subpopulations based on the analysis of microsatellite DNA were determined. In the third stage, to check the usefulness of the molecular approach developed, it was applied to epidemiological investigation of a *Trichinella* outbreak in pigs.

The results of the present study indicated on the low proportion of pigs infected with *Trichinella* spp. (mean EI = 0.0001724), and relatively more frequent *Trichinella* infection in animals living in sylvatic environment. In wild boars, currently considered the main source of infection for humans, the extensity of invasion was 0.34%, and in foxes 4.08%. High extensity of invasion was also found in rats obtained from the area of *Trichinella* outbreaks, which indicates the importance of this species as a vector of the parasite. The average intensity of invasion in all examined species of animals was generally low and ranged from 2.3 lpg (foxes) to 11.48 lpg (wild boars). The dominant species in the sampled animals was *T. spiralis*, while *T. britovi* prevailed only in red foxes. Mixed invasions *T. spiralis* / *T. britovi* in wild boars and red foxes were also found. The other *Trichinella* species (*T. pseudospiralis* and *T. nativa*) were found only sporadically.

The analysis of the 5s rDNA and COX1 sequences obtained in the present study revealed the occurrence of only 3 SNPs in the *T. spiralis* population and 41 SNPs in the *T. britovi* population in both analyzed DNA fragments. Furthermore, on the basis of these analyses, interspecific hybrids of *T. spiralis* and *T. britovi* were found. The msDNA analysis, indicated that genetic variability in the *T. britovi* population was significantly higher than in the *T. spiralis* population. In addition, the calculated  $F_{st}$  genetic diversity coefficient indicated the possibility of distinct subpopulations of larvae of given species extracted from different hosts for both *T. spiralis* and *T. britovi* populations.

In the final stage of the study, the initial results were used in the analysis of a *Trichinella spiralis* outbreak. Sequence analyses of the 5s rDNA and COX1 gene fragments indicated the lack of genetic differences between larvae from outbreak and majority of larvae from other subpopulations outside the outbreak. The application of the results of the msDNA analysis proved to be much more useful and enabled larval isolates from the *Trichinella* outbreak to be distinguished from the remaining subpopulations of *T. spiralis* analyzed in this work.

In conclusion, these findings indicate that the use of molecular analysis, especially the analysis of msDNA, may provide a useful tool in epidemiological investigations of *Trichinella* outbreaks and will facilitate the control of this parasite.