

Streszczenie

Charakterystyka molekularna i ekologiczna Anaplasmataceae występujących w populacjach dziko żyjących gryzoni

Gryzonie pełnią rolę żywicieli lub rezerwuaru dla wielu różnych patogenów i mogą uczestniczyć w ich transmisji. Te drobne ssaki, w wielu miejscach, żyją w bliskim sąsiedztwie ludzi i zwierząt domowych czy gospodarskich, mogą narażać człowieka na zoonozy występujące w środowisku naturalnym. W ostatnim czasie obserwuje się, że liczba zachorowań ludzi na choroby związane z tymi zwierzętami (ang. rodent-borne diseases) rośnie, ale są one nadal słabo poznane.

Rodzina Anaplasmataceae obejmuje Gram-ujemne, obligatoryjnie wewnątrzkomórkowe bakterie, a w jej skład wchodzi między innymi rodzaje *Anaplasma* oraz „*Candidatus Neoehrlichia*”. W Europie bakterie *Anaplasma phagocytophilum* są przenoszone przez *Ixodes ricinus*, natomiast przypuszcza się, że rezerwuarami patogenu są jeleniowate, a rola gryzoni jest nie do końca jasna. Mikroorganizmy *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* opisano w 2004 r., są one przenoszone przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*, a funkcję rezerwuwarową pełnią drobne ssaki.

Celem pracy było ustalenie roli dziko żyjących gryzoni w utrzymywaniu w środowisku naturalnym i podmiejskim wybranych terenów województwa dolnośląskiego patogenów *A. phagocytophilum* i *Candidatus N. mikurensis*, porównanie skuteczności wykrywania DNA bakterii w próbkach ze śledzion i krwi zwierząt oraz przetestowanie różnych fragmentów genów jako markerów do detekcji mikroorganizmów z rodziny Anaplasmataceae. Praca miała również na celu określenie współwystępowania innych patogenów u analizowanych drobnych ssaków.

W 2013 roku odłowiono 161 osobników dziko żyjących gryzoni, a w 2014 roku 193 osobniki. Zwierzęta należały do trzech gatunków: *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis* oraz *Myodes glareolus* i pochodziły z czterech stanowisk położonych na Dolnym Śląsku: rezerwatu „Stawy Milickie”, otuliny Ślęzańskiego Parku Krajobrazowego, Mokrego Dworu oraz Wrocławia – Osobowic. Łącznie zbadano 276 próbek krwi gryzoni oraz 354 próbki śledzion.

Według obecnego stanu wiedzy, po raz pierwszy na terenie Polski, wykazano występowanie *A. phagocytophilum* u *A. agrarius*, *A. flavicollis* i *M. glareolus*, jednak rola gryzoni jako rezerwuarów tych patogenów na badanym terenie południowo-zachodniej Polski

jest prawdopodobnie mało istotna, a zwierzęta te mogą stanowić żywicieli przypadkowych. Również po raz pierwszy w Polsce, według obecnej wiedzy, stwierdzono występowanie z wysoką prewalencją (około 30.0%) *Candidatus N. mikurensis* u dziko żyjących gryzoni i potwierdzono rezerwuarną rolę drobnych ssaków dla tego patogenu na obszarze Dolnego Śląska. Metody PCR ze starterami 16SANA-F, 16SANA-R dla fragmentu genu 16S rRNA oraz ze starterami HS1a, HS6a, HS43, HSVR dla fragmentu operonu *groESL* okazały się być specyficzne dla rodziny Anaplasmataceae, a nie dla rodzaju *Anaplasma*, ponieważ przy ich użyciu identyfikowano zarówno *A. phagocytophilum* jak i *Candidatus N. mikurensis*. Również po raz pierwszy w Polsce, według obecnej wiedzy, udało się potwierdzić obecność *B. miyamotoi* u wszystkich badanych gatunków zwierząt (12.5%), natomiast *B. afzelii* wykryto u 9.0% gryzoni. Po raz pierwszy w Polsce, stwierdzono u dziko żyjących gryzoni bakterie z rodzaju *Rickettsia*. Natomiast patogeny *C. burnetii* wykryto w jednej próbce pozyskanej z krwi *A. agrarius* odłowionego z terenu otuliny Ślęzańskiego Parku Krajobrazowego. Koinfekcje odnotowano u 10.4% gryzoni odłowionych w 2014 r., w większej liczbie próbek krwi niż śledzion, najczęściej występowały *Candidatus N. mikurensis* wraz z *B. burgdorferi* s.l. lub *B. miyamotoi*. Próbki krwi okazały się być lepszym materiałem do badań mających na celu wykrycie *B. miyamotoi*, *Rickettsia* spp. i *C. burnetii*.

Wykrycie w badaniach własnych u dziko żyjących gryzoni z terenu Dolnego Śląska, patogenów *A. phagocytophilum*, *Candidatus N. mikurensis*, *B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, *Rickettsia* spp. oraz *C. burnetii* jest ważne z epidemiologicznego punktu widzenia.

18.10.2018 rok
Ewa Gajda

Summary

Molecular and ecological characteristics of Anaplasmataceae occurring in populations of wild rodents

Rodents act as hosts or reservoirs for many different pathogens and can participate in their transmission. These small mammals, in many places, live in close proximity to people and pets or farm animals, may expose humans to zoonoses occurring in the natural environment. Recently, it has been observed that the number of people suffering from diseases associated with these animals (rodent-borne diseases) is increasing, but they are still poorly understood.

The Anaplasmataceae family includes Gram-negative, obligatory intracellular bacteria, and includes, among others, the genera *Anaplasma* and "*Candidatus Neohrlichia*". In Europe, the bacteria *Anaplasma phagocytophilum* are transmitted by *Ixodes ricinus*, while it is presumed that the reservoirs of the pathogen are cervical, and the role of rodents is not entirely clear. The microorganisms *Candidatus Neohrlichia mikurensis* were described in 2004, they are transmitted by ticks from the genus *Ixodes*, and the reservoir function is performed by small mammals.

The aim of the work was to determine the role of wild rodents in maintaining in the natural and suburban environment selected areas of the Lower Silesian pathogens *A. phagocytophilum* and *Candidatus N. mikurensis*, comparing the effectiveness of detecting bacterial DNA in spleen and animal blood samples and testing various gene fragments as markers for detection of microorganisms from the Anaplasmataceae family. The work was also aimed at determining the co-occurrence of other pathogens in the analysed small mammals.

In 2013, 161 specimens of wild rodents were caught, and in 2014, 193 individuals. The animals belonged to three species: *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis* and *Myodes glareolus* and came from four sites located in Lower Silesia: the "Stawy Milickie" reserve, the lagging of the Ślęzański Landscape Park, Mokry Dwór and Wrocław – Osobowice. A total of 276 rodent blood samples and 354 spleen samples were tested.

According to the current state of knowledge, the presence of *A. phagocytophilum* in *A. agrarius*, *A. flavicollis* and *M. glareolus* has been demonstrated for the first time in Poland, however, the role of rodents as reservoirs of these pathogens in the studied area of south-western Poland is probably of little relevance, and these animals may be accidental hosts. Also, for the first time in Poland, according to current knowledge, *Candidatus N. mikurensis* was found with high prevalence (about 30.0%) in wild rodents and the reservoir role of small mammals for this

pathogen in Lower Silesia was confirmed. The PCR methods with the 16SANA-F, 16SANA-R primers for the 16S rRNA gene fragment and the HS1a, HS6a, HS43, HSVR primers for the *groESL* operon fragment proved to be specific to the Anaplasmataceae family, and not to the *Anaplasma* genus, as they were used to identify both *A. phagocytophilum* and *Candidatus N. mikurensis*. Also for the first time in Poland, according to current knowledge, it was possible to confirm the presence of *B. miyamotoi* in all tested animal species (12.5%), while *B. afzelii* was detected in 9.0% of rodents. For the first time in Poland, bacteria of the genus *Rickettsia* were found in wild rodents. *C. burnetii* pathogens were detected in one sample obtained from blood of *A. agrarius* captured from the area of Ślezański Landscape Park. Co-infections were recorded in 10.4% of rodents caught in 2014, in a larger number of blood samples than spleens, the most common were *Candidatus N. mikurensis* along with *B. burgdorferi* s.l. or *B. miyamotoi*. Blood samples proved to be a better test material for the detection of *B. miyamotoi*, *Rickettsia* spp. and *C. burnetii*.

The detection in wild rodents from Lower Silesia, pathogens *A. phagocytophilum*, *Candidatus N. mikurensis*, *B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, *Rickettsia* spp. and *C. burnetii* is important from an epidemiological point of view.

18.10.2018 rok
Ewa Gajda