

# ***Coxiella burnetii* DNS IZDALĪŠANĀS PIENĀ UN ANTIGĒNA FĀZES SPECIFISKĀ IMŪNATBILDE SERUMĀ SLAUCAMO GOVJU GANĀMPULKOS LATVIJĀ**

## **SHEDDING OF *Coxiella burnetii* DNA IN MILK AND ANTIGEN PHASE-SPECIFIC SEROLOGICAL RESPONSE IN DAIRY HERDS IN LATVIA**

**Guna Ringa-Karahona<sup>1</sup>, Vita Antāne<sup>1</sup>, Lelde Grantiņa-Ieviņa<sup>2</sup>, Žanete Šteingolde<sup>2</sup>, Jūlija Trofimova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija; Faculty of Veterinary Medicine, LLU, Latvia

<sup>2</sup> Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts BIOR, Latvija; Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR, Latvia

[guna.ringavet@gmail.com](mailto:guna.ringavet@gmail.com)

### **ABSTRACT.**

*Coxiella (C.) burnetii* – the causative agent of Q fever – can be shedded by milk and is presented in 2 phases of antigen (PhI, PhII). The aim of this study was to detect shedding of *C. burnetii* DNA in milk and phase-specific serological response in dairy herds with previous history of infection. The study involved 5 dairy farms in different parishes in Latvia with previous history of *C. burnetii* DNA in aborted fetuses. Serum and milk samples were collected from aborted cows and randomly selected other ones in different ages, and serum samples from randomly selected heifers. Milk samples were tested by detection of *Coxiella burnetii* by real-time enzymatic DNA amplification using „ADIAVET™ COX REALTIME” (ADIAGENE). Sera were tested by „VetLine Coxiella Phase1 and Phase2 ELISA” (NOVATEC). Among 46 serum samples 6 (13%) were positive and 3 (7%) were in „grey zone” to *C. burnetii* PhaseI antigen (respectively PhI<sup>+</sup>, PhI<sup>+/-</sup>). None of heifers had serological response. Among 34 milk samples 3 (9%) cows were shedding *C. burnetii* DNA (DNA<sup>+</sup>). Out of 6 PhI<sup>+</sup> and 3 PhI<sup>+/-</sup> cows 1 and 1 were DNA<sup>+</sup>. PhI<sup>+/-</sup> and PhI<sup>+</sup> cows were 2-5 times more than DNA<sup>+</sup> cows. In dairy herds with previous history of *C. burnetii* can be redetected at least one evidence about infection excluding serological response to PhII. Serological response to PhI is present only in milking cows, it increases by animals' age. Aborted cows with previous history of *C. burnetii* DNA can be seronegative and no milk shedders. Seropositive animals can be several times more than shedders. Research will be continued.

**KEY WORDS:** *Coxiella burnetii*, dairy cows, shedding, Phase I, Phase II

### **IEVADS**

*Coxiella burnetii* ir mazas, Gram-negatīvas baktērijas, kas ierosina Q drudzi – pasaulē plaši izplatītu zoonozi. *Coxiella burnetii* ir obligāti intracelulārs patogēns. Izšķir divas *C. burnetii* attīstības stadijas – mazo šūnu variantu (*small cell variant* – angl.) un lielo šūnu variantu (*large cell variant* – angl.). Lielo šūnu variants ir metaboliski aktīva baktēriju intracelulārā forma, tai raksturīga sporogēna diferencēšanās, kā rezultātā veidojas izturīgas baktēriju sporu formas, kuras tālāk attīstās par metaboliski neaktīvo mazo šūnu variantu, kas ir baktēriju ekstracelulārā forma. Tās no inficētās saimniekšūnas tiek atbrīvotas un nonāk ārvidē, tām piemīt augsta izturība pret dažādiem nelabvēlīgiem vides apstākļiem un augsta virulence (Babudieri, 1959; Maurin et al., 1999).

Inficēšanās gan dzīvniekiem, gan cilvēkiem galvenokārt notiek caur elpceļiem, ieelpojot ierosinātāju, kas nonācis ārvidē ar inficēta dzīvnieka ķermeņa sekrētiem un ekskretiem. Tiem

izzūstot, *C.burnetii* putekļu daļiņu veidā viegli izplatās, saglabājot augstu virulenci (Babudieri, 1959; Maurin et al., 1999). Dzīvnieki savstarpēji inficējas, dzīvojot ciešā kontaktā (Angelakis and Raoult 2010). Ierosinātāja klātbūtne konstatēta *C.burnetii* seropozitīvu bullu spermā, kas pieļauj arī seksuālas transmisijas iespēju (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanska, 1997), taču citi dzīvnieku un cilvēku inficēšanās veidi aprakstīti kā mazāk nozīmīgi (Babudieri, 1959).

Galvenie *C.burnetii* infekcijas rezervuāri, no kuriem cilvēki uzņem ierosinātāju, ir lauksaimniecības dzīvnieki – govīs, kazas un aitas. (Angelakis and Raoult 2010) Cilvēku vidū infekcijas riskam vairāk pakļautas lopkopībā iesaistītās personas, kautuvju un laboratoriju darbinieki (Babudieri, 1959).

Q drudzis govīm parasti noris subklīniski, atsevišķos gadījumos infekcijas pirmajās dienās sastop pašlimitējošu drudzi. (Agerholm, 2013). Cilvēki ir vienīgie *C.burnetii* saimniekorganismi, kuriem slimība regulāri izpaužas klīniski (Babudieri, 1959).

Q drudzis gan dzīvniekiem, gan cilvēkiem var noritēt akūtā vai hroniskā formā. Tā kā slimība nereti noris asimptomātiski, aizdomu gadījumā par saslimšanu ar Q drudzi slimības formu viegli diferencēt pēc ierosinātāja fāzes specifisko antivielu klātbūtnes. Izdala I un II fāzes *C.burnetii* antigēnus (turpmāk tekstā attiecīgi PhI un PhII), kas atšķiras pēc šūnas virsmas lipopolisaharīdu īpašībām. (Maurin et al., 1999) PhI antigēnam piemīt augstāka inficējamība kā PhII antigēnam, taču, pateicoties šūnas sienas īpašībām, tās ir ilgāk pasargātas no organisma imūnreakcijas (Fournier et al., 1998).

Akūtas Q drudža infekcijas gadījumā dominē pret PhII specifiskas antivielas (IgM, IgG). PhII specifiskās IgM antivielas ir nosakāmas 7-15 dienu laikā pēc klīnisko pazīmju parādīšanās, maksimālo titru sasniedz 4-8 nedēļās un nosakāmas saglabājas 10-12 nedēļas (Angelakis and Raoult 2010) līdz 17 nedēļām, pakāpeniski samazinoties 12 mēnešu laikā (Fournier et al., 1998). PhII specifiskās IgG antivielas augstāko titru sasniedz 8 nedēļas pēc slimības pazīmju novērošanas, tās organismā var persistēt gadiem. Hroniskas Q drudža infekcijas gadījumā sastop pret PhI specifiskas antivielas (IgG, IgA), to titrs pat gadu pēc inficēšanās nav tik augsts kā PhII antivielām. Hroniskas infekcijas gadījumā pie persistējošas *C.burnetii* klātbūtnes var būt augsts gan PhI, gan PhII antivielu titrs. PhI IgA antivielu klātbūtne parasti norāda uz hronisku infekciju (Angelakis and Raoult, 2010; Fournier et al., 1998). Kaut arī seroloģiskie izmeklējumi ļauj atklāt dzīvniekus, kam bijusi saskare ar ierosinātāju, tie neatklāj dzīvniekus, kuri ierosinātāju izdala ārvidē. *C.burnetii* DNS noteikšana bioloģiskajos materiālos (pienā, maksts gļotās, fēcēs) ļauj identificēt dzīvniekus, kuri ierosinātāju aktīvi izdala un tādējādi ir potenciālie infekcijas izplatītāji ganāmpulkā (Guatteo et al., 2006). Pienā *C.burnetii* DNS klātbūtni iespējams noteikt līdz 32 mēnešiem pēc atnešanās (Barberio et al. 2014), turklāt tā var būt gan pastāvīga, gan sporādiska (Guatteo et al., 2007).

Pētījuma mērķis ir noteikt *C.burnetii* DNS klātbūtni pienā un *C.burnetii* antigēna fāzes specifisko imūnatbildi serumā ganāmpulkos, kuru laboratorisko izmeklējumu vēsturē ir iepriekšējas ziņas par *C.burnetii* infekciju.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Izmeklējamie materiāli ievākti 5 slaucamo govju ganāmpulkos dažādos Latvijas pagastos. Ganāmpulku izvēlē noteicošais faktors – *C.burnetii* DNS klātbūtne abortēto augļu paraugos, kas saskaņā ar Dzīvnieku infekcijas slimību valsts uzraudzības plānu iesūtīti aborta cēloņa noskaidrošanai 2017.gadā. Dati par slaucamo govju skaitu pētījumā iekļautajos ganāmpulkos uz 01.01.2017. un izslaukumu 2016.gadā ([www.ldc.gov.lv](http://www.ldc.gov.lv)) apkopoti 1.tabulā.

**Slaucamo govju skaits pētījumā iekļautajos ganāmpulkos un izslaukums**  
**Number of milking cows in herds included in research and milk yield**

Ganāmpulks	Slaucamo govju skaits	Izslaukums, kg/gadā
A	75	6900
B	161	8445
C	384	8463
D	610	7477
E	615	11050

Pētījumā izmeklēti abortējušo dzīvnieku (n=5), nejauši izvēlētu pirmpieņu (n=14), vairāku laktāciju govju (n=15) piena un asins seruma paraugi un grūsnu teļu (n=12) asins seruma paraugi. Kopā izmeklēti 34 piena un 46 seruma paraugi (skatīt 2.tabulu).

**Izmeklējamo paraugu skaits**  
**Number of samples tested**

Ganāmpulks	Piens + serums			Serums
	Abortējusi	Pirmpiene	Vairākas laktācijas	Grūsna tele
A	1	3	3	3
B	1	3	3	3
C	1	3	3	3
D	1	3	3	3
E	1	2	3	0
<b>Kopā:</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>12</b>

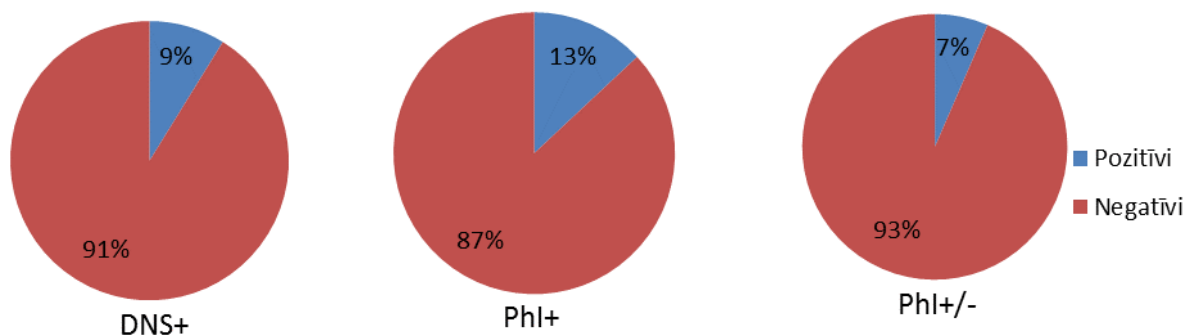
Izmeklējamie paraugi ievākti 2017.gada jūlijā un augustā. Piena paraugi ievākti sterilos plastikāta konteineros pa 20 ml no četriem tesmeņa ceturkšņiem. Pirms parauga ievākšanas veikta pupu galu tīrīšana vispirms ar sausu, pēc tam ar 70% etanolā samitrinātu auduma salveti un pirmo strūklu atslaukšana. Asins paraugi ievākti no astes vēnas sterilos vakutaineros ar recēšanas aktivatoru. Pirms parauga ievākšanas astes āda punkcijas apvidū attīrīta ar 70% etanolā samitrinātu auduma salveti. Pēc ievākšanas piena un asins paraugi nekavējoties atdzesēti līdz +4 °C. Pēc atdzesēšanas 2 – 6 stundu laikā piena paraugi sasaldēti -16°C. Asins paraugiem 24 stundu laikā pēc ievākšanas veikta seruma atpipetēšana, serums sasaldēts -16 °C. Piena un seruma paraugi līdz izmeklēšanai uzglabāti sasaldēti -16 °C. Paraugu izmeklēšana veikta 2017.gada augustā un septembrī.

Piena paraugos *C.burnetii* DNS klātbūtne noteikta molekulārbioloģiski ar reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju, lietojot „ADIAVET™ COX REALTIME” (ADIAGENE) komplektu. Rezultātu interpretācija ļauj konstatēt *C.burnetii* DNS pozitīvus un negatīvus paraugus, kā arī pozitīvajiem paraugiem kvantificēt *C.burnetii* mobilā elementa IS1111 kopiju skaitu 1 ml piena.

Seroloģiski dzīvnieku imūnatbilde uz *C.burnetii* antigēna fāzi noteikta ar ELISA metodi, lietojot „VetLine Coxiella Phase 1 ELISA” un „VetLine Coxiella Phase 2 ELISA” (NOVATEC) komplektus. Rezultātu interpretācija ļauj konstatēt pozitīvus, aizdomīgus un negatīvus paraugus.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

*C.burnetii* DNS klātbūtnes pienā un *C.burnetii* antigēna fāzes specifiskās imūnatbildes serumā rezultātu apkopojums parādīts 1.attēlā.



1.attēls. Piena un seruma izmeklējumumu rezultātu apkopojums  
Figure 1. Summary of results of milk and serum samples

Attēlā redzams, ka 3 (9%) no 34 izmeklētajiem piena paraugiem konstatēta *C.burnetii* DNS klātbūtne (turpmāk tekstā DNS<sup>+</sup>). 6 (13%) no 46 izmeklētajiem seruma paraugiem konstatēta pret *C.burnetii* PhI pozitīva imūnatbilde (turpmāk tekstā PhI<sup>+</sup>) un 3 (7%) paraugos aizdomīga imūnatbilde (turpmāk tekstā PhI<sup>+/-</sup>). *C.burnetii* PhII antivielu klātbūtne, neraugoties uz PhI<sup>+</sup> un PhI<sup>+/-</sup> atradumiem, nevienā no izmeklētajiem seruma paraugiem nav konstatēta. Šāds rezultāts (PhI<sup>+</sup>/PhII<sup>-</sup>) ir reti sastopams, tas var attīstīties no PhI<sup>+</sup>/PhII<sup>+</sup>, norādīt uz persistējošu infekciju vai vēlāk kļūt negatīvs (Böttcher et al. 2011).

Rezultāti ganāmpulka līmenī par *C.burnetii* DNS klātbūtni pienā un PhI imūnatbildi serumā apkopoti un parādīti 3.tabulā.

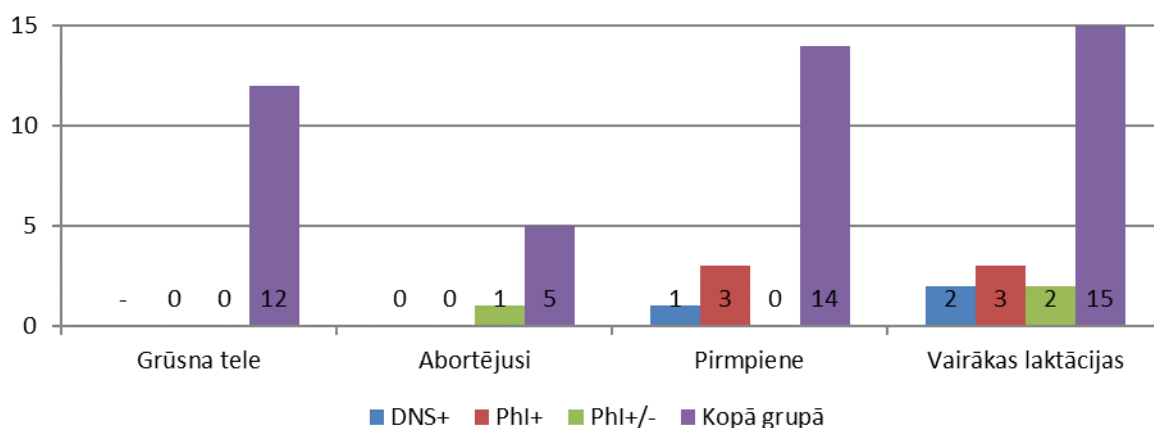
3.tabula / Table 3

***C.burnetii* DNS pienā un PhI imūnatbilde serumā ganāmpulkos**  
**Shedding of *C.burnetii* DNA in milk and serological response to PhI in herds**

Ganāmpulks	<i>C.burnetii</i> DNS pienā	PhI <sup>+</sup>	PhI <sup>+/-</sup>
A	-	-	+
B	-	+	-
C	+	-	+
D	+	+	-
E	-	+	+

Tabulā redzams, ka DNS<sup>+</sup> konstatēts 2 (40%) no pētījumā iekļautajiem ganāmpulkos. PhI<sup>+</sup> imūnatbilde konstatēta 3 (60%) ganāmpulkos. PhI<sup>+/-</sup> imūnatbilde konstatēta 3 (60%) ganāmpulkos. Turklāt katrā no pētījumā iekļautajiem ganāmpulkos konstatēts vismaz viens vai divi no noteiktajiem rādītājiem – DNS<sup>+</sup>, PhI<sup>+</sup> vai PhI<sup>+/-</sup>, kas liecina par infekcijas esošu / bijušu klātbūtni ganāmpulkā.

Rezultāti dzīvnieku grupu līmenī par *C.burnetii* DNS klātbūtni pienā un PhI imūnatbildi serumā apkopoti un parādīti 2.attēlā.

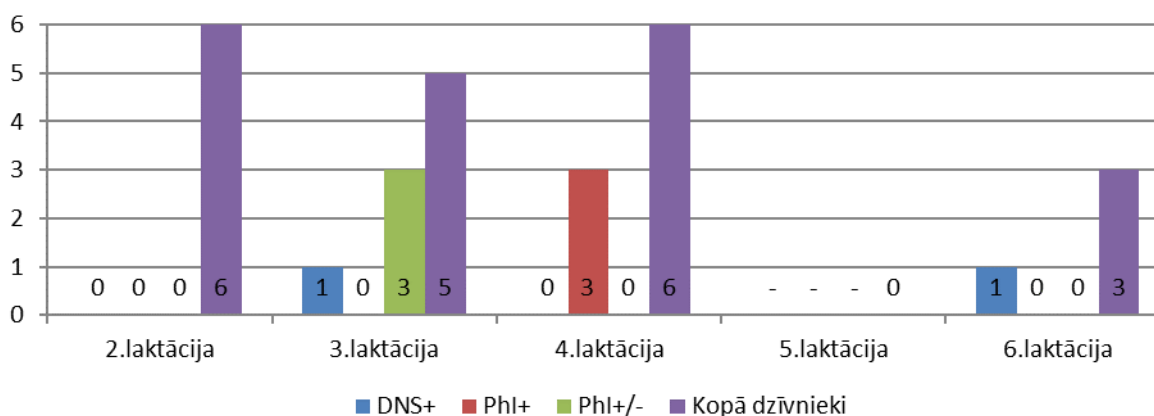


2.attēls. *C.burnetii* DNS klātbūtne pienā un PhI imūnatbilde serumā dažādās dzīvnieku grupās

Figure 2. Shedding of *C.burnetii* DNA in milk and serological response to PhI in different groups of animals

Attēlā redzams, ka grūsno teļu grupā imūnatbilde serumā nevienam no dzīvniekiem nav konstatēta. Abortējušo govju grupā PhI<sup>+/-</sup> imūnatbilde konstatēta 1 (20%) dzīvniekam. Pirmpienu grupā DNS<sup>+</sup> konstatēts 1 (7%) un PhI<sup>+</sup> imūnatbilde 3 (21%) dzīvniekiem. Vairāku laktāciju govju grupā DNS<sup>+</sup> konstatēts 2 (13%), PhI<sup>+</sup> imūnatbilde 3 (20%) un PhI<sup>+/-</sup> imūnatbilde 2 (13%) dzīvniekiem.

Vairāku laktāciju govju izmeklējumumu rezultāti detalizētāk parādīti 3.attēlā.



3.attēls. *C.burnetii* DNS klātbūtne pienā un PhI imūnatbilde vairāku laktāciju govīm

Figure 3. Shedding of *C.burnetii* DNA in milk and serological response to PhI in multiple lactations

Attēlā redzams, ka nevienai no 2.laktācijas govīm nav konstatēts nedz DNS<sup>+</sup>, nedz PhI imūnatbilde. 3.laktācijas govīm DNS<sup>+</sup> konstatēts 1 (20%) un PhI<sup>+/-</sup> imūnatbilde 3 (60%) dzīvniekiem. 4.laktācijas govīm PhI<sup>+</sup> imūnatbilde konstatēta 3 (50%) dzīvniekiem. 5.laktācijas dzīvnieki pētījumā nav iekļuvuši. 6.laktācijā DNS<sup>+</sup> konstatēts 1 (33%), turklāt seronegatīvam dzīvniekam.

Analizējot iepriekšminēto, konstatēts, ka, pieaugot dzīvnieku vecumam, procentuāli pieaug PhI<sup>+</sup> imūnatbildes sastopamība (pirmpienēm 21%, 4.laktācijas dzīvniekiem 50%), kas saskan ar citu autoru (Böttcher et al., 2011) rezultātiem. Papildus konstatēts, ka, pieaugot

dzīvnieku vecumam, sastop arī PhI<sup>+/-</sup> imūnatbildi (3.laktācijas dzīvniekiem 60%). Jāatzīmē, ka pētījumā tika konstatēts DNS<sup>+</sup> seronegatīvam dzīvniekam, kas saskan ar citu autoru (Barberio et al., 2014) rezultātiem.

Vērtēta arī PhI imūnatbildes serumā sakritība ar *C.burnetii* DNS klātbūtni pienā (attiecīgi PhI<sup>+</sup>/DNS<sup>+</sup>, PhI<sup>+</sup>/DNS<sup>-</sup> un PhI<sup>+/-</sup>/DNS<sup>+</sup>, PhI<sup>+/-</sup>/DNS<sup>-</sup>), rezultāti apkopoti un parādīti 4.tabulā.

4.tabula / Table 4

**PhI imūnatbildes serumā sakritība ar *C.burnetii* DNS izdalīšanos pienā**  
**The relation between serological response to PhI and shedding of *C.burnetii* DNA in milk**

PhI imūnatbilde serumā, dzīvnieku skaits	PhI <sup>+</sup> 6		PhI <sup>+/-</sup> 3	
	DNS <sup>+</sup> 1	DNS <sup>-</sup> 5	DNS <sup>+</sup> 1	DNS <sup>-</sup> 2
<i>C.burnetii</i> DNS pienā, dzīvnieku skaits				

Tabulā redzams, ka PhI<sup>+</sup>/DNS<sup>+</sup> ir 1 dzīvnieks. PhI<sup>+</sup>/DNS<sup>-</sup> kopā 5 dzīvnieki. PhI<sup>+/-</sup>/DNS<sup>+</sup> ir 1 dzīvnieks, PhI<sup>+/-</sup>/DNS<sup>-</sup> kopā 2 dzīvnieki.

Iegūtie rezultāti parāda, ka *C.burnetii* skartā ganāmpulkā dzīvnieku, kas izdala ierosinātāju ar pienu, var būt 2-5 reizes mazāk kā seroloģiski aizdomīgo vai seropozitīvo dzīvnieku. Iegūtie rezultāti saskan ar citu autoru (Barberio et al., 2014) rezultātiem. Vērtējot dzīvnieka spēju izdalīt ierosinātāju ārvidē, nevajadzētu balstīties tikai uz *C.burnetii* klātbūtnes pienā rezultātiem, jo piens nav dominējošais *C.burnetii* izdalīšanās ceļš no inficēta dzīvnieka, tie ir arī izdalījumi no maksts, fēces (Guatteo et al., 2006), kā arī placenta un abortēts auglis (Maurin et al. 1999). Izdalīšanās ar pienu turklāt var būt gan pastāvīga, gan sporādiska, neatkarīgi no paraugu ievākšanas laika (Guatteo et al., 2007).

Pētījumu plānots turpināt, pēc 6 mēnešiem atkārtoti izmeklējot pētījumā iekļauto dzīvnieku piena un asins seruma paraugus un analizējot to saistību ar esošajiem rezultātiem.

**SECINĀJUMI**

1. Katrā ganāmpulkā ar iepriekšējām ziņām par pozitīviem *C.burnetii* izmeklējumiem sastop vismaz vienu no norādēm (DNS<sup>+</sup>, PhI<sup>+</sup>, PhI<sup>+/-</sup>) par *C.burnetii* infekciju, taču seroloģisku imūnatbildi pret PhI nesastop.
2. PhI imūnatbildi serumā sastop tikai slaucamām govīm, turklāt, palielinoties dzīvnieku vecumam, pieaug PhI imūnatbildes sastopamība serumā.
3. Abortējušie dzīvnieki, neraugoties uz aborta auglī konstatētu *C.burnetii* DNS klātbūtni, var neizdalīt *C.burnetii* DNS ar pienu un būt seronegatīvi.
4. Dzīvnieku skaits, kuriem serumā konstatēta PhI imūnatbilde, vairākas reizes pārsniedz dzīvnieku skaitu, kuri izdala *C.burnetii* DNS ar pienu.

**PATEICĪBA**

Izsaku pateicību par iespēju veikt pētījumu:

- Latvijas Lauksaimniecības universitātes Zinātnes padomei par finansējuma piešķiršanu pētniecības programmas “Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU” ietvaros zinātniskajam projektam „Q drudža sastopamība slaucamo govju ganāmpulkos Latvijā un tā ietekme uz reprodukcijas rādītājiem”.
- Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajam institūtam BIOR un sevišķi Dzīvnieku slimību diagnostikas laboratorijai par ciešo sadarbību informācijas apritē un laboratorisko izmeklējumu veikšanā.

## LITERATŪRA

1. Agerholm, Jørgen S. 2013. "Coxiella Burnetii Associated Reproductive Disorders in Domestic Animals--a Critical Review." *Acta Veterinaria Scandinavica* 55:13.
2. Angelakis, Emmanouil and Didier Raoult. 2010. "Q Fever." 140:297–309.
3. Babudieri B. 1959. "Q Fever: A Zoonosis." *Adv. Vet. Sci.* 5:82–182.
4. Barberio, A. et al. 2014. "Association between Serological Response and Shedding of Coxiella Burnetii in Milk in Dairy Cattle." *Large Animal Review* 20(1):3–8.
5. Böttcher, Jens et al. 2011. "Insights into the Dynamics of Endemic Coxiella Burnetii Infection in Cattle by Application of Phase-Specific ELISAs in an Infected Dairy Herd." *Veterinary Microbiology* 151(3–4):291–300.
6. Fournier, Pierre Edouard, Thomas J. Marrie, and Didier Raoult. 1998. "Diagnosis of Q Fever." *Journal of Clinical Microbiology* 36(7):1823–34.
7. Guatteo, R., F. Beaudeau, Alain Joly, and Henri Seegers. 2007. "Coxiella Burnetii Shedding by Dairy Cows To Cite This Version : Original Article." *Vet.Res.* 38:849–60.
8. Guatteo, Raphaël et al. 2006. "Shedding Routes of Coxiella Burnetii in Dairy Cows: Implications for Detection and Control." *Veterinary Research* 37(6):827–33.
9. Kruszewska, D. and S. Tylewska-Wierzbanska. 1997. "Isolation of Coxiella Burnetii from Bull Semen." *Research in Veterinary Science* 62(3):299–300.
10. Maurin, M., D. Raoult, Intracellular Location, and Intracellular Cycle. 1999. "Q Fever." 12(4):518–53.