Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A *Coxiella burnetii* elterjedtsége a tejelő szarvasmarha telepeken és az ott dolgozók körében, valamint az ehhez kapcsolódó szaporodásbiológiai problémák a közép-európai régióban.**

dr. Dobos Attila

Témavezető: Dr. Gyuranecz Miklós



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2022

**Témavezető és témabizottsági tagok:**

Gyuranecz Miklós, Ph.D., Habil., D.Sc., Dipl. ECVM

Állatorvos-tudományi Kutató Intézet

Témavezető

Szenci Ottó, Ph.D., Habil., D.Sc., Dipl. ECBHM

Szülészeti és Haszonállat Tanszék

Állatorvostudományi Egyetem

Témabizottsági tag

Dr. Dénes Béla, Ph.D., Habil

Állatorvosi Diagnosztikai Igazgatóság

Nemzeti Élelmiszerbiztonsági Hivatal

Témabizottsági tag

Marko Samardzija, Ph.D

Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék

Zágrábi Egyetem Állatorvosi Fakultás

Témabizottsági tag

**Bevezetés**

A Q-láz világszerte előforduló zoonózis, amelyet 1937-ben írtak le először Ausztráliában, vágóhídi munkások körében. Az ismeretlen oktanú, magas lázzal, influenzaszerű tünetekkel járó, járványos megbetegedések kórokozójaként a Gram-negatív intracelluláris baktériumot, a *Coxiella burnetii*-t*,* azonosították. Ismereteink a kórokozóról nagymértékben bővültek a betegség első leírása óta, mind a gazdaspektrum, mind a betegség járványtana tekintetében. Számos emlősfaj mellett a baktériumot kimutatták már többek között hüllőkből és tengeri emlősökből is. A kórokozó számos módon ürülhet a gazdaszervezetből, többek között vizelettel, bélsárral, tejjel és magzatburokkal is. A fertőzött állatok gyakran tünetmentesek, azonban számos szaporodásbiológiai problémát, például vetélést, magzatburok retenciót, méhgyulladást, korai magzatvesztést is összefüggésbe hoztak a kórokozó jelenlétével. Az emberi Q-lázas megbetegedések elsődleges forrásai azonban a házi kérődző állományok. Hazánkban először 1956-ban azonosította a fertőzést Romváry József szarvasmarha és juh állományokban (1957). Az első emberi megbetegedés bejelentésre 1977-ben került sor. Az elkövetkezendő években (1977-1980) két Bács-Kiskun megyei szarvasmarhatelepen is észleltek *C. burnetii-*hez köthető, elhúzódó légzőszervi tünetekben megnyilvánuló járványt a dolgozók körében (EPINFO, 2014). Az elmúlt évtizedek során hazánkbantöbbször is beszámoltak *C. burnetii* okozta vetélésekről kérődzőkben (Rády és mtsai., 1985; Rády és mtsai., 1987; Szeredi, 2004). Magyarországon legutóbb 2013-ban Baranya megyében állapítottak meg több mint 70 embert érintő Q-lázas megbetegedést, mely fertőzött juhokhoz volt köthető (Gyuranecz és mtsai., 2014). A *C. burnetii* patogenitása és virulenciája nagyban függ a gazdafajtól, a fertőződés módjától és a baktériumtörzs genetikai állományától. A baktérium genetikai jellemzői nagyban meghatározzák a kórokozó megbetegítőképességét, így a *C. burnetii* törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata elengedhetetlen eleme a felmérő vizsgálatoknak és a járványtani nyomozásoknak. Mivel az emberi Q-lázas megbetegedések elsődleges forrásai a házi kérődző állományok - a szarvasmarhák, juhok és kecskék, folyamatosan kiemelt figyelmet kell fordítani ezeknél az állatfajoknál a *C. burnetii* fertőzöttség vizsgálatára.

**Célkitűzések**

Célul tűztük ki:

**1.** A *C. burnetii* prevalenciájának meghatározását különböző méretű tejelő tehenészetekben tanktej minták enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) és valós idejű polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatával hat közép-kelet európai országban.

**2.** A *C. burnetii* okozta fertőzés szeroprevalenciájának meghatározását különböző gazdaállatfajokban (szarvasmarha, juh, kecske és állatkerti kérődzők) egyedi vérvizsgálatokkal.

**3.** A különböző foglalkozási csoportba sorolt tejelő szarvasmarha telepi dolgozók (kiemelten az állatorvosok) betegséggel szembeni áthangolódásának vizsgálatát a vérsavók IgG Fázis I és II ellenanyag titerének meghatározásával.

**4.** A *C. burnetii* lehetséges szerepének vizsgálatát a szarvasmarhák korai magzatvesztésében a vemhesség 29. és 70. napja között ELISA és complement-kötési (KK) próbák segítségével.

**5.** A kórokozó szerepének vizsgálatát a szarvasmarhák magzatburok retenciójában, normál módon eltávozott és magzatburok retencióból származó placenták *C. burnetii*-re irányuló specifikus PCR összehasonlító vizsgálatok segítségével.

**6.** *C. burnetii* törzsek multispacer sequence typing (MST) genotipizálását visszamaradt szarvasmarha magzatburokokból.

**Anyag és módszer**

A közép-kelet európai régió hat országának (Horvátország, Csehország, Magyarország, Szerbia, Szlovákia és Szlovénia) különböző méretű tejelő tehenészeti telepeiről tanktej mintákat gyűjtöttünk. Magyarország különböző területeiről pedig szarvasmarhákból, juhokból, kecskékből, valamint állatkerti kérődzőkből egyedi vérminták gyűjtésére került sor. A humán vérmintákat 19 magyarországi és 5 szlovákiai nagyüzemi tejelő szarvasmarha állományban dolgozó állatorvostól, illetve magyarországi, különféle foglalkozási csoportba tartozó telepi dolgozótól gyűjtöttük. Magyarország és Szlovákia különböző területeiről 167 szarvasmarha magzatburokból származó méhpogácsa mintát (70 normál módon eltávozott és 90 retenciós placenta) gyűjtöttünk a bennük található *C. burnetii* törzsek genotipizálása céljából. Különféle laboratóriumi módszereket (ELISA, KK, immunfluoreszcens vizsgálat /IFA/) használtunk a *C. burnetii* okozta szerológiai áthangolódás kimutatására. A nemzetközi ajánlásoknak megfelelően az ELISA eredményeket vettük alapul a valós prevalencia értékek meghatározására, mind a tanktej, mind az egyedi vérminták esetén (OIE, 2018; Guatteo és mtsai., 2011). Az ELISA pozitív vérsavók további vizsgálatára KK próbát végeztünk, amelynek előnye, hogy a titerértékek alapján könnyen elkülöníthető egymástól a heveny és a krónikus fertőzés (OIE, 2018). A humán vérmintákban a *C. burnetii* IgG Fázis I és Fázis II ellenanyagok jelenlétének megállapítása kereskedelmi forgalomban kapható indirekt immunofluoreszcens (Focus Diagnostics, Cypress, CA, USA) vizsgálati módszerrel történt a gyártó utasításának megfelelően. Mindkét IgG ellenanyag esetén a szűréshez használt küszöbérték 1:16 hígítás volt. A különböző minták molekuláris biológiai szűrésére a genomban több kópiában jelen lévő IS*1111* gén szakaszt célzó TaqMan típusú valós idejű PCR rendszert alkalmaztunk (Loftis és mtsai., 2006). Egy kereskedelmi forgalomban kapható pozitív kontrol (Adiavet Cox; Aes Chemunex Inc., Cranbury, NJ) segítségével történt validálás alapján a PCR érzékenysége 0,1 TFE volt. A PCR pozitív minták genotipizálására MST módszert alkalmaztunk, amely a *C. burnetii* genomban egyenletesen eloszló 10 kitöltő régió (Cox2, 5, 18, 20, 22, 37, 51, 56, 57 and 61) nukleotid sorrendjét elemzi (Glazunova és mtsai., 2005).

**Eredmények**

**A tanktej minták ELISA és valós idejű PCR vizsgálatának eredménye:**

A különböző országokban különböző prevalenciát találtunk (Horvátország 100%, Csehország 98,55%, Magyarország 97,61%, Szerbia 70,83%, Szlovákia 90,56% és Szlovénia 62,5%). A *C. burnetii*-specifikus ELISA vizsgálatok pedig minden vizsgált országban 100%-os pozitivitást mutattak, azokban az állományokban, ahol a tejelő állatok létszáma 250 vagy annál több volt.

**Különböző gazdafajokból származó vérminták ELISA vizsgálatainak eredménye:**

A különböző kérődző gazdafajokban eltérő *C. burnetii* szeroprevalenciát találtunk ELISA vizsgálatokkal. Szarvasmarhák esetében 47,2%-os, míg a kiskérődzők esetében 25,5%-os (23,5% juhok és 31% kecske) szeroprevalenciát találtunk felmérő vizsgálataink során. Az állatkerti kérődzők esetében a kórokozóval szembeni ellenanyagok nem voltak kimutathatóak.

**Humán vérminták *C. burnetii* IgG Fázis I és Fázis II ellenanyagok vizsgálatának eredménye:**

A 70, különböző foglalkozási csoportba sorolt szarvasmarhatelepi dolgozó közül 53 (75,7%) esetben találtunk *C. burnetii* IgG fázis I ellenanyagot és 59 (84,3%) esetben Fázis II-t. A 8 intenzív szarvasmarha telepen dolgozó állatorvosnál mind a 8 esetben (100%) kimutattunk IgG Fázis I és Fázis II ellenanyagokat. Az inszeminátorok és állatgondozók esetében szintén 100%-os átfertőzöttséget állapítottunk meg, míg a fejőházi dolgozók esetében ez csak 47%-os, míg a telepvezetők esetében pedig 71,4%-os volt.

**A szeropozitivitás aránya korai magzatvesztés esetén:**

Vizsgálataink során magasabb szeropozitivást találtunk (80,5%) azoknál az állatoknál, amelyek elvesztették magzatukat a vemhesség korai stádiumában, mint azoknál, amelyek vemhesek maradtak. Az első termékenyítés esetén még magasabb volt a szeropozitivitás aránya (94,4%). Az ELISA pozitív állatokat KK módszerrel tovább vizsgáltuk és magasabb szeropozitivitási arányt találtunk a Fázis I antigén ellen termelt ellenanyagoknál a magzatot vesztett állatok tekintetében (50%), mint a vemhesen maradt állatoknál (38,5%).

**Valós idejű PCR eredmények a szarvasmarhákból származó placenták vizsgálata során:**

A *C. burnetii* előfordulásának gyakoriságát összehasonlítottuk a magzatburok retenciós és normál módon eltávozott placentákban. Kilencven szarvasmarha retenciós magzatburokból származó méhpogácsa mintából 80 (88,9%) minta bizonyult pozitívnak, míg a 77 normál módon eltávozott magzatburokból származó méhpogácsák esetén csak 31 (40,3%). A retenciós placenták esetén viszont a pozitív minták 21,3%-a mutatott 27,08-as cycle treshold (Ct) érték alatti erős pozitivitást a *C. burnetii* specifikus valós idejű PCR vizsgálat során. A legerősebb pozitivitást mutató mintákból (Ct 11,92-18,28) végeztünk MST genotipizálást. Az öt cotyledon minta MST vizsgálata során egy új (ST61) szekvencia típus (ST) előfordulását mutattuk ki, amely eddig sem Magyarországon sem pedig Szlovákiában nem fordult elő.

**Megbeszélés**

A közép-kelet európai országok tejelő szarvasmarha telepein történt tanktej vizsgálataink alapján megállapítható, hogy azokon a tejelő szarvasmarha telepeken, ahol nagy az állatlétszám és nagyobb az állatsűrűség, a *C. burnetii* prevalenciája is magasabb. A Q-láz előfordulásának gyakorisága eltérő a különböző országokban, viszont azokban az állományokban, amelyekben a tejelő állatok létszáma 250 vagy annál magasabb, minden vizsgált országban 100%-os ELISA pozitivitást mutattak a vizsgálataink.

A különböző kérődző gazdafajokban eltérő *C. burnetii* szeroprevalenciát találtunk a vérsavók ELISA vizsgálataival. Kutatásainkkal igazoltuk, hogy Magyarországon a Q-láz kórokozója a kérődzőfajok közül a szarvasmarhaállományokban terjedt el a legszélesebb körben, de a juh- és kecskeállományok is közegészségügyi kockázatot jelenthetnek, míg az állatkerti kérődző fajok a Q-láz terjesztésében feltehetőleg nem játszanak szerepet.

Jelenlegi kutatásunkkal igazoltuk azt is, hogy a tejelő szarvasmarha telepen dolgozók esetében a *C. burnetii* átfertőzöttség mértéke jelentősen magasabb a különböző foglalkozási csoportokban, összehasonlítva a különböző országok hasonló kutatásaival. Vizsgálataink során beigazolódott, hogy a szarvasmarha praxisban dolgozó állatorvosok számítanak a leginkább veszélyeztetett csoportnak a *C. burnetii* fertőzöttség szemponjából, de az inszeminátorok és állatgondozók is különösen kitettek a kórokozóval történő fertőződésnek. A tejelő szarvasmarha telepek magas *Coxiella* terheltsége miatt különösen fontos a betegség kontrollálása, mivel jelenlegi kutatásunk igazolta, hogy a tejelő telepeken a *Coxiella* szeroprevalencia nemcsak az állatoknál, hanem az ott dolgozóknál is magas.

Számos tanulmány szerint kapcsolat áll fenn a kórokozó jelenléte és a szarvasmarhák egyes szaporodásbiológiai problémái, például az infertilitás, a koraellés, a vetélés és a korai magzatvesztés között. Kutatásunkban jóval magasabb szeropozitivást találtunk azoknál az állatoknál, amelyek elvesztették magzatukat a vemhesség korai stádiumában, mint azoknál, amelyek vemhesek maradtak. Ezek alapján megállapítható, hogy a *C. burnetii* jelenléte a tejelő szarvasmarha telepeken feltételezhetően emeli a magzatvesztés kockázatát, vagy legalábbis negatívan befolyásolja a szaporasági mutatókat.

A kutatás eredményeképpen megállapítható, hogy a retenciós placentákban szignifikánsan magasabb volt a kórokozó előfordulása, így nagyobb kockázatot jelent azon dolgozók számára a kórokozóval való fertőződés, akik ezekkel a retenciós placentákkal érintkeznek. Feltételezhető, hogy a kórokozó gyakori előfordulása a retenciós placentákban nemcsak a humán fertőzöttség szemponjából fontos, hanem szerepe lehet a magzatburok retenció kialakulásában is. Vizsgálataink során egy új *C. burnetii* ST (ST61) előfordulását állapítottuk meg a hazai és szlovákiai szarvasmarhaállományokban MST módszer segítségével. Az újonnan feltárt szekvencia (ST 61) és az előző kutatásokban talált ST20 genotípusú kórokozók azok, melyek a szarvasmarhák coxiellózisában szerepet játszanak a régióban.

**Új tudományos eredmények**

**Ad 1.** A *C. burnetii* prevalenciája 100% a közép-kelet európai régió azon tejelő szarvasmarha állományaiban, amelyekben több mint 250 egyedet tartanak. Ez jelentősen magasabb, mint Európa többi részén, feltételezhetően a koncentrált (nagyüzemi) állatartásnak köszönhetően.

**Ad 2.** Magyarországon a *C. burnetii* legfontosabb gazdaállat faja a tejelő szarvasmarha, de a kecske- és juhállományokban is elterjedt a kórokozó.

**Ad 3.** A szarvasmarhatelepeken dolgozók között 100%-os a *C. burnetii*-vel szembeni áthangolódás az állatorvosok, az inszeminátorok, valamint az állatgondozók körében. Ezek a foglalkozási csoportok különösen kitettek a Q-lázzal történő fertőződésnek. A világon is egyedülállóan magas áthangolódás feltételezhetően a tejelő állományok magas fertőzőttségének következtében alakult ki.

**Ad 4.** A tejelő szarvasmarha telepeken a vemhesség korai időszakában a magzatot vesztett állatok esetében szignifikánsan magasabb a *C. burnetii* szeropozitivitás, mint a vemhesen maradt állatok között. A *C. burnetii* fertőzöttség feltételezhetően emeli a korai magzatvesztés kockázatát.

**Ad 5.** A magzatburok retencióban szenvedő tejelő szarvasmarhákban a *C. burnetii* előfordulása szignifikánsan magasabb, mint azokban az állatokban, ahol normál módon eltávozik a placenta. A kórokozó feltehetőleg szerepet játszik a magzatburok retencióban. A visszamaradt placentákkal szoros kontaktusba kerülő dolgozók - elsősorban állatorvosok - esetében ez növelheti a kórokozóval történő fertőződés lehetőségét.

**Ad 6.** A Magyarországon és Szlovákiában magzatburok visszatartásból származó méhpogácsákban újonnan talált ST 61 genotípus és a régebbi ST 20 genotípus azok az elsődlegesen előforduló *C. burnetii* genotípusok, amelyek szarvasmarhák coxiellózisát okozzák a régióban.

**Tudományos publikációk**

**Az értekezés témájához kapcsolódó lektorált publikációk:**

* Dobos, A., Kreizinger, Z., Kovács, A., Gyuranecz, M.: **Prevalence of *Coxiella burnetii* in Central and Eastern European dairy herds*,***Comparative Immunology Microbiology & Infectious Disease, 72, 101489, 2020.
* Dobos, A., Gábor, G., Wehmann, E., Dénes, B., Póth-Szebenyi, B., Kovács, Á. B. and Gyuranecz, M. : **Serological screening for *Coxiella burnetii* in the context of early pregnancy loss in dairy cows,** Acta Veterinaria Hungarica, 68, 305–309, 2020.
* Dobos, A., Balla, E.: **Industrial dairy cattle farms in Hungary as a source of *Coxiella burnetii* infection in humans.** Vector Borne and Zoonotic Disease, 21, 498-501, 2021.
* Dobos, A., Fodor, I., Kiss, G., Gyuranecz, M.: **Serological survey of *Coxiella burnetii* infections in dairy cattle, sheep, goats and zoo animals in Hungary*,***Acta Veterinaria Hungarica, 69, 105-109 , 2021.
* Dobos, A., Gyuranecz, M., Albert, M.,: **Incidence rate of *Coxiella burnetii* in the retention of fetal membranes in dairy herds,** Magyar Állatorvosok Lapja, 142, 593–597, 2020.
* Dobos, A., Balla, E.: ***Coxiella burnetii* infection rate among intensive dairy farm veterinarians** Magyar Állatorvosok Lapja, 143, 11–16, 2021.
* Dobos, A., Fodor, I.: **Prevalence of *Coxiella burnetii* in bovine placentas in Hungary and Slovakia; detection of a novel sequence type,**Acta Veterinaria Hungarica, 69, 2021 online
* Dobos, A., Fodor,I., Tekin,T., Đuričić, D., Samardzija, M.,**: Presence of *Coxiella burnetii* in dairy cattle and farms in the Czech Republic**, Polish Journal of veterinary sciences [accepted] 2022

**Egyéb lektorált publikációk:**

* Battay, M., Dobos, A., Illés Cs., Ózsvári L. : **Az afrikai sertéspestis gazdasági hatásai Észak-Kelet Pest és Nógrád megye vadgazdálkodására, különös tekintettel a klasszikus sertéspestissel kapcsolatos korábbi tapasztalatokra,** Magyar Allatorvosok Lapja, 141, 39-46 , 2019.
* Dobos, A., Fodor, I., Kreizinger, Z., Makrai, L., Dénes,B., Kiss,I., Đuričić,D., Kovačić, M., Szeredi.: **Infertility in dairy cows – Possible bacterial and viral causes,** Veterinarska stanica, 53, 2021
* Đuričić, D., Dobos, A. , Grbavac, J., Stiles, C. , Bacan, I., Vidas, Željko, Marković, F., Kočila, P., & Samardžija, M.: **Climate impacts on reproductive performance of Romanov sheep in the moderate climate,** Journal of Animal Behaviour and Biometeorology, 10, 2021.

**Köszönetnyilvánítás**

Elsőként témavezetőmnek, Gyuranecz Miklósnak szeretnék köszönetet mondani az évek során nyújtott rengeteg szakmai segítségért, támogatásért és a nagyon sok türelméért.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dénes Bélának, Szenci Ottónak és Marko Samardzijának, akik folyamatos szakmai segítségükkel, konzultációval bármikor elérhetőek voltak. Hálás vagyok Fodor Istvánnak a statisztikai vizsgálatok során nyújtott segítségért és Gábor Györgynek a szaporodásbiológiai konzultációkért. Különleges köszönet illeti kollégáimat, Csíri Róbertet, Karácsony Zsoltot és Kovács Csabát a mintagyűjtésben végzett áldozatos munkájukért.

Külön köszönet illeti az Állatorvostudományi Kutatóintézet összes munkatársát, akik laboratóriumi munkájukkal, végtelen türelmükkel és kedvességükkel hozzájárultak munkámhoz.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni a családomnak a szeretetteljes támogatást és biztatást.