

## Ph.D. Theses

**Diversity of blood parasites of genus *Bartonella* in wild rodents in Mazury Lakes District****Różnorodność pasożytów krwi z rodzaju *Bartonella* u wolno żyjących gryzoni na Pojezierzu Mazurskim****Anna Paziewska**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Parazytologii Instytutu Zoologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego i obroniona 15 października 2010 r.

Promotor: prof. dr hab. Edward Siński

Recenzenci: prof. dr hab. Henryka Długońska

prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka

**ABSTRACT.** This long-term study of genetic diversity and epidemiology of the alpha-proteobacterium *Bartonella* in wild rodents from forest (*Myodes glareolus* and *Apodemus flavicollis*) and abandoned farmland (*Microtus arvalis* and *Mi. oeconomus*) was carried out in the years 2007–2009 in the Mazury Lakes District. In total, 1193 rodents were marked and recaptured, and 2226 blood samples were collected. The highest *Bartonella* prevalence was found in *A. flavicollis* (43.5%), the lowest in *Mi. oeconomus* (9.4%), while prevalence in *My. glareolus* and *Mi. arvalis* was, respectively, 13.2% and 11.8% (PCR of citrate synthase *gltA* gene fragment). Prevalence varied according to year and season, as well as sex of rodents. For woodland animals, a rapid decrease of prevalence was observed in late 2008, due to the dilution effect. Multiple (different species/genotypes of *Bartonella* in successive months) and mixed infections (more than one bacteria genotype in the same blood sample) were also diagnosed. Between 2835 and 4800000 colony forming units (CFU) per ml blood were recorded, with, for *B. taylorii*, significant differences between isolates from hosts belonging to different host families. Sequence analysis of 147 isolates revealed 37 *gltA* variants. In all four rodents, *B. taylorii* was the most prevalent, and could be divided into three main clades. One clade of *B. grahamii* was present in *My. glareolus*, *A. flavicollis* and *Mi. arvalis*, and both *Microtus* species were infected with a single clade of *B. doshiae*. A single isolate of *B. birtlesii* from *A. flavicollis* was collected, while two isolates could not be assigned to any known species. Nested clade analysis showed host specificity of 1st step clades (connected with rodent species) and 2nd step clades (connected with rodent family). Analysis was then extended to other housekeeping genes (cell division protein *ftsZ*, heat shock protein *groEl*, riboflavin synthase *ribC*, beta subunit RNA polymerase *rpoB*) and gene encoding 16S rRNA. Comparison of alleles of these genes in 27 isolates revealed numerous recombinant events, primarily involving *groEl* and 16S rRNA genes. Moreover, genetic recombination within housekeeping genes was also identified, and one of the unidentified *Bartonella* isolates was found to involve recombination within *gltA* between *B. grahamii* and *B. taylorii*. Examination of two T4SS pathogenicity genes (*virB5* and *bepA*), revealed a similar pattern of extensive recombination. *BepA* from 17 isolates showed little diversity, concomitant with its role as an intra-cellular messenger. The *virB5* gene (encoding a putative extra-cellular adhesin) from 22 isolates from voles (Arvicolidae) and *A. flavicollis* was distinctively different in sequence and putative structure, and showed a clear signature of horizontal gene transfer. Moreover, these recombinant events were often identified in the same isolates in which recombination of *groEl* or 16S rRNA was observed, suggesting that selection for this pathogenicity gene is important in the microevolution of *Bartonella* within rodents. In particular, *Microtus* spp. was central in the appearance of novel *Bartonella* isolates.

**Key words:** molecular epidemiology, recombination, nested clade analysis, Poland

Wśród bakterii z rodzaju *Bartonella* ( $\alpha$ -Proteobacteria) znajdują się gatunki uznawane za patogenne w stosunku do człowieka, jednak znakomita ich większość to pasożyty gryzoni, a przypadki ich transmisji do ludzi za pośrednictwem krwio pijnych stawonogów sprawiają, że bartonelloza zaliczana jest do chorób rozprzestrzeniających się (*emerging infectious diseases*). Badania związane z różnorodnością genetyczną i epidemiologią *Bartonella* spp. prowadzono w populacjach wolno żyjących gryzoni leśnych (nornica ruda *Myodes glareolus* i mysz wielkooka leśna *Apodemus flavicollis*) i polnych (nornik zwyczajny *Microtus arvalis* i nornik północny *Mi. oeconomus*).

W czasie trwania projektu, w latach 2007–2009, na terenie Pojezierza Mazurskiego, w comiesięcznych sesjach odłowiono i wyznakowano łącznie 1193 gryzonię i pobrano od nich 2226 prób krwi (metoda powtórnych odłowów). Wszystkie próby krwi przeanalizowano pod kątem obecności DNA *Bartonella* wykorzystując fragment genu syntazy cytrynianowej (*gltA*). Najwyższą ekstensywność zakażenia bakterią zaobserwowano w przypadku *A. flavicollis* (43.5%), najniższą – w przypadku *Mi. oeconomus* (9.4%). Dla *My. glareolus* i *Mi. arvalis* odsetek zakażonych osobników wyniósł odpowiednio 13.2% i 11.8%. Stwierdzono różnice w ekstensywności zakażenia *Bartonella* spp. w zależności od roku i sezonu badań, a także płci gryzoni. W przypadku zwierząt leśnych zaobserwowano gwałtowny spadek prevalencji późnym latem i jesienią 2008 roku, co było związane z tzw. efektem rozcieńczenia. Wśród zwierząt odławianych kilkakrotnie w kolejnych miesiącach obserwowano wielokrotne zakażenia *Bartonella* (różnymi gatunkami/genotypami bakterii) oraz infekcje mieszane (więcej niż jednym genotypem bakterii).

Analiza 147 izolatów bakterii wykazała obecność 37 wariantów genu *gltA*. We wszystkich badanych populacjach zwierząt dominowały infekcje wywoływane przez *B. taylorii*, w przypadku *My. glareolus*, *A. flavicollis* i *Mi. arvalis* stwierdzano także zakażenie *B. grahamii*, a u obydwu gatunków norników diagnozowano również infekcje *B. doshiae*. U jednego osobnika *A. flavicollis* stwierdzono zakażenie *B. birtlesii*, a kolejnych dwóch izolatów *Bartonella* nie można było przypisać do żadne-

go ze znanych gatunków bakterii. Analiza metodą kładów zagnieżdżonych wykazała specyficzność żywicielską związaną z gatunkiem żywiciela na poziomie kładów I stopnia oraz specyficzność związaną z rodziną żywiciela na poziomie kładów II stopnia. Przeanalizowano również inne geny metabolizmu podstawowego komórki (białka podziału komórkowego *ftsZ*, białka opiekuńczego *groEl*, syntazy ryboflawinowej *ribC*, podjednostki beta polimerazy RNA *rpoB*) oraz genu kodującego 16S rRNA. Porównanie wariantów tych genów w 27 izolatach umożliwiło identyfikację licznych przypadków rekombinacji genów *groEl* i 16S rRNA. Stwierdzono też rekombinację w obrębie genów metabolizmu podstawowego, np. w przypadku jednego z niezidentyfikowanych izolatów *Bartonella* była to rekombinacja genu *gltA* pomiędzy *B. grahamii* i *B. taylorii*.

Analiza dwóch genów związanych z inwazyjnością bakterii w stosunku do żywiciela (*virB5* i *bepA*), wchodzących w skład systemu sekrecji typu IV również wykazała ich ekstensywną rekombinację. Sekwencje fragmentu genu kodującego białko BepA 17 izolatów nie różniły się od siebie istotnie, co prawdopodobnie związane jest z faktem, że jest to białko wydzielane do wnętrza komórek żywiciela i zmienia ich fizjologię. Gen *virB5* (kodujący białko umożliwiające adhezję do komórek żywiciela) analizowano dla 22 izolatów i stwierdzono istotne różnice zarówno w składzie sekwencji, jak i jej długości pomiędzy wariantami tego genu występującymi u nornikowatych (Arvicolidae) i u *A. flavicollis*. Zarówno dla genu *bepA*, jak i *virB5* stwierdzono przypadki rekombinacji; często dotyczyły one tych samych izolatów, dla których wcześniej zaobserwowano rekombinację genów *groEl* lub 16S rRNA, co może oznaczać, że selekcja związana z genami wirulencji ma istotny wpływ na ewolucję *Bartonella* spp. zakażających gryzonię. Najczęściej horyzontalny transfer genów dotyczył izolatów pochodzących od *Microtus* spp., co sugeruje istotną rolę norników w pojawianiu się nowych genotypów bakterii.

Received 9 December 2010

Accepted 9 January 2011