



EESTI MAAÜLIKOOL

Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut

Marelle Mägi

***COXIELLA BURNETII* ESINEMINE EESTI LAMMASTE
ABORDIMATERJALIS**

PRESENCE OF *COXIELLA BURNETII* IN SHEEP ABORTION
MATERIAL IN ESTONIA

Lõputöö

Veterinaarmeditsiini õppekava

Juhendaja: Kädi Neare, DVM

Tartu 2025

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, 51014, Tartu		Lõputöö lühikokkuvõte	
Autor: Marelle Mägi		Õppekava: Veterinaarmeditsiin	
Pealkiri: <i>Coxiella burnetii</i> esinemine Eesti kodumäletsejaliste abordimaterjalis			
Lehekülgi: 39	Jooniseid: 2	Tabeleid: 2	Lisasid: 1
<p>Õppetool: Kliinilise veterinaarmeditsiini õppetool ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 3. Terviseuuringud, 3.2. Veterinaarmeditsiin B750 Veterinaarmeditsiin, kirurgia, füsioloogia, patoloogia, kliinilised uuringud Juhendaja: Kädi Neare Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2025</p>			
<p><i>Coxiella burnetii</i> (CB) on zoonootiline obligatoorne rakusisene bakter, mis põhjustab inimestel Q palavikku ja loomadel koksielloosi. CB levik on ülemaailmne ja paljudes riikides saavutanud endeemilise staatuse. Inimesele on bakteri tähtsaimaks reservuaariks kodumäletsejalised, kelle hulka kuuluvad veised, lambad ja kitsed. Koksielloosi nakatunud loomad on enamasti asümptomaatilised või esineb tiinetel loomadel aborte ja enneaegseid või surnultsünde. Bakter satub keskkonda loomade väljaheidete, piima, tupenõrede või abordimaterjaliga. Eestis on varasemalt veise- ja lambakarjades uuritud CB serolevimust piima- ja seerumiproovidest, kuid abordijäänuseid uurimismaterjalina ei ole seni teadustöös kasutatud. Käesoleva uurimistöö eesmärk oli tuvastada CB DNA olemasolu Eesti lammaste abordimaterjalis kasutades kvalitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). Uuringusse kaasati 6 karja erinevatest Eesti piirkondadest, kust koguti kokku 17 platsentaproovi. DNA eraldati DNeasy® Blood & Tissue Kit-iga (Qiagen™, Valencia, CA, USA) vastavalt tootja juhistele. PCR analüüsis kasutati amplifitseerimiseks CB-le spetsiifilist IS1111 geenifragmenti. Ükski proov ei osutunud CB DNA-le positiivseks, kuigi üks proov andis esialgsel testimisel nõrga positiivse signaali. Uuringu tulemustesse tuleb suhtuda ettevaatlikkusega arvestades väikest karjade valimit ja proovide arvu, mis ei võimalda teha üldistusi nakkuse esinemise kohta Eesti lambapopulatsioonis.</p>			
Märksõnad: Q palavik, väikemäletsejalised, platsenta, PCR, zoonoos			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, 51014, Tartu Estonia		Abstract of Final Thesis	
Author: Marelle Mägi		Curriculum: Veterinary Medicine	
Title: Presence of <i>Coxiella burnetii</i> in sheep abortion material in Estonia.			
Pages: 39	Figures: 2	Tables: 2	Appendixes: 1
Chair: Chair of Clinical Veterinary Medicine Field of research and (CERC S) code: 3. Health, 3.2. Veterinary Medicine B750 Veterinary medicine, surgery, physiology, pathology, clinical studies Supervisor: Kädi Neare Place and year: Tartu 2025			
<p><i>Coxiella burnetii</i> (<i>CB</i>) is a zoonotic, obligate intracellular bacterium that causes Q fever in humans and coxiellosis in domestic ruminants. <i>CB</i> is globally distributed and has reached endemic status in many countries. The primary reservoir for humans is domestic ruminants, including cattle, sheep, and goats. Infected animals are mostly asymptomatic, but the bacterium can cause abortions, and premature and stillbirths in pregnant animals. It is shed into the environment through feces, milk, vaginal secretions, or abortion material of animals. In Estonia, <i>CB</i> seroprevalence has previously been studied in cattle and sheep herds using milk and serum samples, but abortion residues have not yet been used as research material. The aim of this study was to detect the presence of <i>CB</i> DNA in sheep abortion material in Estonia using a qualitative polymerase chain reaction (PCR). The study included six herds from different regions of Estonia, from which a total of 17 placental samples were collected. DNA was extracted with the DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen™, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. In the PCR analysis, the <i>CB</i>-specific IS1111 gene fragment was used for amplification. None of the samples tested positive for <i>CB</i> DNA, although one sample gave a weak positive signal in the initial test. The results should be interpreted with caution due to the small sample size and number of samples, which do not allow generalizations about the occurrence of infection in the Estonian sheep population.</p>			
Keywords: Q fever, small ruminants, placenta, PCR, zoonosis			

SISUKORD

LÜHENDITE NIMEKIRI.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Q palaviku uuringute ajalugu	7
1.2. <i>Coxiella burnetii</i> ja Q palaviku patogenees	8
1.3. <i>Coxiella burnetii</i> reservuaarliigid ja nakkuse ülekanne	9
1.3.1. Levimus kodumäletsejalistel	10
1.3.2. Koksielloosi väljendus loomadel	11
1.4. <i>Coxiella burnetii</i> nakkus inimesel	12
1.4.1. Kliinilised tunnused inimesel	13
1.5. Nakkuse seire ja kontrolli meetodid.....	14
1.6. Diagnostilised ja uuringutes kasutatavad meetodid	15
1.6.1. Polümeraasi ahelreaktsiooni meetodid.....	16
1.7. <i>Coxiella burnetii</i> levimus ja nakatumise riskitegurid Eestis	17
2. LÕPUTÖÖ EESMÄRK	19
3. MATERJALID JA METOODIKA	20
3.1. Karjade valik ja proovide kogumine	20
3.2. Proovide analüüs	20
3.2.1. DNA eraldamine	20
3.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon.....	21
3.2.3. Polümeraasi ahelreaktsiooni tulemuste visualiseerimine.....	22
4. TULEMUSED.....	23
5. ARUTELU	25
5.1. Karjade valim ja proovide arv	25
5.2. <i>Coxiella burnetii</i> DNA abordimaterjalis	25
5.3. Polümeraasi ahelreaktsiooni tulemust mõjutavad tegurid.....	27
JÄRELDUSED JA SOOVITUSED	29
TÄNUAVALDUSED	30
KIRJANDUSE NIMEKIRI.....	31
LISAD	38
Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	39

LÜHENDITE NIMEKIRI

CB – *Coxiella burnetii*

ECDC – Haiguste Ennetamise ja Tõrje Euroopa Keskus (*European Centre for Disease Prevention and Control*)

EFSA – Euroopa Toiduohutuse Amet (*European Food Safety Authority*)

ELISA – immunoensüümanalüüs (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

IgG – immuunglobuliin G (*immunoglobulin G*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PV – parasitofoorne vakuool (ingl *parasitophorous vacuole*)

QP – Q palavik (*Q fever, query fever, QF*)

SRV – suurerakuline vorm (*large-cell variant, LCV*)

TBE – tris-boraat-etüleendiamiintetraädikhape (*tris-borate ethylenediaminetetraacetic acid*)

VRV – väikeserakuline vorm (*small-cell variant, SCV*)

SISSEJUHATUS

Coxiella burnetii (*CB*) on zoonootiline obligatoorne rakusisene bakter ja inimestel Q palaviku (ingl *Q fever*, *query fever* – QP, ingl *QF*) või loomadel koksielloosi põhjustaja. *CB* on levinud ülemaailmselt, olles paljudes kohtades endeemiline, ning on võimeline nakatama erinevaid loomaliike (Van den Brom jt, 2015; Celina ja Cerný, 2022). Viimastel aastakümnetel on haiguse levimus Euroopas tõusnud ning saavutanud Lääne-Euroopas endeemilise staatuse. Kuigi QP kuulub Euroopas teatamiskohustuslike haiguste hulka, on haigus tugevalt aladiagnoositud ning puudub terviklik ülevaade selle levimuse kohta (EFSA, 2023).

Inimese tervise seisukohast on *CB* reservuaaridest olulisimad veise-, lamba- ja kitsekarjad. Koksielloos kutsub tiinetel loomadel esile surnultsünde ja aborte (Van den Brom jt, 2015). Kui haigustekitaja on karjas laialdaselt levinud, võib ette tulla abordilaineid, mis põhjustavad loomapidajale suurt majanduslikku kahju. Poegimistegevuse tagajärjel satub ümbritsevasse keskkonda suur hulk haigustekitajaid, mis kuivamise järel võivad tuulega kanduda ümbritsevasse asulatesse ning põhjustada inimestel nakatumist. Inimesel kulgeb äge nakkus sageli kliiniliste tunnusteta või gripilaadsete sümptomitega, ent *CB* organismi püsima jäämisel võib haigus osutada eluohtlikuks (Eldin jt, 2017).

Aastatel 2012-2014 tehtud uuringutest on selgunud, et Eesti piimaveisekarjades on *CB* serolevimus 27,16% (Neare jt, 2023), üldelanikkonnas 3,9% ning riskirühmadest veterinaarspetsialistide hulgas 9,62% ja piimaveisekasvatajate seas 7,73% (Neare jt, 2019). Need uuringud näitavad, kui oluline on saavutada Eestis korralik ülevaade selle haigustekitaja leviku kohta.

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks on tuvastada *CB* DNA esinemine Eesti lammaste abordimaterjalis. Uurimismaterjalina kasutatakse perioodil 1. jaanuar 2017 - kuni 30. juuni 2018 kogutud aborteerunud uttede platsenta proove. *CB* DNA-d tuvastati PCR meetodil.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Q palaviku uuringute ajalugu

Esimene teadaolev Q palaviku (ingl *Q fever*, *query fever* – QP, ingl *QF*) puhang inimesel toimus 1930-ndate aastate esimeses pooles, mil tundmatu patogeen põhjustas Austraalias tapamaja töötajate haigestumist (Derrick, 1937). Järgmine juhtum leidis aset mõni aasta hiljem Ameerika Ühendriikides, kui nakatus puugist leitud haigustekitaja isoleerimisega tegelenud laboritöötaja (Davis ja Cox, 1938). Praeguseks on QP-u puhanguid tuvastatud mitmel pool maailmas (Eldin jt, 2017). 1937. tuvastas Edward Holbrook Derrick infektsiooni põhjustajana viiruse ning pakkus ajutiselt haiguse nimeks QP (Derrick, 1937), mis on tänaseni püsima jäänud (Eldin jt, 2017). Hiljem on leitud, et tegu on bakteriaalse nakkusega (Davis ja Cox, 1938).

1930.-1940.-tel arvati, et haigus kulgeb inimesel ainult ägedalt (Eldin jt, 2017). Ent 1949. aastal leidsid Beck ja Bell, et haiguse läbi põdenud inimestel esines hilisemas elus südameprobleeme (Beck ja Bell, 1949). Mõned aastad hiljem avastati, et QP võib muutuda krooniliseks ja põhjustada inimestel endokardiiti (Marmion jt, 1953). 1983. aastast alates eristatakse primaarset ehk ägedat ja kroonilist ehk persisterivat QP-u vormi. Lisaks avastati, et kõrge immuunglobuliin G (ingl *immunoglobulin G* – IgG) tiitriga inimestel esineb rohkem endokardiiti (Ellis jt, 1983).

Suurim QP-u puhang inimesel leidis aset Hollandis aastatel 2007-2009, mil kinnitati üle 4000 ägeda haigusjuhtumi. Hinnanguliselt võis sellel perioodil haigestunute arv olla isegi üle 44 000 (Van der Hoek jt, 2012). Järelevaatavas Schimmer jt (2012) uuringus testiti immunoensüümanalüüsi (ingl *enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) meetodil Hollandi populatsiooni serolevimust perioodil 2006-2007 vahetult enne puhangute algust. Uuringu käigus selgus, et serolevimus oli üldpopulatsioonis ainult 1,5%, olles kõrgem loomadega kokkupuutuvatel inimestel ja Türgist pärit inimestel, kus on haiguse levimus kõrgem. Puhangute teket ei seostata mäletsejaliste pidamistihedusega (Schimmer jt, 2012).

2012. aastal määratleti võimalike hilisemate komplikatsioonide tuvastamiseks kroonilise QP-u kriteeriumid. Selle järgi jagati nakatunud inimesed IgG tiitri järgi kolme kategooriasse: tõestatud krooniline QP ($\geq 1:1,024$), tõenäoline krooniline QP (1:800 kuni 1:1,024) ja võimalik krooniline QP (1:128 kuni 1:800). Wegdam-Blans jt (2012) järeldasid oma ülevaatlikus artiklis, et nii tõenäolise kui võimaliku kroonilise QP puhul võib esineda tiiter 1:1,024. Erinevalt võimalikust peab tõenäolise kroonilise QP-ga esinema ka üks järgnevatest tunnustest:

südameklapi haigus, aneurüsm, kahtlus osteomüeliidile või hepatiidile, rasedus, QP kliinilised tunnused, granulomatoosne põletik või immuunpuudulikkus (Wegdam-Blans jt, 2012).

1.2. *Coxiella burnetii* ja Q palaviku patogenees

Coxiella burnetii (CB) on obligatoorne rakusisene zoonootiline bakter. Patogeen on levinud üle maailma, v.a Uus-Meremaal ja Antarktikas (Celina ja Cerný, 2022). Paljudes riikides, näiteks Prantsusmaal, Hispaanias, Iisraelis, Portugalis ja Taiwanis levib CB endeemiliselt (Eldin jt, 2017). CB kuulub koos *Rickettsiella*-ga *Gammaproteobacteria* klassi, *Legionellales* seltsi ja *Coxiellaceae* sugukonda (Van den Brom jt, 2015). CB kontagioosus on väga kõrge, sest nakatumiseks piisab vähem kui 10 nakkusvõimelisest bakterist (Celina ja Cerný, 2022). Organismis ründab bakter ennekõike fagotsüteerivaid rakke, peamiselt makrofaage, monotsüüte ja neutrofiile. Lisaks immuunrakkudele on CB võimeline nakatama ka teisi rakutüüpe, näiteks epiteelrakke (Cordsmeier jt, 2019; Kumaresan jt, 2022).

Obligatoorsetel rakusisestel bakteritel on välja kujunenud mehhanismid rakusurma vältimiseks. Selleks on mõlemad CB vormid võimelised sekreteerima efektorproteiine, mis muudavad peremeesraku ainevahetust. CB-l on leitud neli proteiini, mis kontrollivad apoptoosi. Anküriin G ning CB antiapoptootilised efektorproteiinid A ja B mõjutavad sisest ning viimane ka välist apoptoosi. Neljandaks efektorproteiiniks on põletikulise aktivatsiooni inhibiitorproteiin, mis ei lase põletikulisel rakusurmal rakenduda (Cordsmeier jt, 2019).

CB võib elutsükli jooksul esineda kahes erinevas vormis. Esimest nimetatakse kirjanduses suurerakuliseks vormiks (ingl *large-cell variant* – SRV, ingl *LCV*) ja teist väikeserakuliseks vormiks (ingl *small-cell variant* – VRV, ingl *SCV*). SRV on pleomorfse kujuga umbes 1 µm suurune Gram-negatiivselt värvuv vorm. SRV on CB paljunemisvõimeline vorm, mistõttu on neid parasitoforses vakuolis (ingl *parasitophorous vacuole* – PV) rohkem patogeeni eksponentsiaalse paljunemise faasis. Nakkuse statsionaarses faasis on rohkem enamasti kepikese kujuga 0,2-0,5 µm suuruseid VRV-e. CB VRV-i rakukestal on olemas sisemine membraanikiht ning tsütoplasmas membraanitoesed, mis pakuvad lisakaitset erinevate väliskeskkonna tegurite eest. Seetõttu nimetatakse VRV-i ka spoorilaadseks vormiks (Coleman jt, 2004). Villas võib VRV säilida 7-10 kuud, värskel lihal 1 kuu ja piimas rohkem kui 10 kuud (Eldin jt, 2017). VRV ei värvu Gram-i meetodil ning värvimiseks kasutatakse tavaliselt Giemsa meetodit (McCaul ja Williams, 1981). Infektsiooni jooksul esineb peremeesorganismis mõlemat rakuvormi (Coleman jt, 2004).

Rakku sisenedes haarab bakteri VRV kaasa osa rakumembraanist ning moodustab enda ümber kaitsva vakuooli, mida nimetatakse PV-ks. PV põhjustab peremeesrakus endolüsoosoomse maturatsiooni, mille tulemusena PV fagotsüteeritakse ja selle sisekeskkond muutub happeliseks (Vorth jt, 2007). Happeline keskkond aktiveerib *CB* VRV-i metabolismi, VRV areneb SRV-ks ja algab SRV-i paljunemine (Coleman jt, 2004). Paljunemise järgselt taandub SRV VRV-ks, peremeesrakk lüüsub ja vabastab VRV-d, võimaldades tsükli kordumise organismis ning patogeeni eritumise keskkonda (Voth jt, 2007).

CB-l esineb kaks antigeenset faasi: esimene faas, mis on virulentne, ja teine faas, mis on avirulentne (Porter jt, 2011). *CB* on sarnaselt teistele Gram-negatiivsetele bakteritele võimeline minema virulentsest faasist avirulentseks, kuid erinevalt teistest ei ole *CB* võimeline protsessi tagasi pöörama (Beare jt, 2018). Protsessi nimetatakse kirjanduses antigeense faasi variatsiooniks (Hackstadt jt, 1990). Virulentsuse määrajaks on *CB* väliskestal olevad lipopolüsahhariidid, mis esimese faasi puhul on terviklikud, kuid immunoloogiliselt ebapädevas peremehes (näiteks rakukultuurides või viljastatud munades) muteeruvad ebaterviklike lipopolüsahhariididega teiseks faasiks. Eelnev on oluline vaktsiinide tootmisel, sest teise *CB* faasi antikehi esineb organismis rohkem akuutse nakkusega ja esimese faasi kroonilise nakkuse puhul (Porter jt, 2011). Arvatakse, et lipopolüsahhariidid on seotud bakteri virulentsusega, mõjutades selle resistentsust ning makrofaagidesse sisenemise ja ellujäämisvõimet võimet (Arricau-Bouvery ja Rodolakis, 2005). Peremeesorganismi nakatab esimese faasi bakter, mis on võimeline pärssima immuunvastust (Van den Brom jt, 2015).

1.3. *Coxiella burnetii* reservuaarliigid ja nakkuse ülekanne

Metsloomadest on nakkusele vastuvõtlikud paljud linnuliigid ja loomad, näiteks maod, kilpkonnad, hirvelised, metssead, Euroopa jänesed, hiirelised, punarebased, metskassid, siilid, kangurud, hülged ja merilõvid. Metsloomi peetakse bakterile sobivaks elukeskkonnaks ja levitajateks (Celina ja Cerný, 2022). Lisaks on *CB*-d tuvastatud enam kui 40 kõvakestalisel ja 14 pehmel puugil. Puugid eritavad bakterit vereimemisel või väljaheidetega, mida on kuivamise järel võimalik sisse hingata. Samas arvatakse, et ämblikulaadsed on pigem olulised *CB* reservuaarid kui levitajad (Hussain jt, 2022). Kodumäletsejalisi peetakse olulisimateks *CB* nakkuse reservuaarideks inimesele. Lemmikloomadest võivad reservuaarideks olla ka koerad, kassid ja küülikud (Celina ja Cerný, 2022; Eldin jt, 2017).

Nakatunud loomad eritavad *CB*-d kõige rohkem platsenta, lootekestade ja sünnitusteede eritistega, vähemal määral ka piima, väljaheidete (rooja, uriini) ja tupeeritistega (Van den Brom jt, 2015; Eldin jt, 2017) ning eritumine võib kesta kuid (Celina ja Cerný, 2022; Eldin jt, 2017). Poegimisel eritub keskkonda miljardeid baktereid, mis peale kuivamist aerosoleeruvad ning on võimelised sissehingamisel uusi peremeesorganisme nakatama (Eldin jt, 2017). Loomade, sealhulgas kodumäletsejaliste, ning inimese nakatumine toimubki enamasti patogeeni sisaldavate aerosoolide sissehingamisel (Van den Brom jt, 2015). *CB* võib inimesele üle kanduda ka läbi nahavigastuste või suukaudselt (Eldin jt, 2017). Kaks nädalat pärast nakatumist on väikemäletsejaliste organismis tuvastavad tõusnud IgG ja immuunglobuliin M tasemed. Immuunglobuliinide tasemed püsivad kõrged kuni 13 nädalat, kuid immuunvastus ise võib kulgeda aastaid (Van den Brom jt, 2015).

1.3.1. Levimus kodumäletsejalistel

2022. aastal esines *CB* antikehi 3,6% testitud lamba-, 2,1% kitse- ja 2,7% veisekarjades Euroopas. 78,2% seroleidudest registreeriti Prantsusmaa, Saksamaa, Ungari ja Hispaania kodumäletsejaliste karjades (EFSA, 2023).

Euroopa Toiduohutuse Ameti (ingl *European Food Safety Authority* – EFSA) ja Haiguste Ennetamise ja Tõrje Euroopa Keskuse (ingl *European Centre for Disease Prevention and Control* – ECDC) 2023. aasta zoonooside raportis (tabel 1, lk 11) oli seroloogiliselt (ELISA) testitud lambaproove 1891, antikehi leiti 27,0% loomadel. 1294 ELISA-ga analüüsitud proovi tulemused pärinesid Itaaliast, neist 29,0% olid seroposiitvused. Otsetse meetoditega [polümeraasi ahelreaktsiooni (ingl *polymerase chain reaction* – PCR) jt testidega] analüüsiti 1040 looma proove, millest 4,7% olid DNA-le positiivsed. 1/3 otseste meetoditega testitud looma tasandi proovide tulemustest pärinesid Hollandist, *CB* DNA-le positiivseid tulemusi nende hulgas ei tuvastatud. Karjade lõikes leiti *CB* antikehi 0,75% 2270-st lambakarjast. 2251 karja tulemused edastati Poolast, neist antikehadele positiivsed olid 0,18%. Otseste meetoditega testides osutus 1947-st uuritud karjast *CB* DNA esinemisele positiivseks 23,8%. 1374 karja tulemused esitati Hispaaniast, neist 28,9% olid DNA esinemisele positiivsed. Võrreldes aastaga 2022 suurenes 2023. aastal testitud proovide arv 129,3% ja tõusis ka positiivsete tulemuste osakaal. Valimi suuruse erinevus võrreldes varasemate aastatega tuleneb peamiselt Belgias, Bulgaarias, Hollandis, Poolas ja Sloveenias alustatud *CB* planeeritud järelevalvest väikemäletsejalistel ning veistel. Mõned riigid esitasid väga vähe andmeid testimise kohta, sest

testitakse piirkonniti või valikuliste uuringutega. Viimaste hulka kuulub praegu ka Eesti. EFSA ja ECDC (2024) raportis rõhutatakse koksielloosi seire olulisust kliimamuutuse seisukohast, mis võib mõjutada haiguse levikut.

Tabel 1. *Coxiella burnetii* levimus lammastel aastatel 2019-2023 Euroopa Liidus (EFSA ja ECDC, 2024).

Seroloogia, looma tasand	2019	2020	2021	2022	2023
Liikmesriike	9	8	8	8	7
Testitud loomade arv	666	911	750	526	1891
Positiivsete loomade %	9,9	11,4	10,3	11,4	27,0
Otsesed meetodid, looma tasand					
Liikmesriike	4	4	5	7	7
Testitud loomade arv	224	752	85	358	1040
Positiivsete loomade %	18,3	8,7	5,9	3,6	4,7
Seroloogia, karja tasand					
Liikmesriike	1	2	1	1	3
Testitud karjade arv	25	17	2238	128	2270
Positiivsete karjade %	28,0	5,9	18,9	97,7	0,8
Otsesed meetodid, karja tasand					
Liikmesriike	4	4	5	6	4
Testitud karjade arv	2902	2890	3130	2812	1947
Positiivsete karjade %	1,2	1,4	4,1	4,9	23,8

1.3.2. Koksielloosi väljendus loomadel

Haigus esineb tavaliselt loomadel asümptomaatiliselt. Teadaolevalt avalduvad koksielloosi kliinilised tunnused kodumäletsejalistest ainult emasloomadel. Tiine emaslooma organismi sisenedes ründab *CB* trofoblasti rakke, mis asuvad loote allantokoorionis. Viimane muutub infektsiooni süvenedes tugevalt põletikuliseks ja pärssides platsenta funktsiooni. Tiinuse hilisemas staadiumis on reaktsiooni tagajärjeks sageli abort (Van den Brom jt, 2015). Enim esineb surnultsünde või aborte kitsedel, kaod võivad mõnel juhul ulatuda isegi 90%-ni (Mohabati-Mobarez jt, 2023). Üllataval kombel esineb abordilainele järgneval poegimishooajal kodumäletsejalistel vähem sigimisprobleeme (Van den Brom jt, 2015).

Visuaalsel vaatlusel näivad aborteerunud looted eakohaselt arenenud, vahel kergelt autoliüütilised. Aborteerunud emasloomade platsentad on põletikulised, kotüledoonid on paksenenud ja tavaliselt kaetud mädase kollakaspruuni eksudaadiga. Raskematel juhtudel võivad põletikulised alad olla nekrootilised. Mikroskoopiliselt on kotüledoonihattude rakkude tsütoplasmas märgata palju vakuole ning rakusisu tundub vahune. Histopatoloogiliselt võib aborteerunud loote maksast leida kergekujulist granulomatoosset maksapõletikku (Van den Brom jt, 2015).

Nakkuse akuutses faasis on võimalik *CB*-d isoleerida kitsede ja lammaste verest, maksast, kopsudest ja põrnast. Samas pole teada, kas patogeen pärsib nimetatud elundite funktsiooni. *CB*-le positiivsetes karjades esineb rohkem metriite, alakaalulisi või hingamis- ja seedeprobleemidega järglaseid ning tõusnud suremust (Van den Brom jt, 2015).

1.4. *Coxiella burnetii* nakkus inimesel

Euroopas on *CB* antikehade esinemissagedus üldpopulatsioonis 2-10% (Mobarez jt, 2023). Valdavalt on tuvastatud Euroopa riikides registreeritud QP-u juhtumite allikana väikemäletsejaliste karjad (Bellini jt, 2014; Gilsdorf jt, 2008; Gyuranecz jt, 2014). Näiteks Hollandi epideemia sai alguse piimakitsefarmidest (Van den Brom jt, 2015). Euroopas on vahemikus 2010-2016 QP sporaadiliselt esinenud kõige rohkem Saksamaal ja Prantsusmaal ning aastal 2017 tuvastati Bulgaarias kaks suuremat puhangut. Alates 2017. aastast on enim QP-u juhtumeid inimesel diagnoositud Hispaanias. EFSA raporti järgi kinnitati 2022. aastal kokku 719 inimese QP-u juhtumit. Võrreldes eelnenud aastaga suurenes esinemus poole võrra, järgides 2018. aastal alanud tõusutrendi (EFSA, 2023). Endeemilistes piirkondades on tähele pandud QP-u sesoonsust. Euroopas on levimus suurem tuulisematel aegadel samas kui troopilistes piirkondades seostatakse haiguse suurema levikuga vihmaperioode (Eldin jt, 2017).

Tänapäeval on QP sageli kutsehaigus (Van den Brom jt, 2015). Haiguse riskirühmadesse kuuluvad loomakasvatajad, veterinaarid ja tapamaja töötajad (Celina ja Cerný, 2022). Eraldi riskirühma moodustavad rasedad, kellel QP-u mõjul võib tekkida probleeme sünnitusel, aborte või loote väärarenguid (Eldin jt, 2017). Schimmer jt (2014) uurisid töölaseid riskitegureid veisepidajatel Hollandis. Riskiteguriteks olid suurem kari, täiskohaga töötamine, farmi lähedal elamine, laudas elavad linnud, kokkupuude sigadega ja kaudne kokkupuude närilistega. Nakatumise riski aitasid vähendada kinnaste kandmine poegimisel, robotlõpsmine ja tööriiete kandmine (Schimmer jt, 2014). Meestel tekivad võrreldes naistega tihedamini kliinilised

tunnused samas kui Hollandis märgati haigusjärgseid kõrvalnähte rohkem hoopis naistel. Kõrgema nakatumisriskiga on pigem vanemad kui noored inimesed (Eldin jt, 2017).

1.4.1. Kliinilised tunnused inimesel

QP inkubatsiooniperiood on 2-3 nädalat ning haigus kulgeb inimesel enamasti kas asümptomaatiliselt või iselimiterevalt. Prognoos on enamasti hea ja kliinilised tunnused kaovad tavaliselt 30 päeva jooksul. Surmaga lõppeb haigus kuni 1% juhtudest (Eldin jt, 2017).

Ägedale QP-le on iseloomulikud gripile sarnanevad tunnused nagu kõrge ja kauakestev palavik ning lihas- ja peavalu (Mohabati-Mobarez jt, 2023; Eldin jt, 2017). Harvadel juhtudel võib äge QP põhjustada kopsupõletikku, maksapõletikku, bradükardiat, oksendamist, kõhulahtisust, nahalöövet või neuroloogilisi nähte (Mohabati-Mobarez jt, 2023). Kopsupõletikuga kulgevat haigust esineb rohkem sporaadiliste juhtumite puhul samas kui maksapõletikku on märgatud peamiselt endeemilistes piirkondades (Eldin jt, 2017).

Ägedale haigestumisele järgnevalt võib inimesel välja kujuneda *CB* püsinakkus. Patogeen võib lokaliseeruda erinevates kehapiirkondades või organites, millest sõltuvad haiguse kliinilised tunnused. Püsinakkus võib avalduda näiteks endokardiidi, vaskulaarse, luu- või liigeseinfektsiooni või püsiva lümfadeniidina. Kõige sagedamini diagnoositakse endokardiiti, mis areneb välja eelkõige üle neljakümne aastastel südameklapiprobleemiga meestel. Haiguse kliinilisteks tunnusteks võivad olla vahelduv palavik, külmavärinad, kaalukadu, hepatosplenomegalia ning insult. Lahangul võib leida südameklappide kaltsifitseerumist ja fibroosi, põletikku ning vaskularisatsiooni (Eldin jt, 2017).

Vaskulaarse infektsioonina avalduvat *CB* püsinakkust, mis tabandab peamiselt rinna- ja kõhuaorti, märgati rohkem pärast QP-u puhangut Hollandis. Haiguse peamiseks komplikatsiooniks on aordi-kaksteistsõrmiksoole fistulid, mis võivad põhjustada tugevat verejooksu, trombe ja veresoonte rebendeid. Vaskulaarse infektsiooni prognoos on halb ja suremus on 18-26% (Eldin jt, 2017).

Raseduse ajal kulgeb nakkus enamasti kas asümptomaatiliselt või gripilaadsete haigustunnustega (Eldin jt, 2017). Million jt (2014) leidsid, et ema haigestumine suurendab loote hukkumise või väärarengute tekke riski 4-16 korda. Raseduse viimases trimestris nakatudes on sünnitusraskuste esinemise tõenäosus suurem (Million jt, 2014). Sündivad lapsed

on enamasti asümptomaatilised ja prognoos tervisele on hea. Neil jääb *CB* nakkus persisterima tavaliselt luudesse või liigestesse (Eldin jt, 2017).

1.5. Nakkuse seire ja kontrolli meetodid

CB seire meetodid jagatakse passiivseteks ja aktiivseteks. Passiivse seire puhul testitakse lühikese aja jooksul esinenud mitme abordi või surnultsünni juhtumeid PCR-i meetodil või karjast vähemalt 10 looma seerumiproove antikehadele. Aktiivset seiret kasutatakse puhangu ajal või endeemilistes piirkondades ja see kohustab igast abordijuhtumist teavitama. Positiivse proovi tuvastamisel rakendatakse kohustuslikke nakkuse leviku kontrolli meetmeid. Aktiivset seiret kasutatakse näiteks Belgias (Mori ja Roest, 2018).

CB leviku kontrollimeetmeid võib jagada kolmeks: bakteri eritumise, edasi kandumise ja inimkokkupuute vähendamine (Mori ja Roest, 2018).

Eritamise vähendamiseks kasutatakse vaksineerimist (Plummer, 2018). Euroopa Ravimiamet lubab Euroopas kasutada Coxevac® (Ceva Sante Animale, Libourne, Prantsusmaa) vaktsiini, mis on toodetud esimese faasi *CB* antigeenist ning kasutusel kitsedel, lammastel ja veistel (Celina ja Cerný, 2022). Lammaste ja kitsede puhul soovitatakse loomi vaksineerida enne esimest tiinust. Veiste puhul vaksineerimine ei välista aborte, kuid võib vähendada patogeeni eritamist (Van den Brom jt, 2015). *CB* eritamine väheneb Coxevac® vaktsiini puhul lühiajaliselt, mistõttu tuleb vaktsiini toime säilitamiseks loomi revaksineerida iga 9 kuu tagant (Boarbi jt, 2014).

CB VRV on keskkonnas väga vastupidav ja võib seal püsida kuid või aastaid. Tekitaja edasikandumise vähendamiseks eraldatakse tiined loomad ülejäänutest. Aborteerunud loode ja lootekestad hävitatakse põletamise või kompostimise teel (Ramo jt, 2022). Poegimisalad on soovitatav korralikult puhastada ja desinfitseerida näiteks 70% etanooli lahusega 30 minuti jooksul. Sõnnik tuleb komposteerida vähemalt 3 kuud enne transporti või väetisena kasutamist. Loomapidamisruumides ja farmi ümbruses tuleks vähendada liigset kuivust või tolmlenmist aerosoolide leviku vähendamiseks (Plummer jt, 2018). Karjatäienduseks toodavad loomad tuleks valida farmidest, kus *CB* puudub või levimus on väike ning võimalusel loomi testida (Van den Brom jt, 2015). Nakatunud tiinetel loomadel on tiinuse viimases trimestris võimalik raviks kasutada oksütetratsükliini, kuid antibiootikumide kasutamine loomadel *CB* nakkuse puhul ei ole soovituslik (Celine jt, 2022). Väga kõrge *CB* levimusega karjades haiguspuhangu

olukorras tiined emasloomad hukatakse. Korjused on soovituslik maha matta või põletada (Van den Brom jt, 2015).

Inimestel tuleks võimalusel vältida kokkupuudet teadmata tervisestaatusega loomadega, järgida hügieenimeetmeid ja kasutada enesekaitsevahendeid. Riskirühma kuuluvad inimesed, nagu südamehaiged, immuunsupressiivsed ja rasedad, peaksid võimalikke nakkusallikaid vältima (Plummer jt, 2018). Nakkusallikaks võib osutada ka koksiielloosi nakatunud loomade toorpiim või ebapiisavalt pastöriseeritud piim. Patogeeni hävitamiseks tuleb piima töödelda temperatuuril 72 °C 15 sekundit (Enright jt, 1957). Patogeeni tegeledes tuleb laboris rakendada bioturvalisuse 3. taset (Eldin jt, 2017).

1.6. Diagnostilised ja uuringutes kasutatavad meetodid

CB nakkuse kinnitamiseks loomadel ja inimesel on võimalik kasutada erinevaid diagnostilisi meetodeid.

Patogeeni on vereseerumist seroloogiliselt võimalik tuvastada näiteks mikroaglutinatsioon testi, komplemendi fiksatsiooni testi, immunofluoresentsanalüüsi ja ELISA meetoditel. Nimetatutest enim kasutatakse ELISA-t, mida saab kasutada ka piimaproovide analüüsil antikehade tuvastamiseks (Van den Brom jt, 2015). Jaspers jt (1994) uuringus kasutatud ELISA testi Ridascreen® AK EIA (Darmstadt, Saksamaa) tundlikkus antikehade määramisel väikemäletsejaliste vereseerumist on 82-100% ja spetsiifilisus 93-96%.

Inimestel diagnoositakse QP-u enamasti vereseerumist antikehade tiitrite järgi. Akuutsele nakkusele viitavad IgG tiitrid alates 1:200 ja persisteerivale infektsioonile IgG tiitrid alates 1:800. Antikehad võivad peale nakatumist jääda inimese kehasse aastateks (Luciani jt, 2019). Diagnostilistes vereproovides võib leida ka leukotsüütide arvu ja maksaensüümide tasemete tõusu (Eldin jt, 2017).

Hukkunud loomast või abordimaterjalist (loode, platsenta) on võimalik koguda koeproove *CB* antigeeni immuunhistokeemiliseks tuvastamiseks ja PCR uuringuteks (Van den Brom jt, 2015).

Laboringimustes on võimalik *CB*-d isoleerida ja kasvatada laborloomades, embrüogeensetes munades või rakukultuurides. Kasutades mune on bakterit võimalik enamasti isoleerida rebukoti rakkudest. Enim kasutatakse rakukultuure, sest nendes on võimalik *CB* arengut jooksvalt jälgida (Van den Brom jt, 2015).

1.6.1. Polümeraasi ahelreaktsiooni meetodid

Võimalikest tehnikatest kasutatakse sageli traditsioonilist PCR-i, reaalaaja-PCR-i, multipleks-PCR-i ja pesastatud PCR-i. Neid meetodeid saab kasutada analüüsidel *CB* genoomi järjestuste leidmiseks koeproovidest, abordi- ja poegimisjäänustest, tupeproovidest, piimast, roojast või seerumist. Positiivseid tulemusi on võimalik saada ka töödeldud loomsaadustest nagu juust, pastöriseeritud piim ja jogurt või keskkonna proovidest. Tankipiimaproovide PCR-i kasutati Hollandis edukalt *CB*-ga nakatunud kitse- ja lambakarjade tuvastamiseks (Van den Brom jt, 2015).

Kõige sagedamini tuvastatakse PCR-iga IS1111 geeni. Tegu on *CB* genoomis asuva umbes 960 aluspaari pikkuse transposooniga. IS1111 on *CB*-spetsiifiline ning seda leidub paljudes tüvedes, mis võimaldab seda kasutada diagnostilise markerina (Seshardi jt, 2003). IS1111 amplifitseerimisega saab tuvastada bakteri olemasolu proovis ning see on üks peamisi *CB* identifitseerimise ja nakkuse diagnoosimise meetodeid. IS1111 PCR-i kasutatakse laialdaselt laboratoorsetes testides, sealhulgas kliiniliste, loomsete ning keskkonnaproovide analüüsil. Geeni kasutamine võimaldab tundlikku ja spetsiifilist *CB* tuvastamist ning aitab kaasa kiirele ja usaldusväärsele QP-u diagnoosimisele (Klee jt, 2006). Teisteks PCR-iga tuvastatavateks *CB*-spetsiifilisteks geenideks on *is30A*, *comI*, *groEL*, *htpAB*, *16 s rRNA* ja *icd* (Elsa jt, 2015).

PCR uuringutel tuginevad ka mitmed genotüüpiseerimise meetodid. Mitme lookuse muutuva arvu tandemkorduste analüüs on molekulaarbioloogiline analüüsimeetod, mille abil uuritakse genoomi korduvate lõikude arvu ja järjestuse variatsioone üle mitme lookuse. Mitmete geenivaheliste piirkondade sekveneerimine seevastu kaasab *CB* geneetilise struktuuri ja tüvede erinevuste määramisse patogeeni genoomis leiduvaid mitmeid kodeerivate geenijärjestuste vahel asuvaid mittekodeerivaid piirkondi (Arricau-Bouvery jt, 2006). Genotüüpiseerimisel kasutatavad meetodid võimaldavad eristada erinevaid *CB* tüvesid ja alatüvesid, mis on oluline haiguspuhangute uurimisel, epidemioloogilises seires ja jälgimises (Seshadri jt, 2003). Ka aitab genotüüpiseerimine paremini mõista patogeeni epidemioloogiat, evolutsiooni ja geneetilist mitmekesisust ning välja töötada tõhusamaid ennetus- ja kontrollstrateegiaid (Tomaiuolo jt, 2021).

1.7. *Coxiella burnetii* levimus ja nakatumise riskitegurid Eestis

Eestis on *CB* levimust vähe uuritud. Veisekarjade seas levimuse hindamiseks kasutasid Neare jt (2023) 2012. aastal 504-st karjast kogutud üle aasta vanuste loomade piima- või seerumiproove. Lamba- ja kitsekarjade seerumiproovid koguti aastatel 2012-2013 188-st loomapidamisüksusest. Kari loeti *CB*-le positiivseks kui vähemalt ühest koondproovist tuvastati patogeenvastaseid antikehi. Lihaveisekarjades saadi levimuseks 6,67%, piimaveisekarjades 27,16%, lambakarjades 2,35% ning testitud 18-st kitsekarjast *CB* antikehi ei leitud. *CB* seropositiivseid karju leiti igast Eesti maakonnast (Neare jt, 2023).

Piimaveisekarjade riskitegurite uuringusse kaasati 72 karja. Karjade tervisestaatuse selgitamiseks uuriti tankipiimaproove ning riskitegurite selgitamiseks kasutati küsimustikku. Karjad, kus lakteerivad loomad on vabapidamisel või mis asuvad Eesti kirdeosas leiti olevat oluliselt suurema tõenäosusega *CB* antikehadele positiivsed kui karjad, kus loomad on lõaspidamisel ning mis asuvad edela-Eestis (Neare jt, 2023).

Järgnenud uuringus valiti 5 *CB*-le seropositiivset piimaveisekarja, kust koguti individuaalselt 318 loomalt piimaproov. Neist antikehadele positiivseid proove oli 76, mis moodustas 23,9% kaasatud veistest. Seropositiivsetest piimaproovidest eraldati DNA ja amplifitseeriti PCR meetodil *CB*-le spetsiifilise fragmendiga IS1111. Kümnes piimaproovis oli võimalik tuvastada *CB* DNA-d. Neist kolmele oli võimalik teha ka mitme lookuse muutuva arvu tandemkorduste analüüsi bakteri tüve tuvastamiseks. Proovidest tuvastati üks tervikliku ja kaks osalise profiiliga tüve. Edasisel analüüsil selgitati, et Eestis leitud *CB* tüved sarnanesid Euroopas veistel sigimisprobleeme põhjustanud tüvedele (Neare jt, 2025).

Riigi Laboriuuringute ja Riskihindamise Keskuse (LABRIS) 2023. aasta loomahaiguste uuringute aruande järgi teostati perioodil 1. jaanuar kuni 31. detsember 2023. veiste abortitekitajate kompleksuuringut kuuel korral. Ühel korral leiti aborteerunud lootest PCR meetodil *CB* DNA-d (Riigi Laboriuuringute ja Riskihindamise Keskus, 2024).

CB levimuse tuvastamiseks Eesti elanikel uuriti Eesti Geenivaramust saadud 1000 üldpopulatsiooni esindavat plasmaproovi. Lisaks koguti kuuest riskirühmast vabatahtikkuse alusel 610 vereproovi. Riskirühmadesse kuulusid veterinaarid, nende assistendid, 6. aasta veterinaarmeditsiini tudengid, piima- ja lihaveisekasvatajad, lamba- ja kitsekasvatajad ning jahimehed. ELISA meetodil osutus *CB* antikehadele positiivseks 9,62% veterinaaria valdkonnas töötavatest isikutest ja 7,73% piimaveisekasvatajatest, samas kui üldpopulatsioonis

oli levimus 3,9%. Vanus ja sugu selles uuringus antikehade levimust oluliselt ei mõjutanud (Neare jt, 2019).

2. LÕPUTÖÖ EESMÄRK

Lõputöö eesmärgiks oli tuvastada *CB* DNA esinemine Eesti lammaste abordimaterjalis.

3. MATERJALID JA METOODIKA

Käesolevas uuringus kasutati teise uuringu raames valitud karju ja kogutud proove.

3.1. Karjade valik ja proovide kogumine

Esialguses uuringus kasutati karjade valikul mugavusvalimi põhimõtet. Tegemist oli vaatleva ristlõikeuuringuga ning valimisse arvatud karjad paiknesid üle Eesti. Esmase uuringu karjade valik põhines varasemalt läbi viidud küsitluse tulemustel. Uuringust huvitatuteks loeti lambapidajad, kes edastasid küsitluse järgselt uurimisrühmale oma kontaktandmed. Esmane osalemiskutse saadeti huvitatud lambapidajatele detsembri alguses 2016 ning meeldetuletus 2 nädalat hiljem. Uuringus osalemine oli vabatahtlik ning lambapidajatel oli võimalus igal ajal ilma põhjuseta ning tagajärgedeta uuringust loobuda. Kõiki kogutud andmeid käsitleti konfidentsiaalselt.

Uuritavasse loompopulatsiooni arvati valimisse kuuluvate Eesti lambakarjade tiined uted.

Osalemiskutsele vastanud lambapidajatele saadeti proovivõtukomplektid hiljemalt detsembri lõpuks 2016. Komplektides sisaldasid materjalid (latekskindad, nummerdatud proovivõtutops, käärid, ute tervist puudutav nummerdatud küsimustik) viie proovi võtmiseks, esialgse uuringu infoleht, uuringus osalemise nõusolekuvorm, proovivõtujuhend ja mullikileümbrik proovide tagastamiseks. Värsked platsentaproovid võeti lambapidajate poolt uuringuperioodil aborteerunud või nurisünnitanud uttedelt. Proove koguti vahemikul 1. jaanuar - 31 detsember 2017. Kogumisperioodi pikendati kuni 30. juunini 2018. Kogutud proove säilitati enne uuringurühmale saatmist ja edasisi analüüsi sügavkülmutatult.

3.2. Proovide analüüs

3.2.1. DNA eraldamine

Käesolevas uuringus kasutati DNA eraldamiseks platsentaproovidest DNeasy® Blood & Tissue Kit-i (Qiagen™, Valencia, CA, USA) vastavalt tootja juhisele. Uurimismaterjal valmistati ette tükeldades 25 mg igast koeproovist eraldi mikrotsentrifuugi tuubidesse, negatiivseks kontrollprooviks lisati ühte tuubi destilleeritud vett. Siis lisati igale proovile 180 µl lüüsipuhvrit 1, 20 µl proteinaas K-d ja lüüsi proove 56 °C juures üleöö. DNA sidumiseks

lisati igasse proovituubi 400 µl lüüsi puhvri 2 ja 96% etanooli segu ning segati vorteksi abil põhjalikult. Seejärel pipeteeriti proovisegud ümber spetsiaalsetesse filtertuubidesse. Need omakorda asetati 2-ml läbivoolutuubidele ja komplekte tsentrifugeeriti 8 000 rpm juures ühe minuti jooksul. DNA pesemiseks paigutati proovidega filtertuubid uutele 2-ml läbivoolutuubidele ja lisati igale proovile 500 µl eelnevalt lahjendatud pesupuhvrit 1. Proove tsentrifugeeriti uuesti 8 000 rpm juures minuti jooksul. Seejärel tõsteti proovidega filtertuubid uuesti puhasse 2-ml läbivoolutuubidele, lisati 500 µl lahjendatud pesupuhvrit 2 ja tsentrifugeeriti 14 000 rpm juures 3 minutit. DNA voolutamiseks tõsteti proovidega filtertuubid mikrotsentrifugeerituubidele, lisati proovidele 200 µl elueerimispuhvrit, inkubeeriti proove toatemperatuuril 1 minut ning tsentrifugeeriti 8 000 rpm juures 1 minut. Eraldatud DNA-d säilitati edasiste uuringute ni -20 °C juures.

3.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon

DNA eraldamise järel uuriti proove kvalitatiivsel PCR meetodil *CB*-le spetsiifilise IS1111 geenifragmendi esinemisele. Praimeritena kasutati Trans-1 (5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3'; *forward*) ja Trans-2 (5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3'; *reverse*) nagu kirjeldatud Berri jt (2000) poolt. Positiivne kontrollproov saadi firmast Vircell Microbiologists (Granada, Hispaania), negatiivse kontrollproovina oli kasutusel destilleeritud vesi.

PCR läbiviimisel kasutati Vaidya jt (2008) kirjeldatud meetodikat. Protsessi esmane kaheminutiline denaturatsioon toimus temperatuuril 95 °C. Järgnes 45 tsükli pikkune DNA süntees. Esimesed viis sünteesitsükli sisaldasid denatureerimist 30 sekundi vältel, seondumist 1 minuti vältel ning sünteesi 1 minuti vältel. Denaturatsioon viidi nendes tsüklites läbi temperatuuril 94 °C, seondumine temperatuurivahemikus 66-62 °C (igas järgnevas tsükli alandati temperatuuri ühe kraadi võrra) ja süntees temperatuuril 72 °C. Järgnevad 40 tsükli koosnesid denaturatsioonist 30 sekundi vältel, seondumisest 30 sekundi vältel ning sünteesist 1 minuti vältel. Denaturatsioonid tehti temperatuuril 94 °C, seondumised temperatuuril 61 °C ja sünteesid temperatuuril 72 °C. Analüüsi viimane sünteesiprotsess toimus temperatuuril 72 °C ja kestis 10 minutit, mille järgselt lasti proovidel jahtuda 4 °C-ni. Analüüsitud proove säilitati visualiseerimiseni temperatuuril -20 °C.

3.2.3. Polümeraasi ahelreaktsiooni tulemuste visualiseerimine

PCR tulemusi visualiseeriti agaros-geel elektroforeesi meetodil. Geelelektroforeesi tööpõhimõte on anda DNA fragmentidele negatiivne laeng, mis põhjustab fragmentide liikumise teisel pool geeli oleva positiivse laengu suunas. Suuremad fragmendid liiguvad geelis aeglasemalt kui väikesed ja tulemused loetakse ultravioletvalguse all (Lee jt, 2012).

Agarosgeeli valmistamiseks segati 75 ml 1x tris-boraat-etüleendiamiintetraädikhappe (TBE; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) lahust ja 1,1 grammi agarosi. Segu kuumutati lahustumiseni ja jahutati 65 °C-ni. Seejärel lisati segule 5 µl etiidiumbromiidi, segati lahus korralikult läbi, valati ühtlase kihina ettevalmistatud vormi ning lasti taheneda.

Tahenenud agarosgeel eemaldati vormist, asetati elektroforeesi ning kaeti 1x TBE lahusega kuni lahuse nivoo oli geeli pinnast 2 mm kõrgemal. Analüüsitavad proovid ja kontrollproovid pipeteeriti geeli kaevukestesse. Mõlemale poole proove lisati tulemuste lugemise hõlbustamiseks suurusmarkerid. Pipeteerimisele järgnenud elektroforeesiprotsess kestis 120 voldi ja 70 ampri juures 40 minutit. Seejärel asetati agarosgeel transilluminaatorile. Analüüsitava proovi PCR tulemus loeti positiivseks kui proovi PCR produkti pikkus oli positiivse kontrollproovi PCR produkti pikkusega võrdne.

4. TULEMUSED

Esialgsest uuringust oli huvitatud 40 lambapidajat, kes edastasid uuringurühmale oma kontaktandmed. Esialgse uuringus kogutud materjalide põhjal arvati käesolevasse uuringusse 6 tootja karjad, kust oli võimalik saada platsentaproove. Osalenud karjad asusid Harju (n = 1), Lääne (n = 1), Rapla (n = 1), Saare (n = 2) ja Võru (n = 1) maakondades. Kaasatud karjadest oli õnnestunud koguda 1 ... 5 proovi karja kohta, kokku 17 lamba platsentaproovi. Ülevaate karjadest ja kogutud proovidest annab tabel 2.

Uuritud proovidest ei leitud *CB* DNA-le spetsiifilist IS1111 fragmenti ja seega võib proovid lugeda negatiivseks. Elektrofooresil andsid liikuvust proovid number 11, 12, 13 ja 14 (foto 1, lk 24), ent neist ühegi PCR produkt ei olnud sama pikk kui *CB* DNA-le positiivse kontrollproovi PCR produkt. Positiivsele kontrollproovile kõige lähedasema tulemuse andis proov number 12, seega teostati selle prooviga kordustestimine, mille tulemus osutus *CB* DNA esinemisele negatiivseks (foto 2, lk 24).

Tabel 2. Uuringusse kaasatud karjad

Kari	Maakond	Proove
1	Harju	1
2	Rapla	5
3	Lääne	2
4	Võru	2
5	Saare	1
6	Saare	5
N/A	N/A	1

Proove: karjast kogutud platsentaproovide arv; N/A: informatsioon puudub

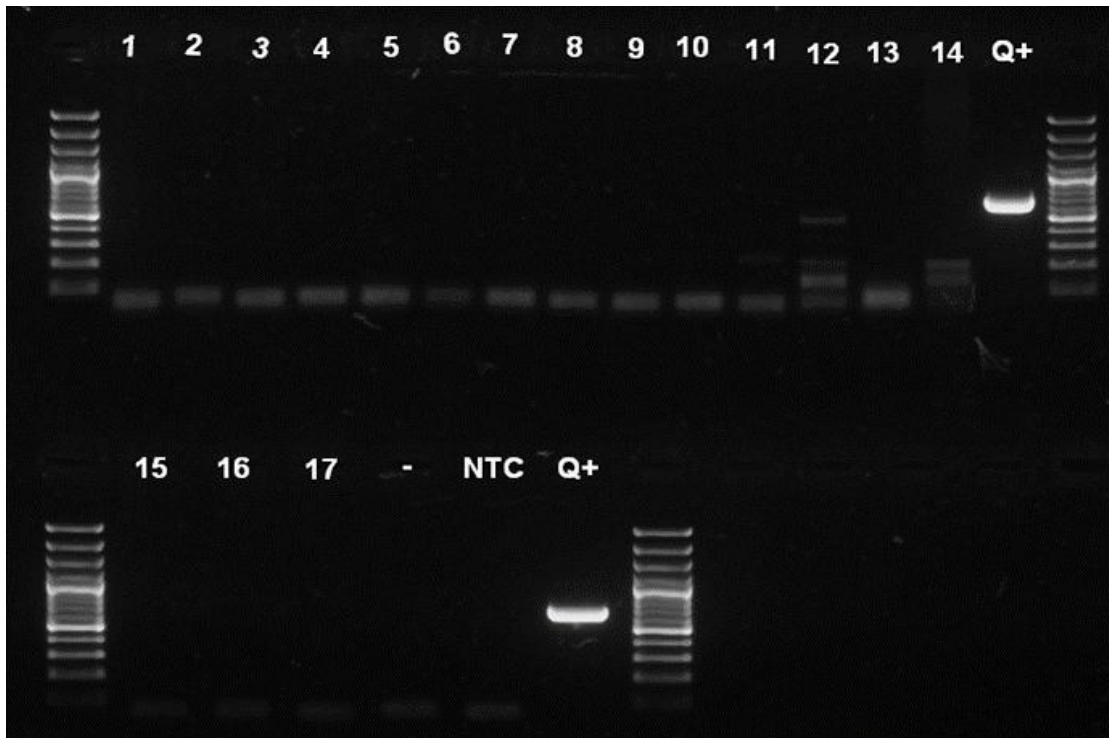


Foto 1. Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) geeli pilt *Coxiella burnetii* DNA tuvastamiseks individuaalsetest lammaste abordimaterjali eraldusest. NTC: negatiivne kontroll; Q+: *Coxiella burnetii* DNA positiivne kontroll; -: DNA eralduse kontroll.

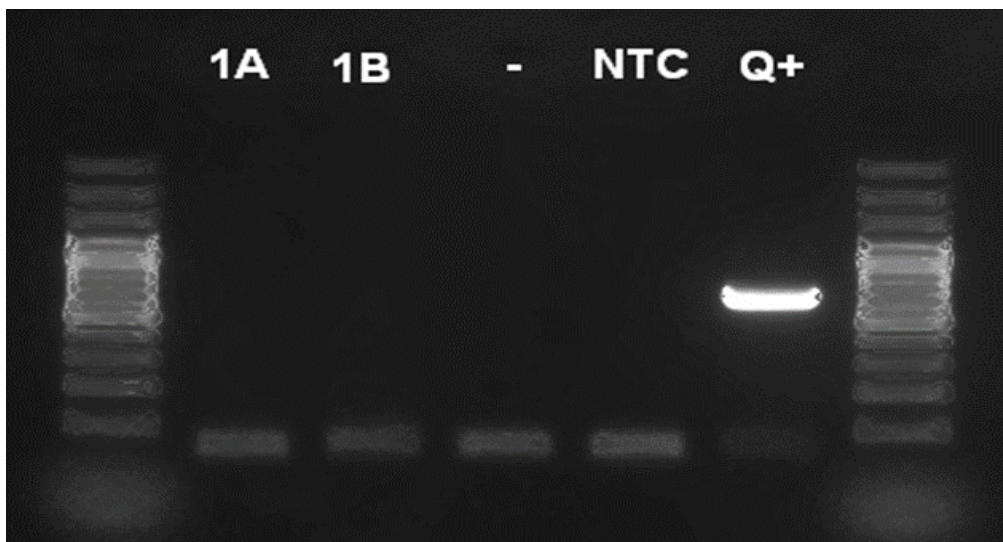


Foto 2. Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) geeli pilt proovi number 12 kontrolltestimisest IS1111 fragmendi esinemisele. Testimine on tehtud duplikaadina (1A ja 1B). Kontrolltestimisel DNA-d kummastki proovi duplikaadist ei tuvastatud. NTC: negatiivne kontroll; Q+: *Coxiella burnetii* DNA positiivne kontroll; -: DNA eralduse kontroll.

5. ARUTELU

Käesoleva uuringu eesmärgiks oli tuvastada *CB* DNA esinemine Eesti lammaste abordimaterjalis. Teaduslikes uuringutes varasemalt lammaste abordimaterjali *CB* esinemisele Eestis uuritud ei ole. *CB* DNA-d on leitud veiste piimaproovidest (Neare jt, 2023, 2025) ning 2023. aastal veise abordimaterjalist (Riigi Laboriuuringute ja Riskihindamise Keskus, 2024).

5.1. Karjade valim ja proovide arv

Esialgse uuringusse kaasatud karjade arv oli väga väike, hõlmates 6 vaid lambapidaja karju. Uuringus osalemine oli vabatahtlik ning see mõjutas kaasatud karjade arvu. Seega peegeldavad tulemused vaid osalenud karjade tervisestaatust. Huvi osalemise vastu võiks järgnevates uuringutes olla suurem kui selgitada loomaomanikele laiemalt probleemi tõsidust ning tutvustada neile *CB* levikut kirjeldavaid uuringuid Eestist ja mujalt maailmast.

Uuringusse arvatud proovide arv jäi samuti väga väikeseks. Osaliselt võib see olla tingitud madalast omanike huvist ja osalusaktiivsusest, ent vähene materjal võib viidata ka Eesti lammaste üldisele heale tervisele. Tulevikus võiks kaaluda uuringusse ka seireproovide ning praktiseerivate veterinaaride ja loomakasvatajate poolt laboratoorsesse diagnostikasse saadetavate proovide kaasamist.

Osalevate karjade ja kogutavate proovide arvu võis mõjutada proovide kogumise protseduur. Kiirel lammaste poegimisperiodil võis abordimaterjali kogumine omanikule ebamugavust tekitada. Alzuguren jt (2023) uuringus tõestati platsenta kotüledoonidelt võetud tampooniproovi tõhusus uurimismaterjalina, mis hõlbustaks tulevikus oluliselt proovide kogumist ning võiks järgnevates uuringutes olla kasutusel ka Eestis. Materjali kogumise protseduuri kergendamine võib motiveerida kasvatajaid uuringutest osa võtma.

5.2. *Coxiella burnetii* DNA abordimaterjalis

Selles uuringus lammaste platsentaproovidest *CB* dna-d ei leitud. Sarnaseid tulemusi andis Pritchard jt (2011) Suurbritannias läbi viidud uuring. Uuringus kasutati 192-lt lambalt kogutud proove, millest ühestki *CB* DNA-d ei leitud. Samas, 9-st uuringus kogutud kitsede platsentaproovist 1 ning 124-st veise platsentaproovist 9 olid *CB* DNA-le positiivsed (Pritchard jt, 2011). Varasemas Suurbritannias korraldatud uuringus tuvastati *CB* DNA-d 23-s PCR

meetodil uuritud 93-st ruminandi proovist. Veelgi enam, jälgides ühte nakatunud kitsekarja 31 kuu jooksul tuvastati 92,0% nii aborteerunud kui mitte-aborteerunud kitsede platsentast *CB*-d (Jones jt, 2010). Drastiliselt erinevaid tulemusi saadi Ontarios, Kanadas läbi viidud uuringus. Hazlett jt (2013) kogusid vahemikul 2009-2011 163 lammaste ning 96 kitsede loote- ja platsentaproovi. Neist vastavalt 69,0% ja 75,0% osutusid *CB* DNA-le positiivseteks. Võrreldes Suurbritannia uuringuga (Pritchard jt, 2011) oletasid autorid, et erinevused tulenevad erinevustest levivates *CB* tüvedes või pidamistingimustes (Hazlett jt, 2013). Pritchard jt (2011) uuringus võrdluseks toodud Clemente jt (2009) uuringus koguti aastatel 2006-2008 25 lammaste, 29 veiste ja 37 kitsede platsenta- ja loodete organiproovi. Neist vastavalt 9-st, 5-st ja 15-st leiti *CB* DNA-d. Käesolevas uuringus osutusid probleemiks väike valim ja madal *CB* levimus lambakarjades (Neare jt, 2023), mis ei võimaldanud patogeeni DNA-d platsentaproovidest tuvastada.

Alates aastast 2021 on koksilloos Euroopa Liidu Loomatervise seaduses klassifitseeritud kategooria E haigusena, kuuludes järelevalvet vajavate haiguste hulka (EFSA ja ECDC, 2024). Sellest ajast alates on Hispaanias ja Portugalis seire intensiivistunud. Alzuguren jt (2023) uurisid vahemikul aprill 2020-mai 2021 väikemäletsejaliste abordijärgseid platsenta- ja looteproove üle Pürenee poolsaare. Valimisse kuulus 302 lamba- ja 90 kitseproovi, millest vastavalt 47,7% ja 53,3% olid *CB*-le positiivsed. Positiivsetest proovidest pooltes oli *CB* kontsentratsioon oodatust madalam ning Alzuguren jt (2023) arvasid, et *CB* ise ei pruukinud olla aborti põhjustaja, vaid tihtipeale oli tegu koinfektsiooniga.

Veisetal põhinevatest uuringutest üks ulatuslikum viidi läbi Belgia lõunaosas. Saegerman-i jt (2022) uuringus koguti perioodil 31. juuli 2019 kuni 12. august 2020 kokku 3676 abordiproovi, millest juhuvalimi alusel 1212 proovi analüüsiti PCR-iga. Neist 103 proovi (8,5%) osutusid *CB*-le positiivseteks. Lisaks võrreldi uuringus PCR ja ELISA meetodite tulemuslikkust leviku hindamisel. Autorite soovitus on eelistada veistel PCR meetodi kasutamist, sest see kirjeldab paremini bakteri esinemist või ringlust karjas. Lisaks soovitavad autorid koguda abordiproovid 48h jooksul, et vähendada valenegatiivseid tulemusi. Uuringu karjade valim kattis väga hästi kogu Lõuna-Belgiat ning sobis bakteri levimuse hindamiseks piirkonnas (Saegerman jt, 2022).

Käesoleva uuringu tulemusi võis mõjutada kaasatud karjade asukoht. Uuringusse kaasatud lambakarjad asuvad teistes piirkondades kui karjad, mis eelnevalt tuvastatud antikehadele positiivsena. Antikehadele positiivsed karjad leiti Hiiu, Lääne-Viru, Saare ja Valga maakondadest (Kädi Neare, *isiklik kommunikatsioon* 2025). Sellest tulenevalt ei ole võimalik tulemuste põhjal teha üldistusi, vaid hinnata uuringusse arvatud proovide tulemusi. Varasemalt

on karjade asukoha mõju tulemustele kirjeldanud ka Schimmer jt, (2014), kus karja asukoht Hollandi lõunaosas oli nakatumise riskiteguriks.

5.3. Polümeraasi ahelrekatsiooni tulemust mõjutavad tegurid

Käesolevas uuringus andis üks proov valepositiivse tulemuse. PCR meetodi tulemusi võivad mõjutada materjali kogumise aeg, DNA amplifitseerimiseks kasutatav aluspaaride arv, antimikrobiaalne ravi ning inimlik viga.

Abordimaterjali puhul tuleks proov koguda esimesel võimalusel, kuid kuna *CB* on keskkonnatingimustele väga vastupidav, siis hilisem proovide kogumine ei mõjuta oluliselt DNA tuvastamist kudedest. Samas on proovi kogumise aeg eriti oluline seerumist ja verest antikehade tuvastamisel. PCR-i kasutamisel tuleks vereproov võtta kahe esimese haigusnädala jooksul, et vältida valenegatiivset tulemust (Niemczuk jt, 2014).

Schneeberger jt (2010) järeldasid oma uuringus, et DNA amplifitseerimiseks IS1111 fragmendist kasutatav aluspaaride arv mõjutab PCR-i tulemusi. Kui pole kindel, milline *CB* tüvi on haiguse põhjustanud, annab lühem fragment, näiteks 70 aluspaari, täpsemaid tulemusi. Pikemate fragmentide kasutamisel suureneb risk valenegatiivsetele tulemustele (Schneeberger jt, 2010).

Antimikrobiaalsete ravimite kasutamine vähendab bakteri kontsentratsiooni organismis ning võib viia valenegatiivsete tulemusteni. Antimikrobiaalide mõju testidele on uuritud peamiselt inimestel, kuid tulemused on üle kantavad ka loomadele (Kampschreur jt, 2015). Valepositiivseid tulemusi võib esineda ka testides sarnaste kliiniliste tunnustega haigusele, mille on põhjustanud mõni muu tekitaja. Sellisel juhul võib aidata praimerite muutmine (Schneeberger jt, 2010).

Valepositiivseid tulemusi võib tekitada ka inimlik eksimus. Eksimuste vältimiseks tuleb järgida labori nõudeid ning vältida proovide ja praimerite kontaminatsiooni (Vaca jt, 2022).

PCR meetodi tundlikkust ja spetsiifilisust aitab tõsta astmelise PCR-i kasutamine. Astmelise PCR-i puhul valitakse esimeses faasis seondumise protsessi jaoks 10 °C võrra kõrgem temperatuur, kui on praimerite sulamistemperatuuriks vajalik. Sulamistemperatuur saavutatakse siis, kui pooled DNA molekulid on üksikahelalised ja pooled kaksikahelalised. Järgnevalt alandatakse igas tsükli temperatuuri 1 °C võrra kuni saavutatakse

sulamistemperatuur. Teises faasis järgitakse tavapärasest seondumismeetodit sulamistemperatuuril 20-25 tsüklit (Korbie ja Mattick, 2008). Käesolevas uuringus kasutati samuti astmelist PCR meetodit.

JÄRELDUSED JA SOOVITUSED

Lõputöös *CB* DNA esinemist Eesti lammaste abordimaterjalis ei tuvastatud. Saadud tulemuste alusel ei ole võimalik teha üldistavaid hinnanguid bakteri esinemise kohta Eesti lambakarjades. Põhjuseks on väike karjade valim ja väike proovide arv, mis kattis üksikuid peamiselt Loode-Eestis asuvaid karju.

Uuringut peaks kordama tulevikus seire eesmärkidel suurema valimiga. Valimi suurendamiseks tuleks teha veel omanike seas teavitustööd *CB* olulisusest. Omanike motiveerimiseks võiks uurimismaterjali kogumiseks kasutusele võtta tampooniproovid aborteerunud või surnult sündinud loote platsenta kotüledoonidest. *CB* seire on muutumas olulisemaks nii rahva- kui karjatervise seisukohalt, sest bakter levib juba laialdaselt Kesk-Euroopas ja kliima soojenemisega levivad ka vektorid kaugemale põhja poole.

Astmelist PCR meetodit on kasutatud mitmes varasemas uuringus ja see annab häid tulemusi. Tulevikus võib mõelda PCR-i ja ELISA koos kasutamise peale. ELISA meetodil on võimalik hinnata karja seropositiivsust, mis kirjeldab paremini karja kokkupuudet patogeeniga. PCR testiga on võimalik määrata DNA esinemist üksikutel loomadel ainult eritamise perioodil, mistõttu on abordijäänused väga heaks uurimismaterjaliks. Mõlema meetodi kasutamisega oleks võimalik saada parem ülevaade *CB* levikust Eestis.

Tekitaja leviku vähendamiseks Eestis on oluline lambakasvatajaid teavitada võimalikest ennetusmeetoditest. Farmi tasandil on olulised üldine hügieen, poegivate loomade eraldamine ülejäänud karjast, surnud loodete korrektne hävitamine ja väljaheidete õige ladustamine. Bioturvalisuse meetmete jälgimisega on võimalik vähendada koksilloosi ja QP-u puhangu tekke võimalust Eestis.

TÄNUAVALDUSED

Täna südamest oma lõputöö juhendajat Kädi Nearet, kes on parim juhendaja, keda tudeng soovida võib. Sinu kannatlikkus, toetus ja pühendumus aitasid mind väga selle protsessi jooksul. Suur aitäh!

Täna ka Maarja Tagelit, kelle kogutud uurimismaterjali ja pidamisandmete põhjal on see töö üles ehitatud.

Lisaks soovin tänada oma lähedasi ja sõpru, kes mind toetasid kogu õppeprotsessi jooksul.

KIRJANDUSE NIMEKIRI

- Alzuguren, O., Domínguez, L., Chacón, G., Benito, A. A., Mencía-Ares, O. (2023). Infectious abortions in small domestic ruminants in the Iberian Peninsula: optimization of sampling procedures for molecular diagnostics. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1152289.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C. C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G. (2006). Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC microbiology*, 6, 1-14.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?. *Veterinary research*, 36(3), 327-349.
- Beare, P. A., Jeffrey, B. M., Long, C. M., Martens, C. M., Heinzen, R. A. (2018). Genetic mechanisms of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide phase variation. *PLOS pathogens*, 14(3), e1006922.
- Beck, M.D., Bell, J.A. (1949). Q fever studies in Southern California; an epidemiological study of 300 cases. *Public health reports*, 64, 41–56.
- Bellini, C., Magouras, I., Chapuis-Taillard, C., Clerc, O., Masserey, E., Peduto, G., Peter, O., Scharrer, S., Schuepbach, G., Greub, G. (2014). Q fever outbreak in the terraced vineyards of Lavaux, Switzerland. *New microbes and new infections*, 2(4), 93-99.
- Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A. (2000). The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary microbiology*, 72(3-4), 285-293.
- Boarbi, S., Mori, M., Rousset, E., Sidi-Boumedine, K., Van Esbroeck, M., Fretin, D. (2014). Prevalence and molecular typing of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk in Belgian dairy goats, 2009–2013. *Veterinary microbiology*, 170(1-2), 117-124.
- Celina, S.S., Cerný, J. (2022). *Coxiella burnetii* in ticks, livestock, pets and wildlife: a mini-review. *Frontiers in veterinary science*, 9, doi: 10.3389/fvets.2022.1068129.

- Clemente, L., Barahona, M. J., Andrade, M. F., Botelho, A. (2009). Diagnosis by PCR of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of domestic ruminants in Portugal. *The Veterinary record*, 164(12), 373.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J., Heinzen, R.A. (2004). Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *Journal of bacteriology*, 186(21), 7344-7352.
- Cordsmeier, A., Wagner, N., Luehrmann, A., Berens, C. (2019). Defying death – how *Coxiella burnetii* copes with intentional host cell suicide. *The Yale journal of biology and medicine*, 92(4), 619.
- Davis, G.E., Cox, H.R. (1938). A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public health reports*, 53, 2259–2309.
- Derrick, E.H. (1937). “Q” fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Medical journal of Australia*, 2, 281-299.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J.L., Maurin, M., Raoult, D. (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 115-190.
- Ellis, M. E., Smith, C. C., Moffat, M. A. (1983). Chronic or fatal Q-fever infection: a review of 16 patients seen in North-East Scotland (1967–80). *QJM: An international journal of medicine*, 52(1), 54-66.
- Elsa, J., Duron, O., Séverine, B., González-Acuña, D., Sidi-Boumedine, K. (2015). Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. *Infection ecology and epidemiology*, 5, 29230, doi: 10.3402/iee.v5.29230.
- Enright, J. B., Sadler, W. W., Thomas, R. C. (1957). Pasteurization of milk containing the organism of Q fever. *American journal of public health and the nations health*, 47(6), 695-700.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2023). The European Union one health 2022 zoonoses report. *European food safety authority journal*, 21(12), 186-193.

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2024). The European Union one health 2023 zoonoses report. *EFSA journal*, 22(12), e9106.

Gilsdorf, A., Kroh, C., Grimm, S., Jensen, E., Wagner-Wiening, C., Alpers, K. (2008). Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiology and infection*, 136(8), 1084-1087.

Gyuranecz, M., Sulyok, K. M., Balla, E., Mag, T., Balazs, A., Simor, Z., Denes, B., Hornok, S., Bajnoczi, P., Hornstra, H. M., Pearson, T., Keim, P., Dan, A. (2014). Q fever epidemic in Hungary, april to july 2013. *Eurosurveillance*, 19(30), 5.

Hackstadt, T. E. D. (1990). The role of lipopolysaccharides in the virulence of *Coxiella burnetii*. *Annals of the New York academy of sciences*, 590(1), 27-32.

Hazlett, M. J., McDowall, R., DeLay, J., Stalker, M., McEwen, B., van Dreumel, T., Spinato, M., Binnington, B., Slavic, D., Carman, S., Cai, H. Y. (2013). A prospective study of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* infection concurrently with other major pathogens. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 25(3), 359-368.

Hussain, S., Perveen, N., Hussain, A., Song, B., Aziz, M. U., Zeb, J., Li, J., George, D., Cabezas-Cruz, A., Sparagano, O. (2022). The symbiotic continuum within ticks: opportunities for disease control. *Frontiers in microbiology*, 13, 854803.

Jaspers, U., Thiele, D., Krauss, H. (1994). Monoclonal antibody based competitive ELISA for the detection of specific antibodies against *Coxiella burnetii* in sera from different animal species. *Zentralblatt für bakteriologie*, 281(1), 61-66.

Jones, R. M., Twomey, D. F., Hannon, S., Errington, J., Pritchard, G. C., Sawyer, J. (2010). Detection of *Coxiella burnetii* in placenta and abortion samples from British ruminants using real-time PCR. *Veterinary record*, 167(25), 965-967.

Kampschreur, L. M., Wegdam-Blans, M. C., Wever, P. C., Renders, N. H., Delsing, C. E., Sprong, T., van Kasteren, M. E. E., Bijlmer, H., Notermans, D., Oosterheert, J. J., Stals, F. S., Nabuurs-Franssen, M. H., Bleeker-Rovers, C. P. Dutch Q Fever Consensus Group.

(2015). Chronic Q fever diagnosis—consensus guideline versus expert opinion. *Emerging infectious diseases*, 21(7), 1183.

Klee, S. R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B. (2006). Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *Bmc microbiology*, 6, 1-8.

Korbie, D. J., Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9), 1452-1456.

Kumaresan, V., Wang, J., Zhang, W., Zhang, Y., Xu, D., Zhang, G. (2022). *Coxiella burnetii* virulent phase I and avirulent phase II variants differentially manipulate autophagy pathway in neutrophils. *Infection and immunity*, 90(3), doi: 10.1128/iai.00534-21.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments*, (62), 3923. doi: 10.3791/3923.

Luciani, L., L'ollivier, C., Million, M., Amphoux, B., Edouard, S., Raoult, D. (2019). Introduction to measurement of avidity of anti-*Coxiella burnetii* IgG in diagnosis of Q fever. *Journal of clinical microbiology*, 57(10), doi: 10.1128/jcm.00539-19.

Marmion, B. P., Stoker, M. G. P., McCoy, J. H., Malloch, R. A., Moore, B. (1953). Q fever in Great Britain. an analysis of 69 sporadic cases, with a study of the prevalence of infection in humans and cows. *Lancet*. 503-510.

McCaul, T.F., Williams, J.C. (1981). Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *Journal of bacteriology*, 147(3), 1063-1076.

Million, M., Roblot, F., Carles, D., d'Amato, F., Protopopescu, C., Carrieri, M.P., Raoult, D. (2014). Reevaluation of the risk of fetal death and malformation after Q fever. *Clinical infectious diseases*, 59(2), 256-260.

Mohabati-Mobarez, A., Baseri, N., Khalili, M., Mostafavi, E., Esmaeili, S. (2023). Genotyping and phylogenetic analysis of *Coxiella burnetii* in domestic ruminant and

clinical samples in Iran: insights into Q fever epidemiology. *Scientific reports*, 13(1), doi: s41598-023-47920-0.

Mori, M., Roest, H. J. (2018). Farming, Q fever and public health: agricultural practices and beyond. *Archives of public health*, 76(1), 2.

Neare, K., Janson, M., Hütt, P., Lassen, B., Viltrop, A. (2019). *Coxiella burnetii* antibody prevalence and risk factors of infection in the human population of Estonia. *Microorganisms*, 7(12), doi: 10.3390/microorganisms7120629.

Neare, K., Tummeleht, L., Lassen, B., Viltrop, A. (2023). *Coxiella burnetii* seroprevalence and associated risk factors in cattle, sheep, and goats in Estonia. *Microorganisms*, 11(4), doi: 10.3390/microorganisms11040819.

Neare, K., Tummeleht, L., Jinnerot, T., Lassen, B., Viltrop, A. (2025). Molecular characterisation of *Coxiella burnetii* dairy cattle strains in Estonia. *Frontiers in veterinary science*, 12, 1568226.

Niemczuk, K., Szymańska-Czerwińska, M., Śmietanka, K., Bocian, Ł. (2014). Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. *Veterinary microbiology*, 171(1-2), 147-152.

Plummer, P. J., McClure, J. T., Menzies, P., Morley, P. S., Van den Brom, R., Van Metre, D. C. (2018). Management of *Coxiella burnetii* infection in livestock populations and the associated zoonotic risk: a consensus statement. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(5), 1481-1494.

Porter, S. R., Czaplicki, G., Mainil, J., Guattéo, R., Saegerman, C. (2011). Q fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *International journal of microbiology*, 2011(1), 248418.

Pritchard, G. C., Smith, R. P., Errington, J., Hannon, S., Jones, R. M., Mearns, R. (2011). Prevalence of *Coxiella burnetii* in livestock abortion material using PCR. *Veterinary record-english edition*, 169(15), 391.

- Ramo, M.D.L.A., Benito, A.A., Quílez, J., Monteagudo, L.V., Baselga, C., Tejedor, M.T. (2022). *Coxiella burnetii* and co-infections with other major pathogens causing abortion in small ruminant flocks in the Iberian peninsula. *Animals*, 12(24), doi: 10.3390/ani12243454.
- Riigi Laboriuuringute ja Riskihindamise Keskus. (2024). Loomahaiguste uuringute aruanne 2023. a. https://labris.agri.ee/sites/default/files/documents/2024-08/Aastaruanne_2023_loomahaigused.pdf (vaadatud 09.05.2025).
- Saegerman, C., Grégoire, F., Delooz, L. (2022). Diagnosis of *Coxiella burnetii* cattle abortion: a one-year observational study. *Pathogens*, 11(4), 429.
- Schimmer, B., Notermans, D. W., Harms, M. G., Reimerink, J. H. J., Bakker, J., Schneeberger, P., Mollema, L., Teunis, P., van Pelt, W., Van Duynhoven, Y. (2012). Low seroprevalence of Q fever in the Netherlands prior to a series of large outbreaks. *Epidemiology and Infection*, 140(1), 27-35.
- Schimmer, B., Schotten, N., Van Engelen, E., Hautvast, J. L. A., Schneeberger, P. M., Van Duynhoven, Y. T. H. P. (2014). *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk for humans on dairy cattle farms, the Netherlands, 2010–2011. *Emerging infectious diseases*, 20(3), 417.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L., Tettelin, H., Davidsen, T.M., Beanan, M.J., Deboy, R.T., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Madupu, R., Dodson, R.J., Khouri, H.M., Lee, K.H., Carty, H.A., Scanlan, D., Heinzen, R.A., Thompson, H.A., Samuel, J.E., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100, 5455–5460.
- Tomaiuolo, S., Boarbi, S., Fancello, T., Michel, P., Desqueper, D., Grégoire, F., Callens, J., Fretin, D., Devriendt, B., Cox, E., Mori, M. (2021). Phylogeography of human and animal *Coxiella burnetii* strains: genetic fingerprinting of Q fever in Belgium. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 625576.
- Vaca, D. J., Dobler, G., Fischer, S. F., Keller, C., Konrad, M., von Loewenich, F. D., Orensa, S., Sapre, S. U., van Belkum, A., Kempf, V. A. J. (2022). Contemporary diagnostics for medically relevant fastidious microorganisms belonging to the genera *Anaplasma*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Orientia* and *Rickettsia*. *FEMS microbiology reviews*, 46(4), fuac013.

- Vaidya, V. M., Malik, S. V. S., Kaur, S., Kumar, S., Barbuddhe, S. B. (2008). Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. *Journal of clinical microbiology*, 46(6), 2038-2044.
- Van den Brom, R., Van Engelen, E., Roest, H.I.J., Van der Hoek, W., Vellema, P. (2015). *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Veterinary microbiology*, 181(1-2), 119-129.
- Van der Hoek, W., Hogema, B.M., Dijkstra, F., Rietveld, A., Wijkmans, C.J., Schneeberger, P.M., Zaaijer, H.L. (2012). Relation between Q fever notifications and *Coxiella burnetii* infections during the 2009 outbreak in the Netherlands. *Eurosurveillance*, 17(3), doi: 10.2807/ese.17.03.20058-en.
- Voth, D. E., Heinzen, R. A. (2007). Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cellular microbiology*, 9(4), 829-840.
- Wegdam-Blans, M.C.A., Kampschreur, L.M., Delsing, C.E., Bleeker-Rovers, C.P., Sprong, T., van Kasteren, M.E.E., Notermans, D.W., Renders, N.H.M., Bijlmer, H.A., Lestrade, P.J., Koopmans, M.P.G., Nabuurs-Franssen, M.H., Oosterheert, J.J., Dutch Q Fever Consensus Group. (2012). Chronic Q fever: review of the literature and a proposal of new diagnostic criteria. *Journal of infection*, 64(3), 247–259.

LISAD

Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Marelle Mägi,
 sünniaeg 13.09.1999,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö
Coxiella burnetii esinemine Eesti kodumäletsejaliste abordimaterjalis,
mille juhendaja on Kädi Neare,
 - 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
 - 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
 - 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks
kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor
/allkirjastatud digitaalselt/

Tartu, 12.05.2025

Juhendaja kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

Kädi Neare
/allkirjastatud digitaalselt/
Tartu, 12.05.2025