



## Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis に基づく

### ウシ胎盤から検出した *Coxiella burnetii* DNA の遺伝子型別

村松 康和<sup>1)</sup>、大沢 悠平<sup>1)</sup>、川岸 孝博<sup>3)</sup>、谷口 稚子<sup>2)</sup>、内田 玲麻<sup>1)</sup>、遠藤 大二<sup>2)</sup>、上野 弘志<sup>1)\*</sup>

<sup>1)</sup>酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 衛生・環境学分野 人獣共通感染症学ユニット、<sup>2)</sup>酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 生体機能学分野 獣医放射線学ユニット、<sup>3)</sup>酪農生産ステーション、〒069-8501 北海道江別市文京台緑 582 番地。

\*責任著者：上野弘志 ([y-mrmt@rakuno.ac.jp](mailto:y-mrmt@rakuno.ac.jp))

#### 要 約

*Coxiella burnetii* は世界各地で発生が認められる人獣共通感染症 Q 熱の原因菌である。近年、Q 熱の診断や *C. burnetii* の検出方法は分子疫学的手法が主流になりつつある。今回、日本では初めてウシの胎盤を材料にして Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) による *C. burnetii* の分子疫学的調査を行なった。酪農学園大学・酪農生産ステーション(旧：酪農学園大学附属農場)のウシ胎盤由来 DNA 計 50 サンプルのうち、*C. burnetii* の IS1111 領域を標的として実施した Real time PCR で陽性、かつ DNA 量が多いサンプルについて、MLVA による遺伝子型別を試みた。PCR の陽性率は 42%(21/50)で、過去の調査時とほぼ同等を維持していることが示された。Real time PCR 陽性の 6 サンプルで 12 遺伝子座を対象とする MLVA 遺伝子型を明らかにした。その結果、酪農生産ステーションのウシに蔓延・維持されている *C. burnetii* の MLVA 遺伝子型は、従来報告されていない独自のものである事が判明した。今回の調査で得られた MLVA 遺伝子型に関する知見とあわせ、これまでのところ当該ステーション関係者、及び近隣住民に Q 熱発症報告はないことから、本学・酪農生産ステーションのウシには、ヒトに対して病原性の低い菌が蔓延していることが考えられる。

#### 緒 言

*Coxiella burnetii* を原因菌とする Q 熱は、世界各地で発生が認められる人獣共通感染症でヒトに多様な症状が認められる。Q 熱患者ではインフルエンザ様症状を主徴とする急性型が多く、ほとんどの場合は予後良好だが、稀に心内膜炎や肝炎といった症状を示し予後不良の慢性型の病態を示すこ

とがあり、この場合は致死率が高くなる。ヒトへの感染源としては、ウシ、ヤギおよびヒツジなどの家畜や、イヌやネコなど愛玩動物が重要である。これらの動物では不顕性感染が多いが、妊娠動物では流産や繁殖障害を引き起こす[2, 5, 9]。*C. burnetii* は感染動物の乳汁、流産胎仔、胎盤、羊水、糞尿から排泄され、ヒトは主に本菌を含むエアロ

ゾルの吸引により感染する [1, 15, 30]。特に胎盤は本菌により高濃度に汚染されることが知られており [4]、感染動物の出産を原因とするヒトの集団感染事例が報告されている [20]。

Q 熱の流行が認められる欧米諸国では、起原病原体である *C. burnetii* に関する研究とともに Q 熱診断方法の開発が進められており、近年は血清学的診断から分子疫学的方法による感染診断が主流になりつつある [10]。そうした分子疫学的手法のうち、*C. burnetii* のマルチコピー挿入配列 IS1111 を標的とした Real time PCR が本菌検出において特異度、感度ともに優れた方法であることが報告されている [16, 23]。*C. burnetii* には様々な病態を示す多くの菌株の存在が知られており [17, 19, 24]、これらの菌株が示す病原性の違いと各菌株のゲノム DNA 上の多型との関連を精密かつ詳細に探るための新たな遺伝子型別方法が開発、報告されている。

Multiple loci variable-number tandem repeat analysis (MLVA) は、*C. burnetii* ゲノム DNA において最大で 17 遺伝子座における繰り返し配列の挿入数の違いから型別を行う方法で、multiple locus sequence typing (MLST) よりも識別力が高いとされている [14]。これらの遺伝子型別方法では、*C. burnetii* 分離株由来の DNA のみならず、感染個体の臓器等の各種サンプルからの抽出 DNA を用いて行うことが出来る [11]。2007 年から 2009 年にかけてオランダではヤギ農家を中心に Q 熱が大流行し、急性型の患者数は 3522 人、特に被害の大きかった 2009 年には 2354 人が発症し死者は 6 名に及んだ。政府機関による抗体調査などから、潜在的な感染も含めた感染者は 44000 人以上と考えられている [26]。オランダをはじめ諸外国では、流行地域の動物、人及び環境からのサンプルで、前述の新たに開発された様々な遺伝子型別方法を用いた調査が行われ、各菌株の病原性と遺伝子型との関連について多くの有用な知見が得られている [3, 6-8, 14, 15, 18, 22]。

日本国内においても Q 熱の発生は認められるが、患者の報告数は少ない [2, 27, 28]。その理由としては、Q 熱に特有な症状が乏しく、発症しても多くの場合インフルエンザなどのいわゆる風邪として看過されていることが考えられる [28]。日本では *C. burnetii* の多くの菌株がウシなどの家畜やイヌ・ネコなどの伴侶動物から分離されており、こ

れらの動物種では抗体陽性率も相応に高いことが報告されている。また、こうした家畜や伴侶動物との接触機会が多い獣医師では調査対象のうち約 22% で *C. burnetii* に対する抗体保有が認められ、一般健康人 (3.3%) との比較で明らかに高い抗体陽性率であることが示された一方、これら抗体陽性者における Q 熱発症歴の有無は不明である [13]。これには、診断方法が普及していないことに加え、日本分離株が諸外国の菌株と比べ、病原性が低い可能性が考えられる [2, 28]。しかしながら、国内でモノクローナル抗体を用いた方法、病原性関連遺伝子に対する制限酵素断片長多型などの分子疫学的手法が行われたが、いずれの方法でも病原性との関連は明らかにされていない [2, 12]。日本ではヒトへの重要な感染源となるウシ胎盤を用いた *C. burnetii* 特異な DNA 検出に関する報告はなく、MLVA などの分子疫学的手法による *C. burnetii* 病原性と遺伝子型との関連についての調査報告も認められない。

そこで今回、ウシ胎盤由来 DNA を用いて IS1111 を標的とした Real time PCR を行い、ウシ胎盤における *C. burnetii* 保菌状況について調査を行った。さらに、ウシ胎盤に潜む *C. burnetii* について MLVA による遺伝子型別を実施し、世界各地の遺伝子型別データとの比較に基づき、その分子疫学的性状について考察した。

## 材料および方法

**1. 供試 DNA:** 2011 年 5 月から 2012 年 3 月までの期間に酪農学園大学・酪農生産ステーション (旧 : 酪農学園大学附属農場) のウシ 50 頭から、胎盤を採取した。得られた胎盤より切除した各 200mg の部分標本から Gentra Puregene Tissue Kit (QIAGEN、東京、日本) を使用し、プロトコールに従って抽出した DNA 計 50 検体を供試した。ウシ胎盤における *C. burnetii* DNA 陽性率調査のための Real time PCR では Nine Mile I 株 DNA を、MLVA のための conventional PCR では Nine Mile I 株及び Henzerling 株 DNA を、それぞれ陽性対照 DNA として用いた。

**2. IS1111 を標的とした Real time PCR による本学付属農場のウシ胎盤由来 DNA からの *C. burnetii* 特異 DNA 抽出:** *C. burnetii* の挿入配列である IS1111 の保存配列のうち 70bp を対象とする TaqMan プローブ法による Real time PCR を行った [23]。Real time

PCR に使用したプライマーは Forward : 5'-AAAACGGATAAAAAGAGTCTGTGGTT-3' 及び Reverse : 5'-CCACACAAGCGCGAT TCA-3'を、プローブとして 5'-6-carboxyfluorescein (FAM) -AAAGCACTCATTGAGCGCCGCG-6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) -3'を用いた[23]。反応液組成は、LightCycler® 2.0 Master Mix 5×conc (ロシュ・ダイアグノティクス株式会社、東京、日本)を 4μL 加え、プライマー及びプローブの最終濃度は 10μM 及び 5μM に調製し、テンプレート DNA を 5μL 加え、滅菌蒸留水を加えて総量 20μL にメスアップした。増幅反応は 95°C で 10 分間加熱した後、95°C で 10 秒間、60°C で 20 秒間及び 72°C で 1 分間加熱のサイクルを 45 回行った。実験及び解析は LightCycler® 2.0 (ロシュ・ダイアグノティクス株式会社) を用いて行った。過去の報告を参考に、crossing point (Cp) 値 35 以上を陰性、35 未満を陽性とした[23]。なお、参考文献では Cp 値ではなく、cycle threshold (C<sub>T</sub>) 値を用いているが、これは参考文献[23]と本調査で用いた機種ならびに製造者が異なることに基づく相違であって、Cp 値および C<sub>T</sub> 値の何れも「サンプルの蛍光値がバックグラウンド値を超えたときのサイクル数」を表している。

**3. MLVA による *C. burnetii* の遺伝子型別:** Cp 値 35 未満の Real time PCR 陽性サンプルのうち、conventional PCR を行う上で十分な *C. burnetii* DNA 濃度を有すると見込まれた Cp 値 33 未満の Real time PCR 陽性サンプルを対象に、*C. burnetii* の 17 遺伝子座に対応するプライマー群を用いて conventional PCR を行った。MLVA 解析の為に conventional PCR に用いたプライマー群は表 1 に示した[3]。PCR 反応液は、最終濃度 0.5U の Platinum® TaqDNA Polymerase (Invitrogen、東京、日本)、1×PCR Buffer (10×PCR Buffer ; タカラバイオ株式会社、大津、日本)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、各 200μM の dNTPs、300nm の各プライマーに、テンプレート DNA は 1 から 3μL を加え、滅菌蒸留水で総量 20μL とした。増幅反応は 94°C で 2 分間加熱した後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間及び 72°C で 1 分間加熱のサイクルを 45 回行い、続いて 72°C で 3 分間加熱した。PCR 反応終了後、各 PCR 反応液 5μL について 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後、0.005% エチジウムブロマイド加 Tris-Borate-EDTA 溶液に 30 分間浸漬し、UV イル

ミネーター(TOYOBO、大阪、日本)を用いて可視化した。標的とした DNA 断片長の増幅が認められた後、さらにキャピラリー電気泳動による解析に供試した(MCE - 202 MultiNA; 島津製作所、京都、日本)。キャピラリー電気泳動は、試薬キット (DNA-1000 ; 島津製作所)、Syber® Gold (Invitrogen)、TE バッファ 10mM Tris-HCl 及び ΦX174 DNA/Hae III Markers (プロメガ株式会社、東京、日本)を用い各試薬の調整は MCE - 202 MultiNA (島津製作所) のプロトコールに従い行った。サンプルは PCR プレート (日本ジェネティクス、東京、日本) に 6μL ずつアプライした。ms07 及び ms12 に関しては、アガロースゲル電気泳動法のみで判定した。

### 結果と考察

IS1111 を標的とした Real time PCR による *C. burnetii* 特異 DNA の検出を行った結果、本学酪農生産ステーションのウシ胎盤由来 DNA 50 サンプル中、Cp 値 35 未満の PCR 陽性は 21 サンプルであった (表 2)。陽性率は 42% で、旧・本学付属農場において約 20 年前に我々が実施した *C. burnetii* 特異 DNA の検出結果 (62 検体中 21 検体が陽性、陽性率: 33.9%) と比べ、若干の相違を示した[21]。これは、検査対象としたサンプルの違い (生乳と胎盤)、また、検査方法の違い (PCR-ELISA と Real-time PCR) が影響していることが考えられる。前回の調査時点と比較して、近年の検査装置の発達や検出感度の向上は著しいものがあることを考慮にいれると、本学酪農生産ステーションのウシにおける *C. burnetii* 陽性率について、大きな変動は無く、一定のレベルで維持されてきたものと推察される。

Real time PCR 陽性 21 サンプルのうち、conventional PCR を行う上で十分な *C. burnetii* DNA 濃度を有すると推定した Cp 値 33 未満の 12 サンプルを対象として MLVA を実施した (表 2)。MLVA のための conventional PCR を実施した 17 遺伝子座のうち、12 遺伝子座 (ms07、12、20-24、26-28、33、及び 36) に関する結果について表 3 にまとめた。残りの 5 遺伝子座 (ms01、03、30、31、及び 34) では陽性対照において文献と異なる非特異的な増幅が認められた[3]。12 遺伝子座における MLVA において、12 サンプルのうち、6 サンプルで結果が得られた (Nos. 2, 3, 21, 22, 42, 46 ; 表

3)。本論文は、日本のウシ胎盤由来の *C. burnetii* について MLVA による遺伝子型別を行った結果に関する初めての報告である。6 サンプルで得られた 12 遺伝子座における MLVA 遺伝子型を相互に比較すると、数か所の遺伝子座で挿入配列の繰り返し回数においてごくわずかの違いが認められたが、サンプル間で大きな違いは認められなかった (Nos. 2, 3, 21, 22, 42, 46 ; 表 3)。

今回の調査で 6 サンプルのウシ胎盤由来 *C. burnetii* DNA から得られた 12 遺伝子座における MLVA 遺伝子型は、ヒト及び家畜に対して病原性を示す既知の *C. burnetii* の MLVA 遺伝子型と明確に区別できた (表 3)。陽性対象として用いたダニ由来の Nine Mile I 株は人に病原性を有することが知られているが、ms12、ms23、ms24、および ms27 の 4 か所の遺伝子座で本調査結果と明らかな繰り返し回数の違いが認められた。遺伝子座 ms12 における繰り返し配列数の違いは 1 に過ぎないが、1 配列の塩基数は 126 であり、この相違は大きなものである。また、ms24 と ms27 では繰り返し配列数において 2 倍以上の違いが認められた。特に ms24 の遺伝子座では、本調査結果と比べ、14 回も繰り返し回数が多いものであった。本調査結果は、ヨーロッパ各国のヒト由来菌株の MLVA パターンとも明らかに異なっていた。ポーランドのヒト血液由来 *C. burnetii* の MLVA 遺伝子型は[5]、Nine Mile I 株の MLVA 遺伝子型と極めて類似しており、我々の調査結果との相違は明白であった (755 ; 表 3)。イタリア、スロバキア、フランス、及びロシアのヒト由来 *C. burnetii* の MLVA 遺伝子型も、一部で比較データが欠けているものの、我々の調査結果とは大きく異なるものであった[3, 22]。イタリア、並びにスロバキアのヒト由来 *C. burnetii* の MLVA 遺伝子型では ms12、ms20、ms26、及び ms36 の 4 遺伝子座で繰り返し配列の挿入回数や繰り返し配列の長さに大きな差異が認められ、ms28 遺伝子座においても相違がみられた (CS-R、CS-Frorian ; 表 3)。同様に、フランス、及びロシアのヒト由来 *C. burnetii* の MLVA 遺伝子型においても ms12、ms20、ms26、及び ms36 の 4 遺伝子座で繰り返し配列の挿入回数や繰り返し配列の長さに大きな差異が認められた (F2、F4、及び R1140 ; 表 3)。比較可能な遺伝子座は非常に限定されるが、2007 年にオランダ南部のヤギ農家を中心にした Q 熱の大流行期におけるヒト Q 熱患者の MLVA

遺伝子型は[22]、いずれも本調査結果と明らかに異なるものであった (QKP1、QKP2、及び QKP6 ; 表 3)。さらに、前述のヒト Q 熱患者と関連する農場のヤギ胎盤スワブから検出された *C. burnetii* DNA の MLVA 遺伝子型も[22]、全て本調査結果と異なるものであることが示された (CbNL01、CbNL02、CbNL08、及び CbNL10 ; 表 3)。

一方、流産を起こしていたフランスおよびドイツのウシ胎盤由来の *C. burnetii* DNA の MLVA 遺伝子型は[3, 22]、1 遺伝子座 (ms36) における繰り返し配列数を除き、本調査結果と極めて近似であった。また、その繰り返し回数の違いも非常にわずかなものであった (CbB1、CbB4、CbB10、及び Z 2775/90 ; 表 3)。但し、これらのデータにはいくつかの遺伝子座の結果が含まれておらず、これら両国のウシ胎盤由来 *C. burnetii* の MLVA 遺伝子型が、厳密には本調査結果とどの程度の相違があるのかについては不明である。ポーランドのウシ胎盤由来 *C. burnetii* DNA の MLVA 遺伝子型も[6]、多くの遺伝子座において本調査結果と近似の繰り返し配列数であったが、ms20、24、26、28、33、及び 36 の 6 遺伝子座で明らかな差異が認められた (801、507、及び Zam ; 表 3)。

今回の調査によって、本学酪農生産ステーションのウシに蔓延・維持されている *C. burnetii* の MLVA 遺伝子型は独自性の高いものであることが強く示された。特に、これまでヒトで病原性を示した菌株の遺伝子型とは大きく異なることが明らかとなった。調査対象とした同施設のウシが *C. burnetii* に関する相応の陽性率を維持していることが示唆されたにもかかわらず、同施設関係者や近隣地域におけるヒト Q 熱は全く報告されていない。よって、今回行った分子疫学的調査の結果及び Q 熱発生状況から、調査した農場では病原性の低い *C. burnetii* が蔓延していることが考えられる。他方、当然ながらヒトに感染するウシ由来の病原体は *C. burnetii* のみでない。酪農従事者は、生乳の検査時や出産時に素手で対応しないことが不可欠である。

MLVA や MLST といった、新たな分子疫学的解析方法の特徴として、得られた解析データを世界各地で得られ蓄積されたデータと極めて容易に比較できる点を挙げることが出来る。MLVA による *C. burnetii* の遺伝子型別は今世紀に報告された手法であり、これらの調査報告は集積しつつある段階である。研究所間で MLVA を実施した遺伝子座

の相違があるが、どの遺伝子座を何ヶ所選択し検査すれば正確に鑑別できるか等について研究所間でのコンセンサスをとっておく必要がある[7, 29]。我々が 12 遺伝子座について判定できた MLVA による遺伝子型別の結果について、6 サンプル間相互で比較を行ったところ、各遺伝子座における挿入数は同数、もしくは挿入数自体の違いは極めて小さいものであった。こうした同一地域におけるサンプル間の多少の違いは、*C. burnetii* 及び他の病原体についても過去に報告がある[7, 29]。今回調査した本学酪農生産センターにおいて検出された *C. burnetii* も、明らかに別個の株というよりも、ほぼ同一種の菌株が蔓延・維持されているとみなす方が、より妥当性が高いものと思われる。

ある遺伝子領域の多様性を図る指標として、Hunter-Gaston diversity index (HGDI) が用いられる[3]。我々が MLVA による *C. burnetii* の遺伝子型別を実施するにあたって、その基礎となった 12 遺伝子座における各々の HGDI は 0.28(ms22)から 0.79 (ms27)であった[3]。今回の調査で、HGDI が 0.55 (ms36) 未満であった ms07、ms21、及び ms22 (HGDI ; 0.47, 0.37, 0.28) の 3 遺伝子座では、他の多くの菌株で共通する繰り返し配列の挿入数、あるいは挿入数のわずかな違いを認めるのみであった。このことから、HGDI が 0.5 程度を下回る遺伝子座では、*C. burnetii* の MLVA を行う上で、識別能が低いことが強く示唆された。世界規模での *C. burnetii* の分子疫学情報の共有を進めるためには、MLVA の手法について世界的標準化を図る必要がある。その際に、どの遺伝子座を何ヶ所選択すべきであるかについての判定の根拠として、HGDI の値が 0.5 以上というのは重要な要因となるものと考えられる。今回は実施していないが、近年の研究で、シークエンスを実施することで、より正確な判定が可能であるとの報告もある[3, 7, 8]。MLVA の標準法が早期に作成されることが望まれる。過去の研究報告にあるように[3, 7, 14]、今回の調査においてもサンプルに含まれる菌の DNA 量が少ない場合、十分な MLVA 解析結果を得られない場合が認められた。また、菌の DNA 量の他に、遺伝子座の欠損の可能性もあり、サンプルに因るところも大きいと考えられる。

*C. burnetii* は風によって運ばれ、家畜の飼養密度と無関係に、広範な地域に亘って拡散することが知られている[1, 3, 15, 18]。*C. burnetii* は環境中で

も長期間生存可能であり、動物と接触の無い地域では、ヒトが土壌や埃を介して本菌に感染することを示唆する報告もある [25]。こうしたことから、酪農地域に加えて都市部も含めた広い地域で、土壌など環境中サンプルから調査を行っていく必要がある。本研究では 1 農場のウシを調査対象としたが、今後は、調査地域を拡大し、対象もヒト、ダニ、野生動物及びウシ以外の家畜まで広げ、異なる地域及び対象間での遺伝子型の関連性を考察することで、ヒトへの感染源や感染経路などの解明に寄与できるものと考えられる。

## 謝 辞

本研究は 2011 年度酪農学園大学共同研究 (採択 No. 4) の一部として助成を受け、また、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の一環として実施した。

## 参考文献

1. Anderson, P. D. and Bokor, G. 2012. Bioterrorism: pathogens as weapons. *J. Pharm. Pract.* 25:521-529.
2. Andoh, M., Nagaoka, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K. 2004. Comparison of Japanese isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and sequence analysis. *Microbiol. Immunol.* 48:971-975.
3. Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A. and Vergnaud, G. 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 6:38.
4. Babudieri, B. 1953. Epidemiology, diagnosis, and prophylaxis of Q fever (quoted in *Advances in the Control of Zoonoses*), *WHO Monogr. Ser.* 19: 157-173.
5. Buhariwalla, F. and Cann, B. 1996. A dog-related outbreak of Q fever. *Clin. Infect. Dis.* 23: 753-755.
6. Chmielewski, T., Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Podsiadly, E., Thiéry, R. and Tylewska-Wierzbanska, S. 2009. Molecular epidemiology of Q fever in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 58:9-13.
7. de Bruin, A., van Alphen, P., Janse, I. and van Rotterdam, B. 2011. Molecular typing of *Coxiella burnetii* from source finding samples taken in 2009. *RIVM letter report* 330291006.
8. de Bruin, A., van Alphen, P., van der Plaats, R. Q., de Heer, L., Reusken, C. B., van Rotterdam, B. J. and Janse, I. 2012. Molecular typing of *Coxiella burnetii* from animal and environmental matrices during Q fever epidemics in the

Netherlands. *BMC Vet. Res.* 8:165.

9. Embil, J. and Williams, J. C. 1990. The immune response in a cat-related outbreak of Q fever as measured by the indirect immunofluorescence test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Microbiol.* 36: 292-296.
10. Fournier, P. E. and Raoult, D. 2003. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol.* 41:5094-5098.
11. Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T. J. and Raoult D. 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1211-1217.
12. Hotta, A., Zhang, G. Q., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K. 2004. Use of monoclonal antibodies for analyses of *Coxiella burnetii* major antigens. *J. Clin. Microbiol.* 6:1289-1291.
13. Htwe, K. K., Yoshida, T., Hayashi, S., Miyake, T., Amano, K.-I., Morita, C., Yamaguchi, T., Fukushi, H., and Hirai, K. 1993. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 31: 722-723.
14. Huijsmans, C. J., Schellekens, J. J., Wever, P. C., Toman, R., Savelkoul, P. H., Janse, I. and Hermans, M. H. 2011. Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during Q Fever outbreak in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 2051–2057.
15. Jado, I., Carranza-Rodríguez, C., Barandika, J. F., Toledo, Á., García-Amil, C., Serrano, B., Bolaños, M., Gil, H., Escudero, R., García-Pérez, A. L., Olmeda, A. S., Astobiza, I., Lobo, B., Rodríguez-Vargas, M., Pérez-Arellano, J. L., López-Gatius, F., Pascual-Velasco, F., Cilla, G., Rodríguez, N. F. and Anda P. 2012. Molecular method for the characterization of *Coxiella burnetii* from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain. *BMC Microbiol.* 12: 91.
16. Jones, R. M., Twomey, D. F., Hannon, S., Errington, J., Pritchard, G. C. and Sawyer, J. 2010. Detection of *Coxiella burnetii* in placenta and abortion samples from British ruminants using real-time PCR. *Vet. Rec.* 167: 965-967.
17. Kazar, J. and Lesy, M. 1993. Comparison of virulence for guinea pigs and mice of different *Coxiella burnetii* phase I strains. *Acta Virol.* 37: 437-448.
18. Kersh, G. J., Wolfe, T. M., Fitzpatrick, K. A., Candee, A. J., Oliver, L. D., Patterson, N. E., Self, J. S., Priestley, R. A., Loftis, A. D. and Massung, R. F. 2010. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 4469-4475.
19. Kocianova, E. and Kovacova, E. I. 2001. Comparison of virulence of *Coxiella burnetii* isolates from bovine milk and from ticks. *Folia. Parasitol.* 48: 235-239.
20. Langley, J. M., Marrie, T. J., Covert, A., Waag, D. M., and Williams, J. C. 1988. Poker player's pneumonia. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. *N. Eng. J. Med.* 319: 354-356.
21. Muramatsu, Y., Yanase, T., Okabayashi, T., Ueno, H. and Morita, C. 1997. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay combined with a novel sample preparation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2142-2146.
22. Roest, H. I., Ruuls, R. C., Tilburg, J. J., Nabuurs-Franssen, M. H., Klaassen, C. H., Vellema, P., van den Brom, R., Dercksen, D., Wouda, W., Spierenburg, M. A., van der Spek, A. N., Buijs, R., de Boer, A. G., Willemsen, P. T. and van Zijderveld, F. G. 2011. Molecular Epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 668-675.
23. Schneeberger, P. M., Hermans, M. H., van Hannen, E. J., Schellekens, J. J., Leenders, A. C. and Wever, P. C. 2011. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clin. Vaccine. Immunol.* 17: 286-290.
24. Stein, A., Louveau, C., Lepidi, H., Ricci, F., Baylac, P., Davoust, B. and Raoult, D. 2005. Q Fever Pneumonia : Virulence of *Coxiella burnetii* pathovars in a murine model of aerosol infection. *Infect. Immun.* 73: 2469-2477.
25. Tozer, S. J., Lambert, S. B., Strong, C. L., Field, H. E., Sloots, T. P., and Nissen, M. D. 2014. Potential animal and environmental sources of Q fever infection for humans in Queensland. *Zoon. Publ. Hlth.* 61: 105-112.
26. van der Hoek, W., Hogema, B. M., Dijkstra, F., Rietveld, A., Wijkman, C. J., Schneeberger, P. M. and Zaaijer H. L. 2012. Relation between Q fever notifications and *Coxiella burnetii* infections during the 2009 outbreak in the Netherlands. *Euro. Surveill.* 17:20058.
27. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou15/02-01.html>
28. 安藤匡子 2009. Q 熱 (コクシエラ症) 起因菌 *Coxiella burnetii* の最近の知見. *モダンメディア*. 55: 59-69.
29. 向川純 2009. 結核菌遺伝子型別検査法のあらたな展開. *東京都微生物検査情報* 30:7.
30. Welsh, H. H., Lennette, E. H., Abinanti, F. R., and Winn, J. F. 1958. Air-borne transmission for Q fever: The role of parturition in the generation of infective aerosols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 70: 528-540.

Table 1. Orligonucleotide primers used for MLVA typing\*.

Locus	Sequence (5' → 3')	
	Forward	Reverse
ms01	GGCTCATTCAATTTTAGCTTCG	AACGTGGGGAAGTTTGTTATTT
ms03	TTGTCGATAAATCGGGAAACTT	CACTGGGAAAAGGAGAAAAAGA
ms07	CTCTTAGCCATCGCTTACCACT	AACGAAAATTGGTTTGCATTTT
ms12	GAAAATTGGTTTGCCTCTG	CCTTCTCCCAAGAAGTTTAGCC
ms20	CTGAAACCAGTCTTCCCTCAAC	CTTTATCTTGGCCTCGCCCTTC
ms21	AGCATCTGCCTTCTCAAGTTTC	TGGGAGGTAGAAGAAAAGATGG
ms22	GGGGTTTGAACATAGCAATACC	CAATATCTCTTTCTCCCGCATT
ms26	AGAATCAAACCTGCAAAACCTT	TTGATTATTTTGACTTCGCTGGT
ms30	ATTCCTCGACATCAACGTCTT	AGTCGATTTGGAAACGGATAAA
ms36	GAAACCAGTCTTCCCTCAACAG	ATAACCGTCATCGTCACCTTCT
ms23	GGACAAAAATCAATAGCCCGTA	GAAAACAGAGTTGTGTGGCTTC
ms24	ATGAAGAAAGGATGGAGGGACT	GATAGCCTGGACAGAGGACAGT
ms27	TTTTGAGTAAAGGCAACCCAAT	CAAACGTGCGACTAACTCTACG
ms28	TAGCAAAGAAATGTGAGGATCG	ATTGAGCGAGAGAATCCGAATA
ms31	GGGCATCTAATCGAGATAATGG	TTTGAGAAAATTTTGGGTGCTT
ms33	TAGGCAGAGGACAGAGGACAGT	ATGGATTTAGCCAGCGATAAAA
ms34	TGACTATCAGCGACTCGAAGAA	TCGTGCGTTAGTGTGCTTATCT

\*Arricau-Bouvery et al. [3]による。

Table 2. Results of *IS1111* Real-Time PCR for detection of the coxiella DNA from bovine placenta.

Sample Nos.	Cp value	<i>IS1111</i> Real-Time PCR (subtotal : %)
1-3, 5, 21-23, 31, 35, 37-39, 42, 46-48, 50	33.53, <b>28.32, 29.56, 31.14, 30.18, 16.82</b> , 33.30, <b>31.94, 32.76</b> , 33.10, <b>32.45, 21.62, 11.54, 26.10,</b> <b>32.70</b> , 33.94, 33.54	positive (17: 34%)
4, 6-20, 24-30, 32-34, 36, 41, 43-45, 49	>34	negative (33: 66%)

Cp: Crossing point. 太字で示したCp値が33未満の計12サンプルをMLVAIに供した.



Table 3. MLVA typing of cattle placenta used in this study and comparing data of the MLVA typing.

Sample		Repeat unit above 9 base-pairs (length of a unit: bp)							Six or seven bp repeat unit (length of a unit: bp)					Remarks [Ref. Nos.]
		ms07 (126)	ms12 (126)	ms20 (18)	ms21 (12)	ms22 (11)	ms26 (9)	ms36 (9)	ms23 (7)	ms24 (7)	ms27 (6)	ms28 (6)	ms33 (7)	
NineMile I	Tick	8	8	15	5	6	4	4	8	27	4	6	9	USA
Henzerling	Human blood	8	6	19	5	6	16	16	3	8	3	3	5	Italy
755	Human blood	8	8	15	5	6	4	7	8	27	3	6	9	Poland [6]
801, 507	Cattle placenta	8	8	19	5	6	16	16	3	8	3	3	5	Poland [6]
Zam	Cattle placenta	8	8	19	5	6	16	7	3	8	3	3	5	Poland [6]
2	Cattle placenta	8	7	15	6	6	4	7	5	13	2	7	8	This study
3	Cattle placenta	8	7	15	6	6	4	7	5	13	2	7	8	This study
21	Cattle placenta	8	7	15	6	6	4	7	5	13	1	6	9	This study
22	Cattle placenta	8	7	15	6	6	4	7	5	13	1	6	9	This study
42	Cattle placenta	8	7	15	6	6	4	7	5	13	1	7	9	This study
46	Cattle placenta	8	7	15	6	6	4	7	5	13	1	6	9	This study
CbB1, CbB4, CbB10	Cattle placenta	8	7	15	5	6	4	7			2	7, 8		France [3, 22]
Z 2775/90	Cattle placenta	8	7	15	5	6	4	7			2	7		Germany [3, 22]
QKP1, 2, 6	Human									11	3, 4	3		Netherlands [22]
CbNL01, 02, 08, 10	Goat				6	6		7, 13		11	0, 2, 3	0, 3		Netherlands [22]
CS-R	Human	8	9	19	5	6	14	17			3	3		Italy [3, 22]
CS-Frorian	Human blood	8	4	19	5	6	13	17			3	3		Slovak Rep. [3, 22]
F2, F4	Human blood	6	4	22, 18	6	6	5	15						France [3]
R1140	Human blood	6	4	18	6	6	4	15						Russia [3]

# **Genotyping of *Coxiella burnetii* detected from bovine placenta based on Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis**

Yasukazu MURAMATSU<sup>1)</sup>, Yuuhei OHSAWA<sup>1)</sup>, Takahiro KAWAGISHI<sup>3)</sup>, Wakako TANIGUCHI<sup>2)</sup>,  
Leo UCHIDA<sup>1)</sup>, Daiji ENDOH<sup>2)</sup> and Hiroshi UENO<sup>1)\*</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Zoonotic Diseases, Division of Health and Environmental Sciences, and <sup>2)</sup>Laboratory of Veterinary radiology, Division of Biosciences, Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and <sup>3)</sup>Research Farm, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan.

\*corresponding author: Hiroshi UENO

E-mail : y-mrmt@rakuno.ac.jp

## **ABSTRACT**

*Coxiella burnetii* is a zoonotic bacteria and causative agent of Q fever occurred in humans and animal coxiellosis concerning to reproduction disorders in cattle world wide. This is the first report for multiple loci variable number of tandem repeats analysis (MLVA) performed with cattle placenta reared in Research Farm of Rakuno Gakuen University. A total of 50 DNA samples extracted from the cattle placenta were subjected to IS1111 real-time PCR. Of the entire DNA samples positive for the real-time PCR (21/50; 42%), we revealed the genotype of 6 samples by the MLVA data on 12 loci. MLVA genotype of *C. burnetii* derived from cattle reared in the research farm was unique and different from any other MLVA genotypes. There has been no case of human Q fever among the workers of the farm and the neighborhood residents. These findings lead us to deduce that an attenuated or a low-virulence strain of *C. burnetii* strain has been maintained in the cattle of the research farm.