

STRESZCZENIE

Gołębiowate są gospodarzem wielu ważnych patogenów bakteryjnych, wirusowych i pasożytniczych. Jednym z najważniejszych jest wirus rzekomego pomoru drobiu (NDV), określany również jako paramyksowirus ptaków serotypu 1 (APMV-1). Wirusy APMV-1 występujące u gołębi różnią się antygenowo i genetycznie od szczepów izolowanych od innych gatunków drobiu i zostały zakwalifikowane do grupy tzw. „wariantów gołębich APMV-1” oznaczanych skrótem „PPMV-1”. Choć wirusy PPMV-1 są zwykle specyficzne gatunkowo, to stwierdza się również przypadki zachorowań lub izolacji tego wirusa od ptaków innych niż gołębie. Z uwagi na dość znaczną rozbieżność pomiędzy powszechnością występowania PPMV-1 u gołębi przy stosunkowo niskim odsetku izolacji tego wariantu od innych gatunków ptactwa domowego, uzasadnione wydaje się postawienie pytania o faktyczną rolę wariantów PPMV-1 w epidemiologii u ptaków innych niż gołębie. Celem pracy była ocena wrażliwości na zakażenie oraz określenie roli antygenowych wariantów wirusa rzekomego pomoru drobiu w patogenezie i patologii zakażeń u wybranych gatunków drobiu (kury, indyki, przepiórki, gęsi oraz gołębie jako kontrola doświadczenia).

W pierwszym etapie pracy określono zmiany zachodzące w genomie oraz patogenności wirusa PPMV-1 w wyniku seryjnych pasażów przez organizm kur SPF. Przeprowadzono ogółem sześć pasażów uzyskując wzrost patogenności wyrażony wzrostem indeksu domózgowej zjadliwości (ICPI) dla jednodniowych kurcząt SPF. Wartość indeksu ICPI wyniosła dla wirusa niepasażowanego 1,27, a dla pasażowanego 1,4. Na podstawie wyników otrzymanych metodą sekwencjonowania następczej generacji przeprowadzono analizę wariantów wirusa przed i po pasażach. Stwierdzono mutacje prowadzące do zmiany aminokwasu w 11 miejscach genomu wirusa pasażowanego. Nagromadzone zmiany nukleotydowe, zwłaszcza w obrębie cząsteczki kompleksu replikacyjnego, mogły wpłynąć na wzrost patogenności w badaniu *in vivo*. W kolejnym etapie zakażano eksperymentalne kury, indyki, przepiórki, gęsi i gołębi wirusem PPMV-1 niepasażowanym i pasażowanym. Prowadzono codzienną obserwację kliniczną, a w 2, 4, 7, 10 i 14 dniu po zakażeniu (d.p.i.) od wszystkich ptaków pobierano wymazy z jamy ustno-gardłowej oraz kloaki. Ponadto od dwóch ptaków z każdej grupy zakażonej (padłych, chorych lub zdrowych i poddanych eutanazji, w zależności od gatunku i przebiegu zakażenia) pobierano narządy: mózg, płuca, nerki, wątrobę, śledzionę i dwunastnicę do badań real time RT-PCR i histopatologicznych. Zakażenie ptaków wirusem uzyskanym w następstwie pasażów na kurczętach zostało wykonane w dokładnie ten sam sposób. Przeprowadzone badania własne

potwierdzają, że naturalnym gospodarzem dla wirusów PPMV-1 są gołębie, gdyż tylko u tego gatunku stwierdzano występowanie objawów klinicznych i śmiertelności, podczas gdy u pozostałych badanych ptaków przebieg był bezobjawowy, bez względu na to, czy wirus użyty w doświadczeniu był wcześniej pasażowany, czy użyty w formie natywnej. W odniesieniu do poziomu replikacji i siewstwa mierzonego metodą real time RT-PCR wykazano różnice, które były dość istotne. Dotyczy to w głównej mierze indyków, u których wyższe wartości stwierdzono w odniesieniu do wirusa pasażowanego. Podobne wyniki wykazano w przypadku przepiórek i gęsi, gdzie efektem zakażenia wirusem niepasażowanym odnotowano niewielką replikacji, podczas gdy w odniesieniu do wirusa pasażowanego materiał genetyczny PPMV-1 był wykrywalny od 4-14 d.p.i. Mikroskopowa analiza zmian patomorfologicznych w zakażonych tkankach nie wykazała różnic w zależności od formy wirusa użytego w doświadczeniu. Wykazano zwiększony tropizm użytego szczepu PPMV-1 do układu nerwowego, oddechowego oraz moczowego u gołębi oraz penumotropizm i nefrotropizm do organizmu kur i indyków. W ostatnim etapie pracy określono wpływ infekcji PPMV-1 na parametry odpowiedzi nieswoistej w narządach kur i gołębi, oznaczając transkrypcyjną ekspresję cytokin prozapalnych ($IFN\gamma$, IL-1 β , IL-6, IL-8) oraz czynnika hamującego syntezę cytokin (IL-10). Oddziaływanie wirusa PPMV-1 ocenione na podstawie ekspresji cytokin na poziomie mRNA, wskazują na aktywację wrodzonych komponentów odpowiedzi immunologicznej zarówno u gołębi i kur. Wykazano odmienny profil ekspresji wszystkich badanych cytokin w poszczególnych narządach zakażonych gołębi względem grupy kontrolnej oraz kurcząt w tym samym układzie doświadczalnym, który może wyjaśniać zakres i charakter zmian patologicznych stwierdzanych w badaniu mikroskopowym.

SUMMARY

Birds of the family *Columbidae* are natural hosts of important viral, bacterial and parasitic microorganisms. Avian paramyxovirus type 1 (APMV-1), also known as Newcastle disease virus (NDV), is one of the most important avian pathogens. APMV-1 naturally occurring in pigeons differ antigenically and genetically from those commonly found in other species of poultry and have been classified to the separate group of so called “pigeon variants” – PPMV-1. Although PPMV-1 are host-specific, outbreaks or infections with this pathogen are notified in poultry. Because of the discrepancy between the common occurrence of PPMV-1 in pigeons and relatively low prevalence in other species of birds, including poultry, it was justified to formulate a scientific question about the role of PPMV-1 in poultry. The objective of the study was to assess clinical signs, gross lesions, viral shedding, and distribution in different organs of experimentally PPMV-1–infected pigeons, chickens, turkeys, quails, and geese. As it has been shown that serial passages through susceptible chickens increase the virulence of PPMV-1, the experiments were conducted twice with PPMV-1 before (nPPMV-1) and after (pPPMV-1) virus passages in chickens. Additionally, preliminary investigations about the role of non-specific immune response were also carried out.

In the first phase of the study, the virus was passaged six times through specific pathogen free (SPF) chickens. An increase of virulence, as measured by the value of intracerebral pathogenicity index (ICPI) was noted from 1,27 to 1,4. The existence and proportions of genetic variants was analyzed with the use of next generation sequencing. The presence of mutations in 11 residues of the polymerase complex could have been responsible for the observed alteration of virulence in the passaged PPMV-1.

Subsequently, groups of pigeons, chickens, turkeys, quails, and geese were inoculated with 10^6 EID₅₀ of nPPMV-1 and pPPMV-1 via oculonasal route. Twenty-four hours later, contact birds of the same species were introduced into the same isolator and served as a control of effectiveness of viral transmission from shedding birds. The birds were monitored daily for clinical signs and mortality. At 2, 4, 7, 10, and 14 d.p.i. (at 1, 3, 6, 9, and 13 days after the first contact [d.p.c], in the case of contact birds) oro-pharyngeal and cloacal swabs were collected from birds and tested by real time RT-PCR. Additionally, selected organ samples were collected from two birds at each sampling day and subjected to RRT-PCR test. Infected pigeons exhibited nervous and digestive tract symptoms, mortality, shedding, and transmission to contact birds. Chickens, turkeys, quails, and geese did not exhibit any clinical signs regardless of the PPMV-

1 strain used for inoculation. However, in contrast to quails and geese, chickens and turkeys shed the virus via the oral cavity and cloaca, and transmission to contact birds was also observed. Viral RNA was identified in tissues collected from all pPPMV-1–infected birds, whereas negative results were obtained in the case of tissues taken from nPPMV-1–infected quails and geese. We conclude that the PPMV-1 used in this study was most virulent to pigeons, followed by chickens and turkeys, while quails and geese seem to have had the highest level of innate resistance to this strain. Histopathological analysis did not show any visible differences, irrespective of the PPMV-1 strains used in the experiment. The marked neuro-, pneumo- and nephrotropism was demonstrated in pigeons. Pneumo- and nephrotropism was shown in chickens and turkeys.

In the last stage of the study transcriptional expression of proinflammatory cytokines (IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-8) and cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) was tested in organs of pigeons and chickens. The interaction of the virus PPMV-1 evaluated by the expression of cytokines at mRNA level, indicates on the activation of components of innate immune responses in both chickens and pigeons. It has been shown different profile of expression of all tested cytokines in the various organs of infected versus control pigeons and chickens in the same experimental trial, which may explain the scope and nature of the pathological changes demonstrated by microscopic observation.