

Streszczenie

Zakażenia *Mycoplasma synoviae* u drobiu stanowią istotny ogólnoswiatowy problem epidemiologiczny i ekonomiczny w produkcji drobiarskiej. W obrębie gatunku *M. synoviae* istnieją różnice między szczepami dotyczące patogenności oraz przebiegu zakażenia co uwidacznia się nie tylko występowaniem objawów ze strony układu lokomotorycznego, ale i układu rozrodczego jak chociażby w postaci syndromu anomalii wierzchołka skorupy jaja (Eggshell Apex Abnormalities - EAA). Rozwój zaburzeń nieśności i pojawianie się zmian w budowie skorupy jaja w następstwie zakażenia *M. synoviae* charakterystycznych dla syndromu EAA takich jak chropowata powierzchnia powłoki, przejaśnienia oraz przezroczystość skorupy jaja mogą prowadzić do znacznych strat ekonomicznych powstałych na skutek pęknięć skorupy jaja (liczne stłuczki) i dyskwalifikacji jaj wylęgowych.

Celem pracy było określenie występowania zakażeń *M. synoviae* w krajowych stadach kur niosek (reprodukcyjnych i towarowych), charakterystyka molekularna uzyskanych szczepów oraz ocena właściwości patogennych wybranych szczepów dla zarodków kurzych SPF i kur niosek. W ramach badań przeprowadzonych na przestrzeni lat (2010-2016) w 906 stadach kur z terenu całego kraju zarówno ze stad klinicznie zdrowych jak i z problemami zdrowotnymi ze strony układu oddechowego, lokomotorycznego i rozrodczego. Zidentyfikowano i scharakteryzowano metodą mikrobiologiczną oraz metodami biologii molekularnej (qPCR, PCR, LAMP i sekwencjonowanie) 265 szczepów *M. synoviae*. Przeprowadzone badania własne wykazały wysoką prevalencję zakażeń *M. synoviae* w stadach kur w Polsce, które głównie miały przebieg subkliniczny. Pozwoliło to także na zgromadzenie znacznej puli szczepów do dalszych badań. W poszczególnych latach odsetek próbek dodatnich kształtował się na średnim poziomie 30% (od 34% w 2010 r. do 29% w roku 2016), natomiast najwyższy odsetek próbek pozytywnych (44%) stwierdzono w roku 2012. Genetyczne zróżnicowanie wyizolowanych szczepów określono wykorzystując sekwencje w genie *vlhA* specyficznego dla *M. synoviae*. Przeprowadzona analiza filogenetyczna łącznej puli 60 krajowych szczepów *M. synoviae* umożliwiła wykazanie 9 różnych typów genetycznych (A-I). Stwierdzone zróżnicowanie szczepów *M. synoviae* w obrębie regionu PRR genu *vlhA* sugeruje ewolucyjną dynamikę tego genu wśród krajowych szczepów na przestrzeni 6 lat badań. W przebiegu przeprowadzonych badań nie stwierdzono zależności geograficznej względem występowania poszczególnych genotypów. Przeprowadzona analiza nukleotydowa najliczniejszego genotypu F, dominującego szczególnie w ostatnich latach prowadzonych badań, wykazała obecność insercji 39

nukleotydów, a analiza aminokwasowa - insercję 13 aminokwasów (TDNPQNPNPGNPG) w polimorficznym regionie PRR genu *vlhA*. Może to wskazywać na swoistą zdolność tych szczepów, które także izolowano z przypadków chorobowych, do kolonizacji układu rozrodczego kury i następowego wywoływania objawów typowych dla syndromu EAA warunkowanych przez tropizm i wirulencję zarazka. W trakcie przeprowadzonych badań tylko w jednym stadzie stwierdzono obecność dwóch różnych genotypów *M. synoviae*: E i F.

W kolejnym etapie zrealizowanych badań, z wykorzystaniem wybranych szczepów *M. synoviae*, przeprowadzono badanie patogenności dla zarodków kurzych SPF i kur niosek. Wykazano istotne różnice w zjadliwości pomiędzy szczepami. Ocena patogenności wybranych 10 szczepów *M. synoviae* dla zarodków SPF należących do różnych genotypów, wykazała właściwości patogene u 9 z nich. W wyniku przeprowadzonych badań klinicznych potwierdzono również patogenność wybranych dwóch szczepów *M. synoviae* należących do dwóch różnych typów genetycznych (C i F) w odniesieniu do układu rozrodczego kur niosek w wyniku czego stwierdzono spadki nieśności (średni spadek o około 11%), a także zmiany w skorupie jaj (od 24 do 26,5%) uwidocznione nie tylko na jej wierzchołku, ale również na innych częściach skorupy. Wyżej wymienione zmiany obserwowano w różnym czasie od momentu zakażenia ptaków. Szczep GK1/15PL *M. synoviae*, należący do genotypu C, powodował pojawienie się zmian patologicznych w obrębie skorupy jaj w krótszym okresie czasu, lecz były one słabiej wyrażone w porównaniu ze szczepem 146-3J/15PL. Natomiast szczep 146-3J/15PL *M. synoviae* wywodzący się z genotypu F powodował stopniowe pojawianie się zmian patologicznych, które jednak utrzymywały się dłużej i były bardziej nasilone w porównaniu do szczepu GK1/15PL. Powyższych zmian nie obserwowano u kur kontrolnych. Ponadto badanie sekcyjne i histopatologiczne zmienionych chorobowo jajowodów potwierdziły obecność zmian patologicznych w błonie śluzowej tych narządów w odcinku kielicha, magnum i macicy jajowodu, co mogło wpływać na proces wydzielniczej funkcji gruczołów sekrecyjnych.

W przedstawionych wynikach badań na szczególną uwagę zasługuje nie tylko uwidocznienie cech patogennych wybranych szczepów *M. synoviae* dla zarodków SPF i kur niosek, ale również zaadaptowanie metody optycznej tomografii koherentnej do zobrazowania zmian ultrastrukturalnych w warstwach wapiennych skorupy jaj wywołanych przez *M. synoviae*. Dzięki tej metodzie stwierdzono bowiem deformację porów skorupy jaj, co może prowadzić do ich niedrożności i wpływać na wymianę gazową jaja, a w konsekwencji przyczyniać się do zamieralności zarodków w trakcie inkubacji.

Reasumując należy podkreślić fakt, że *M. synoviae* może wywoływać głównie zakażenia o charakterze chronicznym. Wykazane zmiany patologiczne w budowie skorupy jaj będące następstwem zakażenia *M. synoviae*, a także współistniejące znaczne straty w produkcji jaj, podkreślają istotne znaczenie gospodarcze tych zakażeń u drobiu hodowlanego. Na podstawie uzyskanych wyników wskazane jest prowadzenie dalszych badań nad monitorowaniem zakażeń *M. synoviae* i analiza molekularna otrzymanych izolatów wraz z oceną ich zmienności genetycznej. Przyczyni się to do poprawy efektywności kontroli zakażeń *M. synoviae* oraz ograniczy potencjalne straty ekonomiczne wywołane przez infekcje tym patogenem w krajowej populacji drobiu.

Summary

M. synoviae infection in poultry poses a significant global epidemiological and economic problem. The differences between *M. synoviae* strains are related to the pathogenicity and the course of the disease, which is evidenced not only by infectious synovitis but also possible infection of the reproductive tract of chickens causing the eggshell apex abnormality (EAA) syndrome. The loss of egg production and eggshell changes characteristic for EAA, such as altered shell surface, thinning and increased translucency in different areas, leading to an increase in the incidence of cracks and breaks of eggshell, may all result in significant economic losses.

The aim of the study was to determine the occurrence of *M. synoviae* infections in laying hens in Poland, perform molecular characterisation of the field strains, and evaluate pathogenicity of selected strains for SPF chicken embryos and laying hens. Over the period of 2010-2016, 906 flocks from the whole country were tested. A total of 265 *M. synoviae* strains were identified and characterised by molecular biology methods (real-time PCR, PCR, LAMP and sequencing). The study showed a high prevalence of *M. synoviae* subclinical infections in the flocks in Poland, which allowed the collection of a large number of strains for further testing. Over the years, the percentage of positive samples ranged from 34% in 2010 to 29% in 2016. The highest proportion of positive samples was at the level of 44% in 2012. Genetic variability of the strains was determined using the *vlhA* gene sequencing. Phylogenetic analysis of 60 Polish *M. synoviae* strains showed the presence of nine genotypes (A-I). The diversity of *M. synoviae* strains in the gene *vlhA* suggests the evolutionary dynamics of the gene over the six-year research period. In the course of the study, no geographical relationship was observed with respect to the presence of individual genotypes. The F group of nucleotide analysis, which has been dominant in the recent years, has shown the presence of 39 nucleotides, and 13 amino acid inserts (TDNPQNPNPGNPG) in the polymorphic PRR region of the *vlhA* gene. This may indicate the specific ability of *M. synoviae* strains to colonise the hen reproductive system and to induce symptoms typical for EAA syndrome conditioned by the tropism and virulence of the pathogen. During the research only one flock had co-infection with two different genotypes of *M. synoviae*: E and F.

In the next stage of the study, the selected strains of *M. synoviae* were used to conduct pathogenicity study on the SPF chicken embryos and in laying hens. Significant differences in virulence between the strains have been demonstrated. Evaluation of pathogenicity for the

SPF embryos revealed that nine out of ten selected *M. synoviae* strains from different genetic groups showed pathogenic properties.

Clinical studies have also confirmed the pathogenicity of two *M. synoviae* strains belonging to two different genetic types (C and F) affecting the reproductive tract of laying hens. The result of the infection was a drop in the egg production (an average decrease of about 11%), as well as changes in the eggshell that involved not only its apex but also other parts of the shell (24 to 26.5%) when compared to the control. Changes have been observed at different time points since the infection of birds. The GK1/15PL strain of *M. synoviae*, belonging to group C, caused pathological changes in the eggshell in a shorter time but they were less pronounced compared to the 146-3J/15PL strain. On the other hand, the 146-3J/15PL strain of *M. synoviae* from the group F caused a gradual appearance of pathological lesions that were longer and more prominent compared to the GK1/15PL strain. There were no pathological changes in control hens. In addition, sectional and histopathological examination of the infected oviducts confirmed the presence of pathological lesions in the mucous membranes of these organs in the infundibulum, magnum and uterus of the oviduct, which may have affected the function of secretory glands.

The study is noteworthy not only due to the identification of pathogenic traits of selected *M. synoviae* strains for the chicken SPF embryos and laying hens, but also the adaptation of the optical coherence tomography method to image ultrastructural changes in the eggshell caused by *M. synoviae*. Thanks to this method, deformation of the pores of the eggshell has been identified, which can lead to their occlusion and affect the egg gas exchange and consequently contribute to the mortality of embryos during incubation.

In conclusion, *M. synoviae* can cause chronic infections. The observed pathological changes in the eggshell formation after *M. synoviae* infection as well as significant losses in egg production underline the high economic importance of these infections in poultry breeding. Based on the obtained results, it is advisable to conduct further studies on the occurrence of *M. synoviae* infections, including molecular analysis of the obtained isolates together with the assessment of their genetic variability. This will help to improve the effectiveness of *M. synoviae* infection control and reduce economic losses caused by this pathogen in the domestic poultry population.