

STRESZCZENIE

Zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza (IBD) jest wysoce zakaźną i zaraźliwą immunosupresyjną chorobą wirusową kurcząt o zasięgu ogólnosiwiatowym i istotnym znaczeniu ekonomicznym. Podstawowym narzędziem eradykacji tej choroby jest ścisłe przestrzeganie zasad bioasekuracji w produkcji drobiarskiej oraz stosowanie odpowiednich programów szczepień uwzględniających aktualną sytuację epidemiologiczną IBD na danym terenie. Pierwszym zadaniem pracy było przygotowanie zaplecza diagnostycznego do wykrywania IBD. Opracowano lub zaadaptowano dwie metody RT-PCR. Pierwsza z nich, real time RT-PCR (rRT-PCR) służy do szybkiego wykrywania wirusów serotypu 1, zaś druga, konwencjonalny RT-PCR, w połączeniu z sekwencjonowaniem, pozwala określić patotyp wirusa IBD. Obie metody charakteryzuje wysoka czułość, a próg wykrywalności wyniósł $10^{0,01}$ EID₅₀/1 ml dla rRT-PCR i $10^{1,7}$ EID₅₀/1 ml dla metody konwencjonalnej. Badanie specyficzności nie wykazało żadnych reakcji krzyżowych z innymi wirusami RNA występującymi u drobiu.

W pracy wykonano charakterystykę molekularną 52 krajowych szczepów IBDV z lat 1978 – 2015. Określono patotyp wszystkich badanych wirusów w oparciu o gen VP2 (5 szczepów cIBDV, 46 szczepów vvIBDV), a dzięki zastosowaniu starterów specyficznych dla obu segmentów IBDV wykryto naturalnego reasortanta (Bug_pop/03). Analiza sekwencji genu białka VP2 wykazała, że polskie szczepy tworzą 8 grup filogenetycznych. Przeprowadzone badania potwierdziły wcześniejsze doniesienia, że szczepy klasyczne „wczesne” z podgrupy 7 stanowią unikalną grupę wirusów krążących we wschodniej Europie. Z kolei szczepy z podgrupy 8 wykazują duże podobieństwo do szczepów szczepionkowych. Identyfikacja takich szczepów potwierdza hipotezę krążenia szczepów szczepionkowych w populacji kur oraz ich stopniowej ewolucji, czego dowodzi obecność pojedynczych zmian aminokwasów. Charakterystyka molekularna dowiodła również dużego stopnia pokrewieństwa pierwszych polskich szczepów wysoce zjadliwych ze szczepami holenderskim i francuskim, wyizolowanymi w roku 1989, co może wskazywać, że introdukcja vvIBDV nastąpiła z terenu Europy Zachodniej. Niemniej duże zróżnicowanie wśród omawianych szczepów wysoce zjadliwych wskazuje na kilkukrotne wprowadzenie wirusa do kraju na przestrzeni lat. Analiza filogenetyczna polskich szczepów vvIBDV w oparciu o gen białka VP1 wykazała, że szczepy utworzyły 2 grupy filogenetyczne VP1.1 i VP1.2. Szczepy z podgrupy 1 cechuje nieduże zróżnicowanie w sekwencji nukleotydowej, co potwierdza analiza sekwencji aminokwasowej, która w większości przypadków była typowa dla wirusów wysoce zjadliwych. Z kolei podgrupa 2 stanowią szczepy, które w zależności od analizy sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej wykazują odpowiednio podobieństwo do szczepów wysoce zjadliwych i klasycznych. Użycie algorytmów statystycznych na obecność rekombinacji zaowocowało wykryciem 2 szczepów (75/01.K4, 177/03) posiadających w obrębie genu białka VP1 wstawkę wielkości około 400 – 500 nukleotydów wykazującą homologię do cIBDV. Analiza filogenetyczna pozwoliła

zidentyfikować grupę wirusów atypowych vvIBDV o zmienionej konfiguracji genetycznej w segmencie B, których pochodzenie jest dość niejasne. Najprawdopodobniej miała w tym przypadku miejsce rekombinacja homologiczna w obrębie VP1 ze szczepem klasycznym zjadliwym o nieznanym pochodzeniu, nie wyklucza się jednak reasortacji tj. wymiany segmentu B z wirusem z nieznanego rezerwuaru.

Wyniki badań zjadliwości *in vivo* wykazały niższą śmiertelność w grupach zakażonych szczepami atypowymi (20-30%) w porównaniu do szczepu wysoce zjadliwego (60%), jednak zakres zmian histopatologicznych w obrębie tF oraz wyliczony indeks rozwoju dla tego narządu nie wykazały istotnych statystycznie różnic. Z kolei w odniesieniu do polskiego reasortanta badania nie wykazały spadku zjadliwości dla kurcząt SPF (80% śmiertelności). Również zmiany histopatologiczne torby Fabrycjusza zarówno w ostrej fazie zakażenia (3-4 d.p.z.) jak i po przechorowaniu były analogiczne do grupy kontrolnej zakażonej szczepem vvIBDV. Badania na kurczętach potwierdzają, że mechanizm wirulencji IBDV jest wieloczynnikowy, uzależniony od obydwu genów, jednak słabo poznany, co otwiera pole do dalszych badań. Z uwagi na problemy zdrowotne w stadach szczepionych przeciwko IBD i jednocześnie zakażonych szczepami atypowymi, wskazane są dalsze badania nad skutecznością standardowych programów immunoprofilaktyki w odniesieniu do zakażeń wirusami choroby Gumboro o nietypowej kompozycji genetycznej.

SUMMARY

Infectious bursal disease is a highly infectious and contagious immunosuppressive viral disease of chickens with an economically and worldwide significance to the poultry industry. The primary tool in disease eradication is maintenance of strict biosecurity in poultry farms and implementation of vaccination programmes which should take into account the current epidemiological knowledge in the field. The first aim of dissertation was the preparation of diagnostic tools for detection of IBD. For this purpose there were developed or adapted two RT-PCR protocols. The first one is real time RT-PCR (rRT-PCR) which is used for rapid detection of pathogenic serotype 1 strains. The second method was based on conventional RT-PCR and in combination with sequencing is useful for identification of virus pathotype. Both methods are characterized by the high sensitivity and limit detection which exceeds $10^{0,01}$ EID₅₀/1 ml and $10^{1,7}$ EID₅₀/1 ml for rRT-PCR and RT-PCR, respectively. Moreover, both PCR assays had no cross-reactivity with other poultry RNA viruses.

In the present study the molecular characterization of 52 Polish IBDV strain collected between 1978 – 2015 was performed. Phylogenetic analysis based on both segments revealed the pathotype of examined strains - 5 strains belongs to classical virulent, 46 strains to very virulent and one strain was natural reassortant of IBDV (Bug_pop/03). The analysis of VP2 gene sequence has grouped all strains into 8 phylogenetic clusters. The conducted examinations have confirmed the previous reports that early classical IBDV from cluster 7 constitute a unique group of viruses which were circulating in Eastern Europe. In turn, viruses from cluster 8 shows high similarity to vaccine strains. Identification of such strains confirms the hypothesis of circulation of vaccine strains within the poultry population and their gradual evolution as evidenced by the presence of single amino acid changes. Tracking the molecular differentiation we have demonstrated a high degree of similarity of Polish very virulent strains from the first outbreak with Dutch and French strains isolated in 1989, which may indicate that the introduction of vvIBDV came from the Western Europe. However a high diversity among these very virulent strains indicates multiple introduction of the virus into the country over the years. Phylogenetic analysis of Polish vvIBDV strains based on the VP1 gene showed that viruses formed two clusters VP1.1 and VP1.2. The IBDV strains of the group 1 are characterised by the low levels of the nucleotide sequence variation which confirms the amino acid sequence analysis and represent a typical very virulent aa profile. In turn, the IBDV strains of group 2 revealed similarity based on nucleotide and deduced amino acid sequence both to very virulent and classic virulent IBDV, respectively. The use of statistical algorithms for detection of recombination events resulted in detection of 2 strains (75/01.K4, 177/03) that possess a 400 – 500 nucleotide long insert with high homology to cIBDV among VP1 gene. The phylogenetic analysis helped uncover a group of atypical vvIBDV with altered genetic information in segment B the origin of which is unclear. It is the most probable that homologous recombination

takes place with classic virulent strain of unknown origin, however we cannot exclude that the reassortment event involving the exchange of segment B with virus from an unknown reservoir has happened.

The results of *in vivo* studies have exhibited lower mortality in groups infected with an atypical strains (20-30%) when compared to the very virulent strain (60%), but the range of histopathological lesions in the bursa and the bursa/body weight ratios reveals no statistically significant differences. In contrast, the Polish reassortant strain did not induce a reduction of SPF chicken mortality (80%). Moreover, the observed macroscopic lesions in the bursa tissues of chickens in acute phase of infection (3-4 d.p.i.) and from convalescent chickens were similar to the control group infected with vvIBDV strain. The experimental study confirms the multifactorial nature of IBDV virulence which is related to both genes, and it is still poorly understood but opens the door for further research. Due to the health problems in flocks infected with atypical strains and vaccinated against IBD, further studies are needed to assess the vaccines efficacy on such virus infection.