

## STRESZCZENIE

Produkcja drobiarska w Polsce ulega stałemu i szybkiemu rozwojowi, jednak wielkostatny chów drobiu stwarza stałe niebezpieczeństwo wybuchu chorób zakaźnych, z których szczególnie groźne są choroby wirusowe. Ważnym ogniwem w transmisji zakażeń wirusowych u drobiu są ptaki wolno żyjące, które mogą pełnić rolę rezerwuaru wielu patogenów.

Obiektem badań w niniejszej pracy były czynniki wirusowe, ważne z punktu widzenia zagrożenia epidemiologicznego dla drobiu tj. ARV, GoCV oraz GHPV. Stada drobiu wodnego z uwagi na wolnowybiegowy system chowu są szczególnie narażone na kontakt z ptakami wolno żyjącymi, które mogą stanowić potencjalne źródło wirusa. Ważną rolę w ochronie stad drobiu przed zakażeniami wirusowymi pełni immunoprofilaktyka i bioasekuracja ograniczające ryzyko wprowadzenia zakażeń na fermę.

Głównym celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej, że ptaki wolno żyjące mogą stanowić źródło zakażeń ARV, GoCV oraz GHPV dla drobiu w Polsce. W celu poznania sytuacji epidemiologicznej w kraju podjęto badania nad oceną prewalencji zakażeń ARV, GoCV i GHPV u ptaków wolno żyjących oraz charakterystyką molekularną występujących obecnie szczepów terenowych tych wirusów. Przeprowadzone badania miały na celu opracowanie metod identyfikacji, a następnie analizę molekularną wybranych genów ARV, GoCV i GHPV. Określenie zmian w obrębie sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych tych genów pozwoliło ocenić zmienność genetyczną szczepów terenowych izolowanych od ptaków wolno żyjących.

W pierwszej części opracowano RT-PCR oraz nested PCR, które pozwoliły na wykrycie obecności materiału genetycznego ARV u 116 z 294 przebadanych (39,5%) ptaków wolno żyjących reprezentujących różne gatunki. Pozytywny wynik reakcji uzyskano we wszystkich rodzajach badanych narządach wewnętrznych. Najczęściej obecność ARV potwierdzano w próbkach z płuc oraz nerek, co wskazuje, że mogą stanowić najlepszy materiał do izolacji szczepów ARV od ptaków wolno żyjących.

Badania z wykorzystaniem zarodków kurzych SPF wykazały patogenność większości badanych szczepów ARV izolowanych od różnych gatunków ptaków wolno żyjących. Wykorzystując klasyczne metody wirusologiczne stworzono kolekcję 50 szczepów ARV powodujących efekt cytopatyczny o różnym stopniu nasilenia w hodowli komórek CEK. W celu potwierdzenia namnożenia ARV homogenaty płynów, błon i narządów zakażonych

zarodków SPF oraz materiały z trzeciego pasażu hodowli komórek CEK, przebadano za pomocą AGID. Wynik pozytywny uzyskano dla wszystkich zakażonych zarodków SPF oraz 29-ciu badanych materiałów z trzeciego pasażu. W związku z wykryciem obecność antygeny ARV tylko w części zakażonych hodowli komórkowych zostały one dodatkowo przebadane za pomocą wcześniej opracowanych metod biologii molekularnej. Obecność genu  $\sigma$ NS potwierdzono w 50 materiałach z trzeciego pasażu w hodowli komórek CEK.

Następnym etapem było określenie zmian występujących w sekwencji nukleotydowej jak i aminokwasowej w oparciu o gen  $\sigma$ NS 40 szczepów ARV od ptaków wolno żyjących oraz 6 archiwalnych szczepów ARV izolowanych od drobiu. Przeprowadzona analiza sekwencji nukleotydowej wykazała obecność licznych mutacji punktowych typu transwersji oraz tranzycji w porównaniu do szczepu referencyjnego S1133 ARV. Około 41% mutacji punktowych zidentyfikowanych na poziomie nukleotydowym przekładało się na zmianę aminokwasu w białku, co świadczy o molekularnym zróżnicowaniu badanych szczepów. W toku analiz oznaczono procent podobieństwa szczepów ARV względem siebie oraz względem szczepu referencyjnego. Drzewo filogenetyczne przygotowane w oparciu o sekwencję nukleotydową genu  $\sigma$ NS wykazało przynależność badanych szczepów do 8 podgrup tworzących oddzielną grupę genetyczną. W przypadku analizy filogenetycznej przeprowadzonej na podstawie sekwencji aminokwasowej badane szczepy zostały zakwalifikowane do 5 podgrup. Bliskie pokrewieństwo między szczepami ARV zidentyfikowanymi u ptaków wolno żyjących, a polskimi szczepami izolowanymi od drobiu, wskazuje że ptaki te są potencjalnym źródłem wirusa dla stad drobiu w Polsce.

W kolejnym etapie pracy zoptymalizowano RT-PCR oraz nested PCR służące do wykrywania genu  $\sigma$ C stanowiącego podstawę określania genotypu ARV. W badaniach napotkano na duże trudności w wykryciu sekwencji kodującej  $\sigma$ C szczepów ARV namnożonych w hodowli komórek CEK, co może wskazywać na ich znaczną zmienność genetyczną. Wynik pozytywny uzyskano jedynie w przypadku 2 szczepów od bocianów białych oraz bielika, a dalsze badania filogenetyczne wykazały ich przynależność do genotypu 1 oraz bliskie pokrewieństwo ze szczepem S1133.

W drugiej części opracowano czułą i szybką reakcję CPA do wstępnej identyfikacji izolatów GoCV. Wykorzystując tą metodę wykazano, po raz pierwszy na świecie, obecność DNA GoCV w materiale biologicznym pochodzącym od innych gatunków ptaków niż gęsi. Przeprowadzone badania wykazały u ptaków wolno żyjących prewalencję zakażeń GoCV na poziomie 26%, co wskazuje na możliwość transmisji wirusa na stada gęsi w naszym kraju. Obecność materiału genetycznego wirusa potwierdzono we wszystkich badanych tkankach

narządów wewnętrznych, potwierdzając w ten sposób wielonarządowy charakter zakażeń. W kolejnym etapie pracy, wybrane izolaty GoCV od ptaków wolno żyjących oraz izolaty GoCV od gęsi znajdujące się w kolekcji ZCHD zostały poddane badaniu z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w celu amplifikacji fragmentu ORFC1. Opracowane reakcje z uwagi na wysoką czułość mogą być stosowane do rutynowego wykrywania zakażeń GoCV na wczesnych etapach infekcji charakteryzujących się niskim mianem wirusa.

Analiza sekwencji nukleotydowej uzyskanego fragmentu ORFC1 wykazała obecność mutacji punktowych specyficznych wyłącznie dla polskich izolatów GoCV od ptaków wolno żyjących oraz gęsi. Ponadto wykryto mutacje wspólne z wcześniej zidentyfikowanymi szczepami GoCV izolowanymi w Polsce, Chinach i Tajwanie. Wyniki analizy molekularnej świadczą o dużym zróżnicowaniu genetycznym badanych izolatów GoCV. Na podstawie analizy filogenetycznej polskie izolaty GoCV zaklasyfikowano do 3 odrębnych grup genetycznych z podobieństwem nukleotydowym i aminokwasowym na poziomie 74,4-100%.

Badania podjęte w trzeciej części pracy dostarczają nowej wiedzy w zakresie patogenezy GHPV, gdyż metodami molekularnymi potwierdzają możliwość zakażeń tym patogenem nie tylko u gęsi i kaczek, ale również u innych gatunków ptaków wolno żyjących. Opracowana metoda PCR pozwoliła na wykrycie materiału genetycznego GHPV w tkankach 71 (24,2%) ptaków reprezentujących 16 gatunków. Najczęściej DNA wirusa wykrywano w próbkach z żołądka i jelit. Uzyskane wyniki wskazują, że wirus jest wydalany wraz z odchodami zakażonych ptaków, a kontakt pomiędzy ptakami wolno żyjącymi oraz stadami gęsi i kaczek stanowi potencjalną drogę rozprzestrzeniania się GHPV.

W kolejnym etapie przeprowadzono charakterystykę molekularną wybranych izolatów GHPV zidentyfikowanych u ptaków wolno żyjących, a następnie porównano je ze szczepami krążącymi w stadach gęsi i kaczek. Analiza pełnej sekwencji nukleotydowej genów VP1 i VP2 pozwoliła na wykrycie nowych mutacji w porównaniu z szczepami GHPV zamieszczonymi w bazie GenBank. Większość mutacji punktowych przekładała się na zmianę aminokwasu w analizowanych białkach. W dalszej części pracy określano procent podobieństwa badanych sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych izolatów GHPV względem siebie oraz szczepu referencyjnego GHPV. Dodatkowo w celu poznania relacji występujących między polskimi izolatami GHPV, a szczepami pochodzącymi z innych krajów przeprowadzono analizę filogenetyczną. Uzyskane wyniki potwierdziły rolę ptaków wolno żyjących jako źródła szczepów GHPV dla stad drobiu wodnego w naszym kraju.



## SUMMARY

Poultry farming in Poland undergoes constant and rapid development, but the large-scale poultry breeding creates a permanent risk of outbreak of infectious diseases, of which viral diseases are particularly dangerous. An important link in the transmission of viral infections in poultry are free-living birds that can function as a reservoir of many pathogens.

Viral factors, important from the point of view of epidemiological threat to poultry *i.e.*: ARV, GoCV, and GHPV, were the object of this thesis. Flocks of waterfowl due to the free-range raising system are particularly exposed to free-living birds that may be a potential source of viruses. Full immunoprophylaxis and biosecurity limiting the risk of introducing infection to a farm play an important role in the protection of poultry flocks against viral infections.

The main goal of the thesis was to verify the research hypothesis that free-living birds can be a source of ARV, GoCV, and GHPV infections for poultry in Poland. In order to determine the epidemiological situation in the country, studies were undertaken to assess the prevalence of ARV, GoCV, and GHPV infections in free-living birds as well as the molecular characteristics of the currently existing field strains of these viruses. The study aimed at the development of methods for the identification and then molecular analysis of selected ARV, GoCV, and GHPV genes. Determination of mutations within the nucleotide and amino acid sequences of the genes and proteins will allow to assess the genetic variability of field strains isolated from free-living birds.

In the first part of the study, RT-PCR and nested PCR were developed. The methods allowed to detect the presence of ARV genetic material in 116 out of 294 (39.5%) examined free-living birds representing different species. The positive result of the reaction was obtained in all types of the examined internal organs. Mostly, the presence of ARV was confirmed in samples of the lungs and kidneys. This indicates that the organs can be the best material for isolation of ARV strains from free-living birds.

Studies with the use of chicken SPF embryos have demonstrated the pathogenicity of the majority of ARV strains isolated from different species of free-living birds. Collection of 50 ARV strains causing a cytopathic effect of varying degrees of severity in CEK cell culture was created using the classical virological method. In order to confirm the propagation of ARV, homogenates of embryonic fluids, membranes, and organs collected from infected SPF embryos and materials from the third passage of CEK cell culture were tested by AGID. A positive result was obtained for all infected chicken SPF embryos and 29 examined materials

from the third passage. In connection with the detection of the presence of ARV antigen in part of the infected cell cultures they were tested with previously developed molecular biology methods. The presence of  $\sigma$ NS gene was confirmed in 50 materials from the third passage in CEK cell cultures.

The following stage was to determine mutations within nucleotide and amino acid sequence on the basis  $\sigma$ NS gene of 40 ARV strains isolated from free-living birds and 6 archival ARV strains isolated from poultry. The conducted nucleotide sequence analysis revealed the presence of numerous point mutation type transversions and transitions in comparison to the ARV reference strain S1133. About 41% of the point mutations identified at the nucleotide level translated into amino acid change in the protein, which indicates the molecular differentiation of the tested strains. In the course of the analysis, the percentage of similarity of ARV strains to each other and relative to the reference strain was determined. The phylogenetic tree, created on the basis of the nucleotide sequence of the  $\sigma$ NS gene, shared examined strains to eight subgroups forming a separate genetic group. In the case of phylogenetic analysis based on amino acid sequence, examined strains were shared into five subgroups. The close relationship between ARV strains identified in free-living birds and Polish strains isolated from poultry indicates that these birds are a potential source of virus for poultry flocks in Poland.

In the next stage of research, RT-PCR and nested PCR were optimised to detect the  $\sigma$ C gene constituting the basis for determining the ARV genotype. The studies demonstrated that it is very difficult to detect the nucleotide sequences of the  $\sigma$ C-encoding gene of ARV strains propagated in CEK cell culture, which may indicate their significant genetic variability. A positive result was obtained only for two strains from white storks, white-tailed eagles, and further phylogenetic studies showed their belonging to genotype 1 and a close relationship with strain S1133.

In the second part of the study, a sensitive and quick CPA reaction was developed for the initial identification of GoCV isolates. Using this method, the presence of GoCV DNA, for the first time in the world, has been demonstrated in biological material from other species of birds than geese. The conducted research showed prevalence of GoCV infections at the level of 26% in free-living birds, which indicates the possibility of virus transmission to flocks of geese in our country. The presence of genetic material of the virus was confirmed in all tissues of internal organs, thus confirming the multisystemic infections. In the following stage, selected GoCV isolates from free-living birds as well as GoCV isolates from geese in the ZCHD collection were subjected to real-time PCR for the amplification ORFC1 fragment. The

developed reactions due to their high sensitivity can be used for routine detection of GoCV infections in the early stages of infection characterised by a low viral titre.

The analysis of the nucleotide sequence of the ORFC1 fragment showed the presence of point mutations specific only to Polish GoCV isolates from free-living birds and geese. In addition, common mutations were identified with previously identified GoCV strains isolated in Poland, China, and Taiwan. The results of the molecular analysis indicate a high genetic variability of the examined GoCV isolates. On the basis of phylogenetic analysis, Polish GoCV isolates were shared to 3 separate genetic groups with nucleotide and amino acid similarity at the level of 74.4%–100%.

The research undertaken in the third part provides new knowledge in the field of GHPV pathogenesis, because molecular methods confirm the possibility of infections with these pathogens not only in geese and ducks, but also in other species of free-living birds. The developed PCR method allowed to detect GHPV genetic material in tissues of 71 (24.2%) birds representing 16 species. Mostly, viral DNA was detected in samples of the gizzard and intestines. The obtained results indicate that the virus is excreted with the droppings of infected birds, and the contact between free-living birds and flocks of geese and ducks constitutes a potential route for the spread of GHPV.

In the next stage, molecular characteristics of selected GHPV isolates identified in free-living birds were carried out, and then they were compared with the strains circulating in the flocks of geese and ducks. Analysis of the full nucleotide sequence of the VP1 and VP2 genes allowed the detection of new mutations compared to the GHPV strains deposited in the GenBank database. Most point mutations were translated into amino acid changes in the analysed proteins. In the following stage of the research, the percentage of similarity of the examined nucleotide and amino acid sequences of GHPV isolates to each other and to the reference strain GHPV was determined. In addition, phylogenetic analysis was performed to understand the relationships between Polish GHPV isolates and strains from other countries. The obtained results confirmed the role of free-living birds as a source of GHPV strains for poultry flocks in our country.