

## Streszczenie

Grypa ptaków (AI, ang. avian influenza) jest jedną z najważniejszych jednostek chorobowych drobiu i ptaków wolno żyjących, która widnieje na liście chorób Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH, ang. World Organisation for Animal Health). Wybuchy ognisk AI pociągają za sobą ogromne straty materialne dla sektora drobiarskiego i powiązanych z nim gałęzi przemysłu, a ponadto stanowią narastające zagrożenie dla zdrowia publicznego. Czynnikiem etiologicznym AI jest wirus grypy ptaków (AIV) typu A - *Alphainfluenzavirus* z rodziny Orthomyxoviridae - charakteryzujący się wysoką zmiennością genetyczną. Jako wirus RNA o segmentowanym genomie, AIV nieustannie podlega dwóm podstawowym mechanizmom zmienności - dryfowi genetycznemu i reasortacji. Oba ww. mechanizmy warunkują stałą ewolucję wirusa, która może prowadzić do nabywania nowych cech adaptacyjnych, a nawet przetamywania barier międzygatunkowych. Wyróżnia się dwie formy AIV: nisko zjadliwą (LPAIV) oraz wysoce zjadliwą (HPAIV), a stosowana klasyfikacja opiera się na zdolności wirusa do wywoływania choroby w modelu *in vivo* - u kur. Przemiana LPAIV do formy HPAIV jest możliwa w wyniku spontanicznej mutacji w miejscu cięcia hemaglutyniny (HACS, ang. haemagglutinin cleavage site). Może do niej dojść np. w przypadku introdukcji LPAIV do drobiu na skutek kontaktu stada z naturalnymi gospodarzami i rezerwuarem AIV w środowisku - przedstawicielami rzędów blaszkodziobych i siewkowych. Śledzenie zmienności AIV w warunkach naturalnych oraz eksperymentalne badanie jej mechanizmów pozwala lepiej zrozumieć dynamikę epidemii, w tym proces przetamywania barier międzygatunkowych, stanowiąc element wczesnego ostrzegania przed pojawianiem się wariantów potencjalnie niebezpiecznych dla zwierząt i ludzi.

Celem pierwszego zadania badawczego pracy doktorskiej była ocena różnorodności genetycznej wirusów LPAI (n=9) i HPAI (n=43), wykrytych na terenie Polski w latach 2018-2022, jak również określenie mechanizmów zmienności genetycznej tych wirusów oraz próba identyfikacji markerów genetycznych modulujących właściwości biologiczne AIV. Przeprowadzona analiza filogenetyczna potwierdziła przynależność polskich wirusów HPAI do kladu 2.3.4.4b linii H5 Goose/Guangdong, a dla większości z nich wykazane zostało również pokrewieństwo z wirusami występującymi w tym czasie w Europie. W sezonie HPAI 2020/2021 w Polsce jako dominujący podtyp określony został H5N8 HPAIV, a rok później wykrywano wyłącznie genotypy H5N1 HPAIV (G1-G7). Jeden z nich - reasortant H5N1-G7 - stanowił niezależną introdukcję spoza Europy. Następnie, wykluczono pokrewieństwo filogenetyczne między wirusami o odmiennym stopniu zjadliwości (HP/LP), co neguje rolę wykrytych w kraju wirusów LPAI jako donorów genów dla wirusów HPAI w Polsce (2020- 2022). Jednak analiza filogenetyczna pozwoliła na identyfikację dużej różnorodności wirusów H5N8 HPAI, powiązanych z masowymi upadkami łabędzi nad Zatoką Gdańską w 2021 r., implikując jednoczesną introdukcję co najmniej pięciu różnych wirusów do tego regionu.

Powyższe wskazuje na fakt, że różnorodność genetyczna wirusów HPAI w latach 2020-2022 była wynikiem współwystępowania różnych mechanizmów, m.in. dryfu genetycznego, reasortacji oraz niezależnych introdukcji, w tym z odległych geograficznie regionów świata. Dalsza charakterystyka molekularna sekwencji wirusów LPAI oraz HPAI wykazała obecność różnorodnych markerów genetycznych wpływających na właściwości adaptacyjne wirusa (zjadliwość AIV, wiązanie receptorów, odpowiedź immunologiczna, etc.). Może to sugerować stopniowy wzrost potencjału zoonotycznego krążących wirusów. W ramach drugiego zadania badawczego niniejszej rozprawy podjęto próbę określenia zmian w różnorodności i złożoności populacji wirusa w cyklu jednego eksperymentalnego zakażenia wybranych gatunków drobiu (kur, przepiórek, indyków i kaczek). Do inokulacji ptaków użyto H7N7 LPAIV, który pochodził od kaczki krzyżówki i nie wykazywał cech adaptacji do drobiu (tzw. „typ dziki” wirusa). W 2, 4 i 7 dniu po zakażeniu (dpi) od ptaków pobierane były wymazy z jamy dziobowo-gardłowej i kloaki, które następnie wykorzystano do oceny poziomu siewstwa AIV z obu miejsc jego replikacji. W dalszym przebiegu wymazy poddane zostały sekwencjonowaniu wysokoprzepustowemu (ang. High-Throughput sequencing) na platformie Illumina, a następnie były przedmiotem rozszerzonej analizy wariantów. Populacje wirusowe pochodzące z każdego wymazu scharakteryzowano na podstawie wybranych parametrów (np. liczba wariantów, entropia Shannona), aby ocenić różnorodność genetyczną populacji wirusowych. Podczas analizy szczególną uwagę poświęcono także selekcji wariantów o potencjalnych zdolnościach adaptacyjnych, które opisano w literaturze.

Badania eksperymentalne potwierdziły, że przy dawce 106 EID<sub>50</sub> wirus inokulacyjny - H7N7 LPAIV „typu dzikiego” - może skutecznie zakażać wybrane gatunki drobiu, a zakażenie ma zwykle przebieg krótkotrwały i bezobjawowy. Potwierdzono, że tropizm ww. wirusa zależy od rzędu gospodarza - u drobiu grzebiącego dominuje replikacja w układzie oddechowym, a u drobiu wodnego w układzie pokarmowym, co skutkuje odmiennymi drogami transmisji AIV u tych grup. Szczegółowa analiza populacji wirusowych z obydwu układów wykazała, że replikacja H7N7 LPAIV „typu dzikiego” prowadzi do powstania populacji zdominowanej przez warianty mniejszościowe (<10%), odzwierciedlające wczesny etap adaptacji do nowego gospodarza. Potwierdzono, że warianty potencjalnie modulujące właściwości biologiczne wirusa, mogą pojawiać się w trakcie zakażenia drobiu, jednak nie są utrwalane w sekwencji konsensusowej. Mimo to, jeden z wariantów - MP-G950A [M2: D88N] - jest kandydatem do dalszych testów funkcjonalnych *in vitro* ze względu na swoje występowanie u wszystkich gatunków drobiu. W przeprowadzonych badaniach nie potwierdzono trwałych międzygatunkowych różnic w kumulatywnej liczbie lub udziale poszczególnych wariantów. Natomiast kaczki stanowiły jedyny gatunek z wyższą różnorodnością genetyczną AIV w tchawicy niż w kloace, co może wynikać z odmiennego środowiska selekcyjnego w układzie oddechowym w porównaniu z przewodem pokarmowym. Jednak w interpretacji tych wyników należy uwzględnić silną

ujemną korelację „entropia Shannona-siewstwo” , która może zaniżać estymację różnorodności w układzie pokarmowym.

Wyniki badań uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej sugerują, że konieczne jest wzmocnienie monitoringu AIV w populacji wolno żyjącej, który będzie obejmować wykrywanie oraz analizę genomową nie tylko HPAIV, ale również LPAIV. W tym zakresie należy położyć szczególny nacisk na identyfikację i śledzenie markerów genetycznych o potencjale funkcjonalnym. Ponieważ mechanizmy adaptacji AIV pozostają w dużej mierze nieznane, zasadne wydaje się również kontynuowanie badań nad ewolucją wirusów AI. Niemniej jednak, konieczne jest uwzględnienie czynników immunologicznych gospodarza.