

## STRESZCZENIE

Rozwój hodowli gęsi oraz kaczek w Polsce jest z roku na roku coraz bardziej dynamiczny. Jednak wielkostadny chów niesie za sobą wysokie ryzyko wybuchu chorób zakaźnych, a zwłaszcza chorób o etiologii wirusowej. Ważnym ogniwem w transmisji patogenów są ptaki wolno żyjące oraz specyfika wolnowybiegowej hodowli gęsi wymagająca dostępu do zbiorników wodnych umiejscowionych na świeżym powietrzu. Główną rolę w ochronie stad drobiu wodnego przed zakażeniem wirusowym pełni immunoprofilaktyka i bioasekuracja, znacząco ograniczająca ryzyko wprowadzenia patogenu na fermę.

Najbardziej zakaźną i ostro przebiegającą chorobą wirusową drobiu wodnego jest choroba Derzsy'ego (DD), jednak coraz większe znaczenie epidemiologiczne oraz ekonomiczne zyskują zakażenia cirkowirusem gęsim (GoCV) mającym działanie immunosupresyjne oraz polyomawirusem gęsim (GHPV) wywołującym syndrom krwotocznego zapalenia nerek i jelit (HNEG), charakteryzujący się gwałtownym przebiegiem i wysoką śmiertelnością. Obiektem badań w niniejszej rozprawie były czynniki wirusowe, niezwykle ważne z punktu widzenia epidemiologicznego w przypadku hodowli drobiu wodnego, tj. GHPV oraz GoCV. W celu poznania sytuacji epidemiologicznej kraju podjęto badania nad oceną prewalencji GHPV i GoCV oraz charakterystyką molekularną krążących obecnie szczepów terenowych w Polsce. Przeprowadzone badania miały na celu opracowanie metod identyfikacji, a następnie analizę molekularną wybranych genów GHPV oraz GoCV. Określenie zmian w obrębie sekwencji nukleotydowych oraz aminokwasowych tych genów pozwoliło ocenić zmienność genetyczną szczepów terenowych pochodzących od gęsi hodowlanych w Polsce.

W pierwszej części pracy badania dostarczają nowej wiedzy w zakresie patogenyzy GHPV, gdyż opracowane metody molekularne pozwalają nie tylko na wykrywanie obecności materiału genetycznego wirusa w tkankach pochodzących od gęsi oraz kaczek, ale również na namnożenie wirusa. Opracowany konwencjonalny PCR pozwala na wykrycie DNA GHPV w homogenatach pochodzących ze 100 spośród 185 stad gęsi hodowlanych w Polsce. Najczęściej identyfikowano materiał genetyczny wirusa w materiale pochodzącym z nerek, jelit, wątroby oraz serca. Uzyskane wyniki wskazują, że drogą rozprzestrzeniania się zakażenia GHPV mogą być odchody zakażonych ptaków.

W kolejnym etapie pracy dokonano charakterystyki molekularnej wybranych szczepów zidentyfikowanych u gęsi hodowlanych w Polsce, a następnie porównano je ze szczepami krążącymi w stadach gęsi i kaczek. Analiza pełnej sekwencji nukleotydowej genu VP1 pozwoliła na wykrycie nowych mutacji, a następnie porównanie z sekwencjami szczepów umieszczonych w bazie danych GenBank (NCBI). Większość mutacji punktowych przekłada się na zmianę aminokwasu w analizowanych białkach.

W dalszej części pracy określano procent podobieństwa badanych sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych szczepów GHPV względem siebie oraz względem sekwencji szczepu referencyjnego GHPV. Dodatkowo w celu poznania relacji występujących między polskimi sekwencjami szczepów a sekwencjami szczepów pochodzącymi z innych krajów przeprowadzono analizę filogenetyczną. Uzyskane wyniki pozwoliły wykreślić drzewo filogenetyczne potwierdzające zróżnicowanie nukleotydowe oraz aminokwasowe badanych sekwencji szczepów w stosunku do szczepu referencyjnego oraz innych szczepów krążących w kraju i na świecie.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono badania z wykorzystaniem zarodków gęsi, które wykazały patogenność badanych szczepów GHPV izolowanych od stad gęsi hodowlanych w Polsce. Wykorzystując klasyczne metody wirusologiczne stworzono kolekcję szczepów GHPV, które tworzyły efekt cytopatyczny o różnym stopniu nasilenia w hodowli komórek GEK. W celu potwierdzenia namnożenia GHPV homogenaty płynów, błon oraz narządów zakażonych zarodków gęsi, jak i materiały z trzeciego i szóstego pasażu hodowli komórek GEK przebadano za pomocą konwencjonalnej techniki PCR. Wynik pozytywny uzyskano dla wszystkich zakażonych zarodków gęsi oraz dla pięciu badanych materiałów z szóstego pasażu.

Następnie opracowano i zoptymalizowano metodę real-time PCR, czyli reakcję amplifikacji w czasie rzeczywistym, w celu powielania wybranego fragmentu kapsydu GHPV. Opracowana reakcja ze względu na wysoką czułość może być stosowana do rutynowego wykrywania zakażeń GHPV przy niskiej liczbie kopii wirusa.

Badania podjęte w drugiej części dysertacji dostarczają wiedzy na temat zakażeń GoCV. W pierwszym etapie opracowano konwencjonalny PCR dla fragmentu ORFC1, który pozwolił na wykrycie materiału genetycznego GoCV w 38 stadach gęsi hodowlanych w Polsce. Pozytywny wynik reakcji uzyskano w homogenatach pochodzących ze wszystkich narządów wewnętrznych.

Następnie opracowano konwencjonalny PCR dla fragmentu białka kapsydu o długości 445 pz (10 stad) oraz dla całego białka Rep o długości 976 pz (15 stad).

W kolejnym etapie pracy dokonano charakterystyki molekularnej wybranych szczepów pochodzących ze stad gęsi hodowlanych w Polsce oraz charakterystyki molekularnej zmian występujących w sekwencji nukleotydowej oraz aminokwasowej. Przeprowadzona analiza sekwencji wykazała obecność licznych mutacji punktowych typu transwersja oraz tranzycja w odniesieniu do sekwencji szczepu referencyjnego GoCV. Mutacje punktowe zidentyfikowane na poziomie nukleotydowym, przekładały się na zmianę aminokwasu w białku, co świadczy o molekularnym zróżnicowaniu badanych szczepów. Ponadto wykryte mutacje punktowe są wspólne z mutacjami jakie wcześniej zidentyfikowano charakteryzując szczepy GoCV izolowane w Polsce, Chinach, Węgrzech i na Tajwanie.

W dalszym etapie analiz oznaczono procent podobieństwa sekwencji szczepów GoCV względem siebie oraz względem sekwencji szczepu referencyjnego. Drzewo filogenetyczne przygotowane w oparciu o sekwencję nukleotydową genu ORFC1 pozwoliło na zaklasyfikowanie badanych szczepów do czterech grup genetycznych, natomiast w oparciu o sekwencję białka Rep zaklasyfikowano badane sekwencje szczepów do trzech grup genetycznych. Wyniki analizy filogenetycznej świadczą o dużym zróżnicowaniu genetycznym badanych szczepów GoCV.

Reasumując należy zauważyć, że uzyskane wyniki badań własnych wskazują na możliwość zastosowania opracowanych metod w rutynowych badaniach diagnostycznych w przypadku zakażeń polyomawirusem gęsim oraz cirkowirusem gęsim.

## SUMMARY

The development in geese and duck breeding in Poland is getting more dynamic from year to year. However, multiflock breeding comes with a very high risk of infectious diseases outbreak, especially the ones of viral etiology. The birds living in freedom as well as the specifics of free range geese breeding, which require access to fresh water outdoors reservoirs, are an important loop in the chain of pathogen transmission. With focus on significantly decreasing the risk of introducing a pathogen to the farm, immunoprevention and bioinsurance both play a vital role in protecting the waterfowl flocks. The Derzsy disease (DD) is by far the most infectious and with the most severe course viral waterfowl disease, but infections caused by goose circovirus (GoCV) and goose polyomavirus (GHPV), responsible for hemorrhagic nephritis enteritis of geese (HNEG), characterised by severe course and high mortality rate, are gaining both epidemiological and economical importance. The subject of analysis for the following study were the viral agents on the up rise of significance from the epidemiological point of view concerning waterfowl breeding: GoCV and GHPV. In order to investigate the epidemiological situation in the country, prevalence evaluation on GoCV and GHPV as well as study of molecular characteristics of field strains circulating at present in Poland were conducted. Main purpose of that primary research was to develop identification methods and in the next step, to perform molecular analysis of the chosen genes of GoCV and GHPV viruses. Determining the changes in nucleotide and aminoacid sequences of those genes allowed performing an evaluation of genetic variation of the field strains isolated from breeding geese in Poland.

The first part of the research provides valuable information in regards of GHPV pathogenesis, because the developed methods allowed not only detection of genetic material of the virus in tissue samples collected from geese and duck, but also the virus replication in vitro. The developed conventional PCR set enabled the detection of GHPV DNA in homogenates obtained from 28 out of 78 total examined breeding geese flocks in Poland. The most common tissues with identified occurrence of the virus genetic material were sampled from kidneys, intestines, liver and heart. Obtained results signalise that excrements of infected birds are the possible source of the contagion. The next phase of the study was to conduct a molecular characteristics of chosen GHPV-positive isolates identified among the population of breeding geese in Poland, and then comparison to the strains circulating in the flocks of geese and duck. The analysis of gene VP1 full nucleotide sequence allowed the discovery of new mutations, as compared to data stored in GenBank database. Most of the point mutations were proven

to translate to amino acid changes in the analysed proteins. In the further part of this paper the similarity percentage between the examined GHPV sequenced nucleotide and amino acid isolates and against the reference GHPV strain was investigated. In addition, in order to comprehend the relations between Polish isolates and strains from other countries, a phylogenetic analysis was conducted. In the next part of this study, research with the usage of infected geese embryos was performed, proving the pathogenicity of tested GHPV strains isolated from breeding geese flocks in Poland. Classical virusology methodology was then used in order to create a collection of GHPV strains causing varying degrees of cytotoxic effect in GEK cells cultures. With the purpose of confirming the GHPV virus replication, homogenates of fluids, membranes and internal organs of infected geese embryos as well as materials from the third and sixth cell passages of the GEK cultures were subjected to a classical PCR test. The positive result was obtained for all of the infected geese embryos' samples and five of the examined materials from the sixth cell passage. The next step was to develop and optimise the real-time PCR method, in order to amplify the chosen fragment of GHPV viral capsid. The designed reaction due to its high sensitivity is valid for usage in routine detection tests for GHPV infections in the contagion phases where the virus titer in the sample is low.

The examination process conducted in the second part of the research provides knowledge on the GoCV infection pathogenesis. Firstly, a conventional PCR test for ORFC1 fragment was designed, which allowed the discovery of GoCV virus genetic material in 41 breeding geese flocks in Poland. Positive results were obtained from homogenates prepared from all internal organs. The next step involved development of conventional PCR test for the capsid protein fragment of 445 bps length and protein Rep fragment of 976 bps. In the next phase of the research, molecular characteristics of chosen isolates derived from breeding geese flocks in Poland were examined, as well as evaluation of changes in the nucleotide and amino acid sequences. The performed sequences analysis revealed point mutations of transverse type as well as transitions when compared against the reference GoCV strain. Point mutations identified on the nucleotide level translated into changes in amino acid of the protein product, which provides the proof of molecular diversity among the examined strains. Furthermore, the discovered point mutations are consistent with previously identified strains of GoCV virus isolated in Poland, Hungary as well as China and Taiwan. The next step of analysis evaluated the percentage of similarities between isolated GoCV strains and against the reference strain. A phylogenetic tree was then prepared based on the ORFC1 gene nucleotide sequence allowing the classification of examined strains into 4 genetic subgroups, and protein Rep into 3 genetic

subgroups . The results of phylogenetic analysis prove high genetic variety of the examined GoCV isolates.

In conclusion, it is to be noted that the results obtained from this self-reported study point to a possibility of application developed methods in routine diagnostic tests for cases of both goose polyomavirus and goose circovirus infections.