
1. STRESZCZENIE

Rozwój hodowli gęsi i kaczek w Polsce jest bardzo dynamiczny. Najbardziej zakaźną i ostro przebiegającą wirusową chorobą drobiu wodnego jest choroba Derzsy'ego (DD), a jej czynnik etiologiczny - parwowirus - był obiektem badań niniejszej pracy, która miała charakter dwuetapowy: część molekularna oraz serologiczna.

W celu szybkiej identyfikacji parwowirusa gęsiego (GPV) opracowano metodę LAMP. Technika ta umożliwiła wykrywanie GPV już po 30 minutach. Metoda ta cechowała się specyficnością i wysoką czułością wynoszącą 0,1 TCID₅₀ szczepu 24/03 GPV. Zidentyfikowany materiał namnażano w hodowlach komórkowych (GEF), a następnie zastosowano do analizy filogenetycznej, która oparta była na sekwencji kodującej jedno z trzech kapsydowych białek- białko VP3. Wszystkie polskie izolaty wykazywały europejskie pochodzenie, cechowały się wysokim stopniem homologii i utworzyły w dendrogramie odrębną polską grupę.

W dalszej części badań własnych podjęto próby otrzymania rekombinowanego białka VP3 w systemie ekspresyjnym *E. coli*. Pod uwagę wzięto wyższość *E.coli* nad pozostałymi systemami ekspresyjnymi, a także wysoką immunogenność wybranego białka. Początkowo zastosowano gen kodujący całe białko VP3 o wielkości 60 kDa, jednak z uwagi na jego niski poziom ekspresji, dokonano wyboru dwóch epitopów VP3 GPV o znacznie mniejszej masie cząsteczkowej niż poprzednio zastosowany fragment. Ostatecznie obydwie wybrane determinanty antygenowe o masie 21 kDa oraz 32,3 kDa, charakteryzowały się wysokim poziomem ekspresji w komórkach *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI. Oczyszczano je za pomocą metody chromatografii metalopowinowactwa na złożu Ni²⁺ i zastosowano do dalszych badań.

Celem kolejnego etapu pracy było opracowanie testu ELISA z zastosowaniem otrzymanych białek rekombinowanych. Obydwa białka wykazywały immunoreaktywność w technice Western blott wobec użytych surowic gęsich. Do badań zastosowano 166 próbek surowicy gęsi, które uprzednio przebadano odczynem seroneutralizacji (SN). Optymalizacji poddano takie parametry jak: stężenie antygeny VP3ep4 oraz VP3ep6, rozcieńczenie surowicy, koniugatu (IgG królicze anty IgG gęsie znakowane peroksydazą chrzanową), a także wartości gęstości optycznej (OD) dla próbek dodatnich i ujemnych. Największą różnicę OD dla surowic dodatnich i ujemnych zaobserwowano przy zastosowaniu antygeny VP3ep4. Różnica ta była prawie dziewięciokrotna (OD_{min} 0,113, OD_{max} 0,914). W związku z

powyższym do dalszych badań wybrano białko o większej masie cząsteczkowej- VP3ep4, 32,3 kDa.

Po optymalizacji opracowanego testu ELISA, dokonano jego porównania z innymi dotychczas stosowanymi testami serologicznymi. Zgodność otrzymanego testu ELISA z odczynem SN wynosiła 91,5%, czułość 90,4%, natomiast swoistość 93%. Z kolei porównanie nowo opracowanego zestawu z testem ELISA wykorzystującym cały wirion GPV jako antygen wykazała bardzo wysoką czułość wynoszącą 97,8% oraz swoistość 94%. Opracowany test diagnostyczny cechuje się odtwarzalnością i powtarzalnością ($V < 10\%$), a brak reakcji z zastosowaniem surowic z przeciwciałami anty AIV i NDV potwierdza jego specyficzność.

Reasumując, należy zauważyć, że uzyskane wyniki badań własnych wskazują na możliwość zastosowania metody LAMP oraz testu ELISA w rutynowych badaniach diagnostycznych DD.

2. SUMMARY

The progress in geese and ducks production in Poland is very dynamic. The most infectious and acute viral disease of waterfowl is Derzsy's disease (DD) and its etiological agent - parvovirus - was the object of this study, which had two stages: molecular and serological part.

To cope with these two goals the rapid identification of goose parvovirus (GPV) using LAMP method was developed. This technique facilitated detection of GPV within 30 minutes. LAMP was highly specific and sensitive detecting approximately 0.1 TCID₅₀ of 24/03 GPV strain. The identified parvoviruses were propagated in cell cultures (GEFs), then used for phylogenetic analysis, on the basis of the sequences encoding VP3 protein representing one from three capsid proteins. All Polish isolates showed European origin and were characterized by a high degree of homology and formed separated Polish group at the dendrogram.

In the next part of the study, the attempts to obtain VP3 recombinant protein in *E. coli* expression system was prepared. The huge advantage of *E. coli* over other expression systems as well as high immunogenicity of the chosen protein were taken into account. Initially, the gene encoding the whole VP3 protein (60 kDa) was used. However, because of its low expression level, other two epitopes of GPV VP3 with much lower molecular weight than previously used fragment was selected. Finally, both of the selected antigenic determinants with a mass of 21 kDa and 32.3 kDa, respectively were characterized by high expression level in *E. coli* Rosetta (DE3)pLacI cells. These proteins were purified by the nickel-affinity chromatography and were used for further studies.

The aim of the following stage of the study was to develop an ELISA test using previously obtained recombinant protein. Both proteins exhibited immunoreactivity in the presence of goose sera in Western blot technique. In total 166 of goose sera samples, which were previously examined by serum neutralization assay (SN) were applied. Parameters such as: concentration of VP3ep4 and VP3ep6 antigens, serum dilution, conjugate dilution (conjugated anti-geese IgG with horseradish peroxidase), and the optical density (OD) for positive and negative samples were optimized. The most significant difference in OD value for positive and negative sera were observed using VP3ep4 antigen. The observed difference was almost nine-times higher (OD_{min} 0.113, OD_{max} 0.914), than in case of VP3ep6. Therefore, for further studies VP3ep4 protein of higher molecular weight (32.3 kDa) was used.

After optimisation, the developed ELISA was compared to other serological tests. The obtained compliance of ELISA and SN assay reached 91.5%, the sensitivity - 90.4%, and specificity - 93%, respectively. However, the comparison of newly developed ELISA with the ELISA based on the whole virion of GPV as the antigen, showed very high sensitivity of 97.8% and a specificity of 94%. The developed diagnostic test is characterized by the reproducibility and repeatability, that reached ($V < 10\%$). The lack of the reaction between sera with antibodies against AIV and NDV also confirmed its specificity.

In conclusion, the obtained results shows that the developed LAMP as well as ELISA techniques can be applied in diagnostics of DD.