

Streszczenie pracy w języku polskim

Wstęp. Zakażenia szczepami *Erysipelothrix rhusiopathiae* od wielu lat stanowią problem w hodowli drobiu wodnego w Polsce. Choroba wywoływana przez te bakterie, zwana różycą, występuje głównie w stadach gęsi, rzadziej u kaczek. Infekcja ma postać posocznicy ze zmianami naczyniowymi i narządowymi (Bobrek i wsp. 2016). Schorzenie jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych wynikających z upadków i leczenia ptaków, a w przypadku stad reprodukcyjnych także ze spadku nieśności. Z obserwacji własnych wynika, że różycą najczęściej dotyka ptaki odchowane, a patogen jest trudny do wyeliminowania w stadzie. Antybiotykoterapia zazwyczaj przynosi oczekiwane efekty, jednakże po zaprzestaniu podawania leku często odnotowuje się nawroty choroby. Aktualnie w Polsce nie jest dopuszczona do obrotu żadna komercyjna szczepionka przeciwko różycy dla drobiu. Stąd, niektórzy lekarze weterynarii podejmują próby ochrony stada przez zastosowanie szczepionek zarejestrowanych dla trzody chlewnej. Z doniesień z terenu wynika jednak, że działania te nie zawsze przynoszą efekt w postaci immunizacji chroniącej przed zakażeniem.

Bakterie *E. rhusiopathiae* to Gram-dodatnie pałeczki o wysokich wymaganiach wzrostowych. Wywołują zakażenia u ssaków, w tym u człowieka, ptaków i ryb, a za ich główny rezerwuar uznaje się trzodę chlewną. Pozycje literaturowe dotyczące różycy świń są aktualnie głównym źródłem wiedzy na temat serotypów, lekowrażliwości i czynników wirulencji szczepów *E. rhusiopathiae*. U tego gatunku bakterii wyróżnia się 17 serotypów, a szczepy zakażające świnię z reguły przynależą do serotypu 1a, 1b oraz 2. Wśród czynników zjadliwości *E. rhusiopathiae* wymienia się białka ułatwiające inwazję włoskowca różycy do tkanek gospodarza oraz czynniki determinujące oporność bakterii na fagocytozę i dopełniacz. Jednym z najlepiej poznanych czynników wirulencji jest powierzchniowe białko Spa, przeciwko któremu w organizmie gospodarza generowana jest odpowiedź immunologiczna. Występowanie różycy u drobiu wodnego zostało dotychczas opisane jedynie w kilku pracach kazuistycznych (Bobrek i wsp. 2016, Bobrek i Gawel. 2015, Janowska i wsp. 1978).

Głównym **celem pracy** była charakterystyka serotypowa i określenie lekowrażliwości, genotypowych profili oporności i wirulencji oraz wariantów antygenowego białka SpaA szczepów *E. rhusiopathiae* wyizolowanych z klinicznych przypadków różycy u gęsi i kaczek hodowanych w Polsce. Praca zakłada także ocenę zmian sekcyjnych i określenie rozkładu notowanych przypadków różycy w poszczególnych grupach wiekowych ptaków oraz przedziałach roku kalendarzowego.

Materiał i metody. Materiałem wyjściowym do badań były padłe sztuki gęsi i kaczek dostarczone do Laboratorium Weterynaryjnego Vet-Lab Brudzew dr Piotr Kwieciński w celach diagnostycznych w okresie od 01.2019 do 12.2021. Na podstawie zgromadzonych danych klinicznych określono rozkład przypadków różycy w grupach wiekowych ptaków oraz okresach roku kalendarzowego. W badaniu anatomopatologicznym u padłych ptaków oceniano zmiany w narządach wewnętrznych, skórze, tkance podskórnej i stawach. Szczepy *E. rhusiopathiae* wyizolowane z tkanek martwych ptaków identyfikowano za pomocą testów real-time PCR, spektrometrii mas typu MALDI-TOF oraz kart z panelem biochemicznym VITEK® 2 GP. Lekowrażliwość izolatów *E. rhusiopathiae* (n=60) określono za pomocą metody mikrorozcieńczeń w bulionie, a genotypowe profile oporności i wirulencji oraz serotyp - przy wykorzystaniu techniki PCR. Gen *spaA* kodujący immunogenne białko SpaA został zsekwencjonowany, a sekwencja DNA przetłumaczona na sekwencję białkową. Na podstawie analizy uzyskanych sekwencji białkowych określono warianty SpaA występujące u izolatów terenowych oraz homologię pomiędzy badanymi izolatami a szczepem szczepionkowym *E. rhusiopathiae* R32E11. Ostatni etap badań stanowiło genotypowanie szczepów włoskowca różycy przy użyciu metod rep-PCR oraz RAPD.

Wyniki. Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano szereg istotnych wyników. Najważniejsze z nich wymieniono w punktach poniżej.

- Rozkład przypadków różycy w poszczególnych grupach wiekowych gęsi i okresach roku kalendarzowego istotnie różnił się od zakładanego rozkładu równomiernego; największą liczbę przypadków odnotowano w sierpniu i we wrześniu w grupie wiekowej między 11 a 13 tygodniem życia.
- W badaniu sekcyjnym u ptaków zakażonych włoskowcem różycy odnotowano zmiany anatomopatologiczne charakterystyczne dla zakażenia uogólnionego, z zajęciem wielu narządów.
- Wszystkie badane izolaty zostały przyporządkowane do gatunku *E. rhusiopathiae*; w trzech zastosowanych metodach identyfikacji (ww.) uzyskano pełną zgodność wyników. W przypadku metody z użyciem kart VITEK® 2 GP odnotowano ograniczoną powtarzalność w zakresie procentowej wartości prawdopodobieństwa poprawnej identyfikacji jak i czasu analizy.
- Badane izolaty *E. rhusiopathiae* (n=60) przynależały do siedmiu serotypów, wśród których dominował serotyp 5 (38,3%), 1b (28,3%) i 8 (15%)
- Wszystkie izolaty *E. rhusiopathiae* odznaczały się wrażliwością na antybiotyki β -laktamowe i florfenikol. Ogromna większość izolatów wykazywała oporność na

tetracyklinę (85%) oraz enrofloksacynę (80%). Odsetek szczepów opornych na pozostałe substancje przeciwdrobnoustrojowe wahała się od 3,3% do 16,7%. Dziesięć szczepów (16,7%) uznano za wielolekooporne.

- Genotypowe profile lekooporności badanych szczepów *E. rhusiopathiae* (n=60) korespondowały z ich opornością fenotypową. U wszystkich szczepów opornych na tetracyklinę wykryto gen *tetM*. Gen *lmuB* występował u 10 z 11 szczepów opornych na linkozamidy, a gen *lsaE* - u wszystkich izolatów opornych na tiamulinę. U jednego szczepu opornego na makrolidy i linkozamidy wykryto gen *ermB*. U czterech izolatów z wysokimi wartościami MIC streptomycyny i spektynomycyny wykryto gen *ant(6)-Ia*. U szczepów opornych na enrofloksacynę występowała mutacja w genie *gyrA*.
- Izolaty *E. rhusiopathiae* były bardzo słabo zróżnicowane pod względem genotypowych profili wirulencji. U 59 szczepów wykryto gen *spaA* kodujący immunogenne białko powierzchniowe SpaA, a tylko jeden izolat zawierał gen *spaB*. Od 98,3 do 100% szczepów posiadało geny *nanH.1* i *nanH.2* kodujące neuraminidazę oraz inne geny, których produkty mogą ułatwiać inwazję włoskowca różycy do tkanek gospodarza, tj. *sub*, *hlyA*, *fbpA*, ERH_1356, *intI*, *hlyIII*, *rspA*, *rspB* lub determinować oporność komórek bakterii na fagocytozę i działanie układu dopełniacza – *cpsA* i *algI*.
- Na podstawie wykrytych mutacji niesynonimicznych w sekwencji genów *spaA* u badanych izolatów wyróżniono 9 wariantów białka SpaA. Sekwencja domeny immunoprotekcyjnej (antygenowej) SpaA wszystkich szczepów terenowych różniła się od sekwencji szczepu szczepionkowego R32E11, a w przypadku ogromnej większości izolatów (91,5%) różnica dotyczyła aż 7, 8 lub 9 aminokwasów
- Metoda genotypowania rep-PCR wykazała, że zastosowanie startera (GTG)₅ umożliwia dyskryminację szczepów *E. rhusiopathiae* *spaA*-pozytywnych i *spaB*-pozytywnych, jednak nie pozwala na różnicowanie w obrębie izolatów *spaA*-pozytywnych. W przypadku RAPD najlepsze wyniki różnicowania wewnątrzgatunkowego uzyskano przy zastosowaniu startera M13.

Wnioski. Uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej wyniki dotyczące charakterystyki szczepów *E. rhusiopathiae* oraz występowania różycy u drobiu wodnego i zmian sekcyjnych dostarczają nowych cennych informacji i wzbogacają wiedzę z zakresu chorób drobiu, mikrobiologii weterynaryjnej i epidemiologii, a także mają istotne znaczenie w praktyce weterynaryjnej, zarówno w diagnostyce jak i leczeniu różycy. Dane na temat czynnika etiologicznego mogą być wykorzystane do opracowania skutecznych strategii kontroli zakażeń u drobiu wodnego.