



lek. wet. Kamila Natalia Dziadek

Rozprawa doktorska
z dziedziny nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria

Zmienność genetyczna wirusa grypy ptaków u różnych gatunków drobiu

**Within-host genetic diversity of avian influenza virus
in different poultry species**

Promotor:

dr hab. Krzysztof Śmietanka, profesor instytutu

Zakład Wirusologii i Chorób Wirusowych Zwierząt

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Promotor pomocniczy:

dr Edyta Świętoń

Dział Naukowego Wsparcia Potencjału Badawczego

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

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 przełamывania 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 hemagglutyniny (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 przełamывania 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 kładu 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 10^6 EID₅₀ 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 drogi 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.

Summary

Avian influenza (AI) is one of the most important diseases of poultry and wild birds, listed by the World Organisation for Animal Health (WOAH). AI outbreaks cause enormous economic losses to the poultry sector and related industries, and moreover, they represent a growing threat to public health.

The aetiological agent of AI is the avian influenza virus (AIV) type A – *Alphainfluenzavirus* from the Orthomyxoviridae family – characterized by high genetic variability. As an RNA virus with a segmented genome, AIV is constantly subjected to two basic mechanisms of its variability: genetic drift and reassortment. Both mechanisms drive the continuous evolution of the virus, which may lead to the acquisition of new adaptive traits and even the crossing of interspecies barriers.

Two forms of AIV are distinguished: low pathogenic (LPAIV) and highly pathogenic (HPAIV). The classification is based on the virus's ability to cause disease in an *in vivo* model – in chickens. Transformation of LPAIV into the HPAIV form may occur as a result of spontaneous mutation at the haemagglutinin cleavage site (HACS). This can happen, for example, when LPAIV is introduced into poultry following contact between a flock and the natural hosts and reservoirs of AIV in the environment – birds of the orders Anseriformes and Charadriiformes.

Studying AIV variability, both in the field and experimentally, improves our understanding of transmission dynamics and provides early warning of high-risk variants.

The objective of the first research task in this doctoral dissertation was to evaluate the genetic diversity of LPAIVs (n = 9) and HPAIVs (n = 43) detected in Poland between 2018 and 2022, to elucidate the mechanisms underlying their genetic variability, and to identify potential genetic markers influencing the biological properties of AIV.

Phylogenetic analysis confirmed that Polish HPAIVs belong to clade 2.3.4.4b of the H5 Goose/Guangdong lineage, with the majority of them also showing close genetic relatedness to viruses circulating in Europe at that time. During the 2020/2021 HPAI season in Poland, H5N8 HPAIV was identified as the dominant subtype, whereas in the following year, only H5N1 HPAI genotypes (G1–G7) were detected. One of these, the H5N1-G7 reassortant, represented an independent introduction from outside Europe. Furthermore, no phylogenetic relationship was found between viruses of different pathogenicity levels (HP/LP), which excludes the role of LPAIVs detected in Poland between 2020 and 2022 as gene donors for HPAIVs. However, phylogenetic analysis revealed considerable genetic diversity among H5N8 HPAIVs associated with mass die-offs of swans in the Gulf of Gdańsk in 2021, suggesting the simultaneous

introduction of at least five distinct viruses into this region. These findings indicate that the genetic diversity of HPAIVs in the period of 2020–2022 resulted from the interplay of multiple mechanisms, i.e., genetic drift, reassortment, and independent introductions, including some originating from geographically distant regions of the world.

Further molecular characterisation of LPAI and HPAI virus sequences revealed the presence of diverse genetic markers affecting viral adaptive traits (e.g., pathogenicity, receptor binding, immune response). This may suggest a gradual increase in the zoonotic potential of circulating viruses.

As part of the second research task of this dissertation, an attempt was made to determine changes in viral population diversity and complexity during the course of an experimental infection in different poultry species (chickens, quails, turkeys, and ducks). Birds were inoculated with an H7N7 LPAIV isolate originating from a mallard, which showed no signs of adaptation to poultry (herein referred to as “wild bird-origin” virus). On the 2nd, 4th, and 7th day post-infection (dpi), oropharyngeal and cloacal swabs were collected from the birds and subsequently used to assess the level of AIV shedding from both sites of virus replication. The collected swabs were then subjected to high-throughput sequencing (HTS) on the Illumina platform, followed by extended variant analysis. To assess the genetic diversity, viral populations derived from each swab were characterized based on selected parameters (e.g., number of variants, Shannon entropy). Particular attention during the analysis was given to the selection of variants with potential adaptive properties that have been previously described in the literature.

Experimental studies confirmed that at a dose of 10^6 EID₅₀, the inoculation virus – the wild bird-origin H7N7 LPAIV – can effectively infect selected poultry species, with infections typically being transient and asymptomatic. It was demonstrated that the virus tropism depends on the host order: in gallinaceous poultry, replication predominates in the respiratory tract, whereas in waterfowl, it occurs mainly in the intestinal tract, which reflects distinct transmission routes of AIV in these groups.

A detailed analysis of viral populations from both systems revealed that replication of the wild bird-origin H7N7 LPAIV leads to the emergence of populations dominated by minority variants (<10%), representing an early stage of virus adaptation to a new host. It was further confirmed that variants potentially modulating the biological properties of the virus may arise during poultry infection; however, they are not fixed in the consensus sequence. Nevertheless, one

such variant – MP-G950A [M2: D88N] – is a candidate for further *in vitro* functional testing due to its occurrence across all examined poultry species.

The conducted study did not confirm persistent interspecies differences in the cumulative number or frequency of individual variants. However, ducks were the only poultry species that exhibited higher genetic diversity of AIV in the trachea than in the cloaca, which may result from a distinct selective environment in the respiratory tract compared to the gastrointestinal tract. Nevertheless, interpretation of these findings should take into account the strong negative correlation between Shannon entropy and viral shedding, which may underestimate diversity in the gastrointestinal system.

The results obtained in this doctoral dissertation suggest that strengthening AIV surveillance in wild bird populations is necessary, encompassing not only the detection but also the genomic analysis of both HPAIV and LPAIV. Particular emphasis should be placed on the identification and monitoring of genetic markers with potential functional significance. Since the mechanisms of AIV adaptation remain largely unknown, further research on the evolution of AI viruses appears justified. Nevertheless, host immunological factors must also be taken into consideration.

Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Praca oryginalna

Dziadek, K., Świętoń, E., Kozak, E., Wyrostek, K., Tarasiuk, K., Styś-Fijoł, N., & Śmietanka, K. (2024). Phylogenetic and Molecular Characteristics of Wild Bird-Origin Avian Influenza Viruses Circulating in Poland in 2018-2022: Reassortment, Multiple Introductions, and Wild Bird-Poultry Epidemiological Links. *Transboundary and emerging diseases*, 2024, 6661672.

Wskaźniki czasopisma w roku 2024:

Punkty MEiN: **200 punktów**, IF: **3,0** (zgodnie z bazą JCR Clarivate)