

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ

Monika Chmielewska-Władyka

**ZAKAŻENIA BAKTERYJNE I WIRUSOWE W STADACH
GĘSI TOWAROWYCH. BADANIA WYBRANYCH STAD
W 2-LETNIM CYKLU OBSERWACJI**

Rozprawa doktorska

wykonana w Katedrze Epizootiologii
z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Promotor: Prof. dr hab. dr *h.c.* Alina Wieliczko

Wrocław 2022

Pragnę złożyć serdeczne podziękowanie mojej Pani Promotor – Pani Profesor Alinie Wieliczko, za ogromny wkład pracy, zaangażowanie i nieocenione wsparcie merytoryczne na wszystkich etapach powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Składam również podziękowania dla wszystkich pracowników Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz zespołowi Laboratorium Weterynaryjnego Agro-Vet, za wszelką pomoc i poświęcony czas.

Autorka

Spis treści

1. Wstęp	7
1.1 Rynek drobiu w Polsce.....	7
1.2 Zakażenia bakteryjne i grzybicze w stadach gęsi	9
1.2.1 Zakażenia wywołane bakteriami <i>E. coli</i>	10
1.2.2 Zakażenia pałeczkami <i>Salmonella</i>	14
1.2.3 Zakażenia włoskowcem różycy- <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	17
1.2.3 Zakażenia pałeczkami <i>Pasteurella multocida</i>	19
1.2.4 Zakażenia grzybicze drobiu wodnego - aspergiloza.....	21
1.3 Zakażenia wirusowe w stadach gęsi	23
1.3.1 Zakażenia parwowirusem gęsi (GPV- Goose Parvovirus Infection)	23
1.3.2 Zakażenia polyomawirusem gęsi (GHPV - Goose Hemorrhagic Polyomavirus Infection)	27
1.3.3 Zakażenia cirkowirusem gęsi (GoCV - Goose Circovirus Infections).....	28
2. Cel pracy	31
3. Materiał i metody.....	32
3.1. Badania w kierunku zakażeń bakteryjnych i grzybiczych	34
3.1.1 Badania bakteriologiczne	34
3.1.2. Badania mikologiczne	35
3.1.3 Charakterystyka wyizolowanych szczepów <i>E. coli</i>	36
3.1.3.1 Określenie wrażliwości szczepów <i>E. coli</i> na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki.....	36
3.1.3.1.1 Wykonanie oznaczenia wartości MIC wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków	36
3.1.3.1.2 Odczyt i interpretacja wyników oznaczania wartości MIC wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków	37
3.1.3.1.3 Określenie wartości MIC dla kolistyny z użyciem testu mikrorozcieńczeń MIC stripy/ stripped plates	38
3.1.3.2 Ocena prewalencji wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki.....	40
3.1.3.2.1 Procedura izolacji DNA bakterii Gram ujemnych przez gotowanie. 43	
3.1.3.2.2 Reakcje simplex PCR – geny oporności na betalaktamy, fluorochinolony amfenikole tetracykliny oraz sulfonamidy	43
3.1.3.2.3 Reakcje multipleks-PCR- geny oporności na kolistynę.....	44
3.1.3.2.4 Elektroforeza w żelu agarozowym.....	45
3.1.3.3 Prewalencja wybranych genów zjadliwości	45

3.1.3.4 Ocena zdolności tworzenia biofilmu przez <i>E. coli</i>	47
3.1.3.4.1 Przygotowanie hodowli szczepów <i>E. coli</i>	47
3.1.3.4.2 Płukanie płytek i barwienie biofilmu	47
3.1.3.4.3 Pomiar i odczyt OD.....	47
3.1.3.4.4 Zdolność tworzenia biofilmu	48
3.1.4 Typizacja wyizolowanych bakterii z rodzaju <i>Salmonella</i> , <i>Erysipelothrix</i> oraz <i>Gallibacterium</i>	48
3.1.4.1 Elektroforeza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR.....	51
3.2 Określenie poziomu specyficznych przeciwciał anty-GPV	51
3.2.1 Odczyt i interpretacja wyników.....	52
3.3 Badania w kierunku zakażeń wirusowych	52
3.3.1 Izolacja materiału genetycznego	52
3.3.2 Procedura wykrywania materiału genetycznego parwowirusa gęsi.....	52
3.3.3 Procedura wykrywania materiału genetycznego polyomawirusa gęsi.....	53
3.3.4 Procedura wykrywania materiału genetycznego cirkowirusa gęsi.....	54
3.3.5 Elektroforeza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR.....	55
3.3.5.1. Przygotowanie 2% żeli agarozowych	55
3.3.5.2 Przeprowadzanie elektroforezy agarozowej produktów reakcji PCR..	56
3.3.6 Przygotowanie produktów do sekwencjonowania	56
3.3.7 Sekwencjonowanie - opracowanie wyników	59
4. Wyniki	60
4.1 Wyniki badań w kierunku zakażeń bakteryjnych i grzybiczych.....	60
4.2 Wyniki badań w kierunku zakażeń bakteryjnych	60
4.3 Wyniki badań w kierunku zakażeń grzybiczych.....	65
4.4 Określenie wartości MIC dla szczepów <i>E. coli</i>	65
4.4.1 Odczyt i interpretacja wyników oznaczenia granicznych wartości MIC wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków dla izolatów <i>E. coli</i> otrzymanych w 2019 roku	66
4.4.2 Odczyt i interpretacja wyników oznaczenia granicznych wartości MIC wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków dla izolatów <i>E. coli</i> otrzymanych w 2020 roku	68
4.5 Ocena prewalencji wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki	76
4.6 Ocena prewalencji wybranych genów zjadliwości	82
4.7 Ocena produkcji biofilmu przez szczepy <i>E. coli</i>	86
4.8 Wyniki badań serologicznych	90
4.9 Wyniki badań w kierunku zakażeń wirusowych.....	93

4.9.1 Wyniki analizy filogenetycznej w oparciu o uzyskane sekwencje GPV	99
4.9.2 Wyniki analizy filogenetycznej w oparciu o uzyskane sekwencje GoCV ...	101
5. Omówienie wyników i dyskusja.....	108
6. Wnioski.....	130
7. Streszczenie pracy.....	132
8. Abstract.....	134
9. Piśmiennictwo.....	136
10. Spis tabel.....	150
11. Spis rycin	151

Wykaz skrótów

- aEPEC** ang. Atypical EPEC, atypowe enteropatogenne szczepy *E. coli*
- AGID** ang. Agar Gel Immunodiffuson Assay, immunodyfuzja w żelu agarozowym
- AMR** ang. Anti Microbial Resistance, oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe
- APEC** ang. avian pathogenic *Escherichia coli*
- ARGs** ang. Antibiotic Resistance Genes, geny oporności na antybiotyki
- BADS** ang. Beak Atrophy and Dwarfism Syndrome, syndrom karłowatości i skróconego dzioba
- BFD** ang. Budgerigar Fledgling Disease, francuskie pierzenie papużek falistych
- CE** ang. Competitive Exclusion, wykluczanie kompetencyjne
- CIAs** ang. Critically Important Antimicrobials, istotnie ważne związki przeciwdrobnoustrojowe
- CLSI** ang. Clinical Laboratory Standards Institute, Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych
- EMA** ang. European Medicines Agency, Europejska Agencja Leków
- EPS** ang. Extracellular Polymeric Substances, zewnątrzkomórkowa matryca o charakterze polimeru
- EUCAST** ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości
- EWV** - Europejski wskaźnik wydajności
- ExPEC** ang. Extraintestinal Pathogenic *E. coli*, pozajelitowe patogenne szczepy *E. coli*
- FAO/WHO** ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations
- GBF** ang. Goose Broken Feather Disease, choroba złamanego pióra gęsi
- GEF** ang. Goose Embryo Fibroblasts, fibroblasty zarodków gęsich
- GFL** ang. Gosling Feather Loss Disease, choroba utraty upierzenia u gąsiąt
- GHPV** ang. Goose Hemorrhagic Polyomavirus, wirus krwotocznego zapalenia jelit i nerek u gęsi
- GoAstV** ang. Goose Astrovirus, astrowirus gęsi
- GoCV** ang. Goose Circovirus, cirkowirus gęsi
- GPV** ang. Goose Parvovirus, parwowirus gęsi

HACCP ang. Hazard Analysis Critical Control Point, analiza zagrożeń i krytyczne punkty kontroli

HNEG ang. Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese, krwotoczne zapalenie jelit i nerek u gęsi

HPAI ang. Highly Pathogenic Avian Influenza, wysoce zjadliwa grypa ptaków

ICTV ang. International Committee on Taxonomy of Viruses, Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów

KOWR - Krajowy Ośrodek Wsparcia Rolnictwa

MDA ang. Maternally Derived Antibody, przeciwciała matczyne

MDPV ang. Moscow Duck Parvovirus, parwovirus kaczki piżmowej

MDR ang. multi drug resistance, wielolekooporność

mg/PCU ang. milligrams of active substance sold per population correction unit, mg/1 kg masy ciała zwierzęcia poddanego leczeniu

MIC ang. Minimal Inhibitory Concentration, minimalne stężenie hamujące

nGPV ang. Novel Goose Parvovirus, nowy parwovirus gęsi

NGVE ang. New Gosling Viral Enteritis, nowe wirusowe zapalenie jelit gęsi

ORFs ang. Open Reading Frames, otwarta ramka odczytu

PBFDV ang. Psittacine Beak and Feather Disease Virus, wirus choroby dzioba i piór papug

PMQR ang. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance, mechanizmy oporności na chinolony kodowane plazmidowo

rMDPV ang. Recombinant MDPV, rekombinowany MDPV

SBDS ang. Short Beak and Dwarfism Syndrome, syndrom karłowatości i skróconego dzioba

SN ang. Serum Neutralization Test, test seroneutralizacji

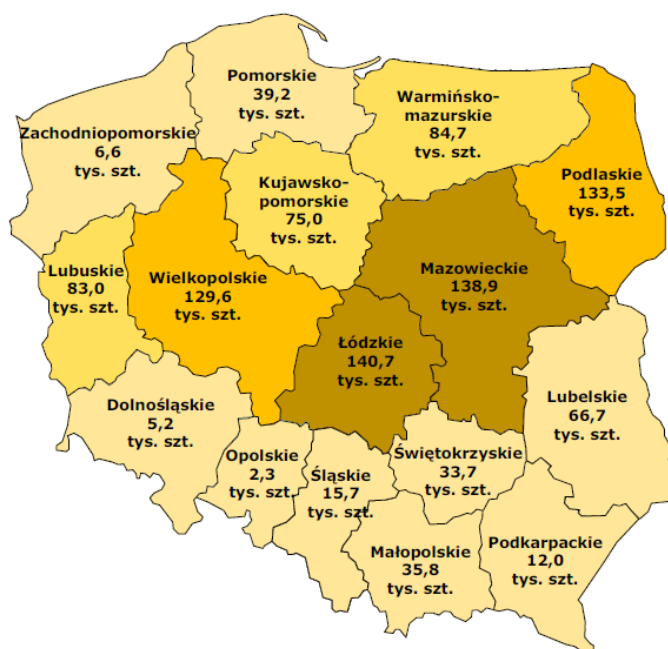
VAGs ang. virulence-associated genes, geny zjadliwości

ZWD - Zakład Wylęgu Drobiu

1. Wstęp

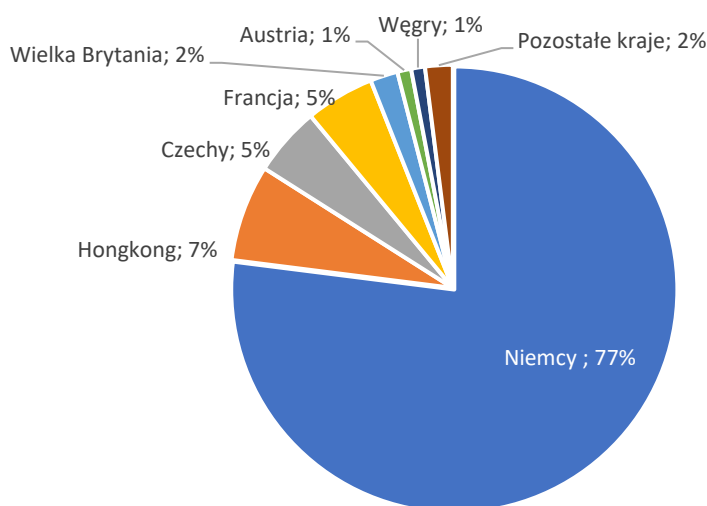
1.1 Rynek drobiu w Polsce

Stale rosnące pogłowie drobiu wodnego w Polsce sprawia że staliśmy się liderami w produkcji gęsiny na rynku Europejskim. Produujemy około 1 mln sztuk (<https://stat.gov.pl>) gęsi co daje około 31 tys. ton mięsa rocznie. Podobnie jak Węgry, należymy do największych producentów gęsiny w Europie, zajmując trzecie miejsce, zaraz po Chinach i Egipcie, pod względem wielkości produkcji na świecie (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT, 2021). W krajowej produkcji gęsi dominuje rasa włoska, która uzyskała nazwę handlową gęsi Białej Kołudzkiej i stanowi 95% gęsi w kraju, pozostałe 5% to ptaki rodzimych stad rodzicielskich objęte programem ochrony zasobów genetycznych. Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi w 2012 roku podjął decyzję o uznaniu gęsi Białej Kołudzkiej® jako odrębnej, rodzimej rasy gęsi, powierzając Krajowej Radzie Drobiarstwa – Izbie Gospodarczej w Warszawie prowadzenie ksiąg hodowlanych dla jej dwóch rodów W-11 (nieśny) i W-33 (mięsny). W 2020 r. w ujęciu regionalnym produkcja gęsi skoncentrowana była przede wszystkim w województwie łódzkim (140,7 tys. szt.), mazowieckim (138,9 tys. szt.) oraz podlaskim (133,5 tys. szt.) i wielkopolskim (129,6 tys. szt.). Łączny udział tych czterech regionów w krajowym pogłowie gęsi wynosił 54% (KOWR opracowanie Biura Analiz i Strategii KOWR na podstawie danych GUS, 2021).



Rycina 1. Pogłowie gęsi w Polsce w 2020 r. z podziałem na województwa. Źródło: opracowanie Biura Analiz i Strategii KOWR na podstawie danych GUS

Rosnące zainteresowanie konsumentów mięsem gęsim wynika nie tylko z jego walorów zdrowotnych, smakowych czy dietetycznych, ale także z licznych kampanii reklamowych („Gęsina na Świętego Marcina”, „Kupuj Polskie”) wspierających lokalny rynek. Gęsina eksportowana jest głównie do krajów Europejskich, głównie do Niemiec, gdzie w 2020 roku sprzedano 12,8 tys. ton polskiej gęsiny o wartości 39 mln EUR, co stanowi ponad 77% przychodów eksportu tego asortymentu. Polska gęsina trafia także do Hongkongu (1,3 tys. ton, 3,3 mln EUR), Francji (1,6 tys. ton, 2,6 mln EUR) i Czech (blisko 1 tys. ton, 2,7 mln EUR) (Opracowanie Biura Analiz i Strategii KOWR (Krajowy Ośrodek Wsparcia Rolnictwa) na podstawie danych GUS, 2021).



Rycina 2. Kierunki eksportu mięsa gęsiego z Polski w 2020 r. Źródło: opracowanie Biura Analiz i Strategii KOWR na podstawie danych Ministerstwa Finansów

Gęsi hodowane są przez około 112 dni (16-17 tygodni tuczu) aż do osiągnięcia średniej wagi w granicach 6,2-6,6 kg, pod warunkiem przestrzegania zaleceń żywieniowych związanych z ograniczeniem paszy treściwej i jej wartości pokarmowej. Bez ograniczeń należy stosować zielonkę ciętą lub swobodny wypas na pastwisku o bioróżnorodności runi. W końcowym okresie chowu tj. 3 tygodnie przed planowanym ubojem gęsi żywione są *ad libitum* całym ziarnem owsa, którego spożywają od 10-12 kg na 1 sztukę (Bielińska i wsp., 2015). Technologia chowu gęsi różni się zatem znacznie jeśli porównamy ją z technologią chowu drobiu grzebiącego, który w konwencjonalnej produkcji nie korzysta z wybiegów. Koszt wyprodukowania 1kg mięsa gęsiego waha się w granicach 60-70 zł w zależności od sposobu żywienia, który stanowi ponad 80% nakładów. Gęsina charakteryzuje się korzystną proporcją nienasyconych kwasów

tłuszczowych omega-3 i omega-6 oraz zawartością witamin z grupy B, witamin A i E. Jeszcze kilka lat temu statystyczny Polak zjadał zaledwie 17 gramów gęsiny, a obecnie to już ponad 300 gramów, czyli prawie 20-krotnie więcej (Buzala i wsp., 2014).

Polska notuje stały przyrost wielkości produkcji drobiu wodnego, w 2018 r. wyprodukowano 49,5 tys. ton żywca, w 2019 r. 51,8 tys. ton żywca, jednakże koniunktura zmieniała się na przestrzeni lat. Niemalże znaczenie miało podpisanie ustawy o ochronie zdrowia zwierząt z dnia 21 sierpnia 1997 r. zakazującej w zupełności hodowli gęsi na stłuszczone wątroby (foie gras), w związku z czym doszło do znacznego zmniejszenia pogłowia drobiu wodnego. Sytuacja odmieniła się dopiero po wejściu Polski do Unii Europejskiej, co przyczyniło się do stopniowego zwiększania produkcji z 10 tys. ton w 2003 roku do 18,4 ton w latach 2004-2011 (Gornowicz i Lewko, 2016). W tym okresie udział gęsiny w sektorze drobiarskim krajowego rynku był jednak niewielki i oscylował w granicach 1%, co dawało mimo wszystko 4 miejsce na świecie po Chinach, Egipcie i Węgrzech w produkcji gęsi (Utnik-Banaś i Żmija, 2018).

Według raportu „World Waterfowl Industry Development Conference, 2020” w 2019 r. sprzedano łącznie 6,44 mld kaczek i 720 mln gęsi jako ptactwo wodne służące do produkcji żywności (Zhang i wsp., 2021). W związku z tym, intensyfikacja produkcji gęsi oraz ogólnosiwiatowy handel materiałem hodowlanym nieustannie prowadzą do wzrostu zagrożenia epidemiologicznego i w konsekwencji wybuchu chorób zakaźnych. Wraz ze wzrostem pogłowia drobiu wodnego w Polsce, nie były podejmowane kompleksowe badania monitoringowe dotyczące oceny statusu zdrowotnego stad tuczowych gęsi. Notowane w ostatnich latach okresowe niedobory szczepionki stosowanej w immunoprofilaktyce choroby Derzsy’ego u gęsi oraz przypadki wysoce zjadliwej grypy ptaków (HPAI – Highly Pathogenic Avian Influenza) poważnie wpłynęły na status zdrowotny gęsi, a także zdziesiątkowały liczebność stad reprodukcyjnych i tuczowych gęsi.

1.2 Zakażenia bakteryjne i grzybicze w stadach gęsi

Wśród infekcji bakteryjnych gęsi tuczowych dominują zakażenia pałeczkami *E. coli*, które często wikłają inne jednostki chorobowe, zwłaszcza wirusowe. Zakażenia włoskowcem różycy (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) (Opriessnig i wsp., 2020) oraz *Pasteurella* spp. (Varga i wsp., 2013) stanowią problem endemiczny i często powtarzają się w kolejnych wstawieniach na danej fermie. Ponadto, sezonowe utrzymywanie w tych

samych obiektach inwentarskich kaczek, sprzyja notowanym ostatnio zakażeniom wywołanym przez *Gallibacterium anatis* (Persson i Bojesen, 2015, Karwańska i wsp. 2021). Odrębny problem stanowią zakażenia pałeczkami *Salmonella* (Wang i wsp., 2020), związane z bezobjawowym nosicielstwem i siewstwem wśród drobiu wodnego a tym samym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Wśród zakażeń grzybiczych, najczęstszą przyczyną infekcji jest kropidlak - najczęściej *Aspergillus fumigatus* będący przyczyną aspergilozy płuc u gąsiąt (Ziółkowska i wsp., 2014).

1.2.1 Zakażenia wywołane bakteriami *E. coli*

Kolibakterioza ptaków wywoływana jest przez patogenne szczepy *E. coli* (APEC-avian pathogenic *Escherichia coli*) i stanowi istotny problem w produkcji drobiarskiej na całym świecie. Termin APEC używany jest do określania szczepów *E. coli* izolowanych z przypadków kolibakteriozy u drobiu. Początkowo uważano, że serogrupy O1, O2 czy O78 odpowiadają w głównej mierze za przypadki kolibakteriozy na fermach drobiu. Obecnie wiadomo, że ponad połowa zbadanych szczepów nie należy do żadnej z tych serogrup, a część z nich jest w ogóle niesklasyfikowana. Według Jeong i wsp. (2021), spośród 180 O-serogrup, O1, O2, O8, O35 i O78 są najczęściej związane z kolibakteriozą drobiu. Nie bez znaczenia jest wpływ szczepów *E. coli* izolowanych od drobiu na ochronę zdrowia publicznego. Potencjał zoonotyczny *E. coli* i rozwój oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe sprawił, że *E. coli* stała się drobnoustrojem wskaźnikowym. W związku z łatwością przekazywania genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki przez *E. coli*, stanowi ona zagrożenie dla możliwości terapeutycznych zakażeń szczepami wielolekoopornymi (ang. multi drug resistance - MDR) (Zhang i wsp., 2021).

Coraz większy problem stanowi również oporność na kolistynę, która od wielu lat jest szeroko stosowana w medycynie weterynaryjnej do leczenia zakażeń jelitowych u świń, drobiu i bydła wywołanych przez szczepy *Enterobacteriaceae*, w tym głównie *E. coli* i *Salmonella* spp. (Liu i wsp., 2016, Ćwiek i wsp., 2021, Timmermans i wsp., 2021). Z kolei w medycynie ludzkiej definiowana jest jako „antybiotyk ostatniej szansy”, stosowany w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie Gram-ujemne, wielolekooporne. Z kolei Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization - WHO) zakwalifikowała kolistynę do krytycznie ważnych środków przeciwdrobnoustrojowych (critically important antimicrobials – CIAs), stosowanych w leczeniu ciężkich zakażeń bakteryjnych wśród ludzi. W związku z tak dużym znaczeniem

kolistyny w leczeniu, trwają nieustanne badania nad mechanizmami oporności bakterii na ten antybiotyk.

W ostatnim czasie, oporność na kolistynę wśród pałeczek *E. coli* izolowanych od zwierząt rzeźnych, była wielokrotnie raportowana na świecie (Hussein i wsp., 2021). Często jest ona kodowana na chromosomie lub przez geny *mcr* zlokalizowane na ruchomych elementach genetycznych w plazmidowym DNA. Opisano już 10 różnych wariantów genów *mcr*, z czego *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* zostały pierwotnie opisane tylko w rodzinie *Enterobacteriaceae*. Aktualnie ich obecność potwierdzono także na chromosomach innych bakterii m.in. *Moraxella spp.* czy *Aeromonas veroni*. Ponadto, liczne badania potwierdzające obecność genów *mcr* na plazmidach wśród bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, świadczą o szerokim ich rozpowszechnieniu, zarówno wśród ludzi, zwierząt jak i środowisku czy żywności (Ćwiek i wsp., 2021).

Dzięki adhezynom, inwazyjom, systemowi pozyskiwania żelaza, protektynom i toksynom *E. coli* ma możliwość unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, wnikania do jego komórek, kolonizacji i proliferacji, przez co bakteria szybko szerzy się w stadzie (Dziva i Stevens, 2008). Adhezyny określane są jako przydatki lub składniki powierzchni błony komórkowej bakterii, ułatwiające przyleganie do komórek gospodarza. Adherencja jest niezbędnym etapem kolonizacji i patogenezы bakteryjnej, której celem jest zakażenie i kolonizacja kolejnych komórek żywiciela. Proces ten jest możliwy głównie dzięki posiadaniu przez bakterie *E. coli* fimbrii np.: typu 1, typu P oraz typu S. Za kodowanie występowania fimbrii typu P odpowiada między innymi gen *papC* (P-fimbriae). Inwazyje z kolei odgrywają istotną rolę podczas wnikania do komórki gospodarza na początku infekcji, a także czynią niewrażliwe APEC na stres oksydacyjny wywołany przez makrofagi gospodarza czy też odpowiadają za produkcję biofilmu. Równie istotną funkcję pełni system pozyskiwania żelaza, mikroelementu niezbędnego APEC do wzrostu i proliferacji wewnątrz komórek gospodarza. Genem kodującym system pobierania i transportu żelaza jest m.in. *iucD* (aerobactin) czy *irp2* (iron repressible protein), zaś termowrażliwą hemaglutyninę koduje gen *tsh* (temperature-sensitive haemagglutinin). Kolejnym czynnikiem wirulencji są protektyny które pełnią funkcję ochronną przed fagocytarnym działaniem komórek układu odpornościowego gospodarza, za ich wystąpienie odpowiada m.in. gen *iss* (increased serum survival). Bakterie wykazują także zdolność do produkcji biologicznie czynnych toksyn, które uszkadzając komórki gospodarza ułatwiają im inwazję. Jednym z genów kodujących

produkcję termostabilnej toksyny jest *astA* (enteroaggregative toxin). Z kolei gen *vat* (vacuolating autotransporter toxin) odpowiada za wystąpienie wakuolującej toksyny autotransportera. Istnieje wiele innych różnorodnych czynników ułatwiających patogenezę APEC, część z nich kodowana jest przez geny o nie poznanej jeszcze funkcji, jak np. geny *cva A/B*, *cvi*, *cvaC* (colicin V plasmid operon genes) (Kathayat i wsp., 2021).

Niewłaściwe stosowanie antybiotykoterapii u ludzi i zwierząt przyczyniło się do narastającego zjawiska oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. anti microbial resistance - AMR) oraz podwyższonych poziomów transferu genów warunkujących oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki (ang. antibiotic resistance genes - ARGs). Analiza genomowa izolatów APEC z krajów Europy Środkowej wykazała występowanie genów wielolekowej oporności na betalaktamy (28,1%), tetracykliny (37,5%) oraz sulfonamidy (25%) (Papouskova i wsp., 2020). Badania Zhang i wsp. (2021) wskazują jednoznacznie, że drób wodny może być bezobjawowym nosicielem szczepów MDR posiadających liczne geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe i geny zjadliwości, a co za tym idzie, może pełnić funkcję rezerwuaru tych genów w środowisku naturalnym.

Głównym czynnikiem wywołującym kolibakteriozę u drobiu są patogene szczepy APEC z podtypu ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) - wykorzystujące układ krwionośny do rozprzestrzeniania się poza przewód pokarmowy gospodarza i doprowadzające do zakażeń dróg oddechowych, posocznicy, zapalenia skóry i tkanki podskórnej (*cellulitis*) oraz zapalenia błon surowiczych. Szczepy APEC są przyczyną występowania dużych strat w przemyśle drobiarskim na skutek wysokiej zachorowalności i śmiertelności ptaków, a także obniżonych parametrów produkcyjnych, jak końcowa masa ciała, europejski wskaźnik wydajności (EWW) czy spadku nieśności i wylęgowości jaj. *E. coli* może prowadzić do infekcji ogólnoustrojowych jako pierwotny lub wtórny patogen, wnikający inne infekcje wirusowe (np. choroba Derzsy'ego czy krwotoczne zapalenie jelit i nerek gęsi) oraz bakteryjne (np. mykoplazmoza, różycza czy pastereloza) (Liu i wsp., 2018).

Szczepy APEC patogene dla ptaków wnikają do przewodu pokarmowego drogą *per os*, a do układu oddechowego drogą aerogenną, skąd poprzez uszkodzony nabłonek jelit lub tchawicy wraz z krwią dostają się do narządów wewnętrznych m.in. serca, płuc, śledziony, wątroby, nerek a także układu rozrodczego - jajnika i jajowodu. Patogen

szczerzy się głównie drogą poziomą przez skażoną wodę i paszę. Udowodniono także przenoszenie się APEC drogą pionową przez zakażone jaja (Dho-Moulin i Fairbrother, 1999, Dziva i Stevens, 2008, Guabiraba i Schouler, 2015). W zależności od statusu immunologicznego, wieku ptaków i zjadliwości szczepu dochodzi do posocznicy, po której następuje nagła śmierć lub zakażenie przechodzi w stan zapalny poszczególnych narządów lub układów. U piskląt rozwija się zapalenie pępka i woreczka żółtkowego (*omphalitis*) w wyniku niepełnego zrostu powłok brzusznych pisklęcia, następstwem tego jest otwarty kontakt ze środowiskiem inkubacji jaj. Z kolei w czasie odchowu rozwija się szereg trudnych do diagnozowania i leczenia jednostek chorobowych m.in. zapalenia stawów, ścięgien, kości (nekroza główki kości udowej z *osteomyelitis*), zapalenie skóry (*dermatitis*) i tkanki podskórnej (*cellulitis*), w którym izoluje się również *E. coli*. U niosek *E. coli* jest przyczyną odjajnikowego zapalenia otrzewnej lub zapalenia jajowodu (*salpingitis*) (Marek i wsp., 2010). Włóknikowe zapalenie błon surowiczych na tle zakażeń *E. coli* jest nierzadko przyczyną licznych upadków w przypadku gęsi tuczowych, brojlerów kurzych czy indyków.

Zwalczanie kolibakteriozy polega na zastosowaniu środków przeciwdrobnoustrojowych, aczkolwiek w świetle stale narastającej oporności na chemioterapeutyki szczepów *E. coli* i doniesień o jej potencjale zoonotycznym należy poszukiwać alternatywnych metod leczenia. Jedną z nich może być zastosowanie bakteriofagów – wirusów, które infekują i unicestwiają bakterie. Ich skuteczność została potwierdzona lecz nie przyjęła się w szerokim zastosowaniu na fermach drobiu (Kuźmińska-Bajor i wsp., 2017). Dostępne są również szczepionki żywe zawierające m.in. szczep *E. coli* z delecją genu *aroA* (Poulvac *E. coli*) oraz szczepionka podjednostkowa (Nobilis *E. coli* inac.), zawierająca antygen fimbrialny typu F-11 oraz antygen rzęskowy FT, które zarejestrowane są do uodparniania drobiu grzebiącego. W związku z brakiem komercyjnych szczepionek przeciwko kolibakteriozie dla drobiu wodnego istnieje możliwość zastosowania autoszczepionek, wytworzonych na podstawie szczepów wyizolowanych z danej fermy.

Szczególne znaczenie w produkcji drobiarskiej ma podawanie leków w wodzie, co jest związane z dużą liczbą zwierząt na fermie, wydajnością ekonomiczną, łatwością podania czy też doraźną pomocą dla osobników chorych lub zagrożonych chorobą w stadzie ptaków. Przed dotarciem do zwierząt, środki przeciwdrobnoustrojowe rozprowadzane w rurociągach wchodzą w kontakt z czynnikami biotycznymi i

abiotycznymi obecnymi w sieci wodociągowej, w tym także z biofilmem. Terminem biofilm określa się strukturę wielokomórkową, mającą zdolność przylegania do powierzchni biologicznych jak i abiotycznych, otoczoną zewnątrzkomórkową matrycą o charakterze polimeru (ang. extracellular polymeric substances - EPS) (Hahne i wsp. 2022). Bakterie osadzone w biofilmie są bardziej odporne na działanie antybiotyków, m.in. dzięki zwiększonej horyzontalnej transmisji genów, modyfikacji celu antybiotykowego czy zmianie przepuszczalności komórek (Ćwiek i wsp., 2021). Zarówno gradienty stężeń jak i wzmocniony status mutacji wśród bakterii obecnych w biofilmie, czynią go istotnym miejscem do rozwoju antybiotykooporności. Badania przeprowadzane przez Hahne i wsp. (2022) dowodzą że podczas kontaktu biofilmu z antybiotykami, ich stężenia nie ulegają znacznym wahaniom, istotniejszym problemem może być tutaj biodostępność podawanego leku.

Należy podkreślić także rolę bioasekuracji w zmniejszeniu ryzyka wybuchu i rozprzestrzeniania się choroby w gospodarstwie. Zasady bezpieczeństwa powinny być dostosowane do danego typu produkcji drobiarskiej, gatunku ptaków czy regionu produkcji drobiarskiej (Delpont i wsp., 2021).

1.2.2 Zakażenia pałeczkami *Salmonella*

Jaja i mięso drobiu to jedne z najczęściej spożywanych pokarmów na świecie, których produkcja odnotowuje stały rozwój. Sektor mięsa drobiowego reprezentuje 2/3 światowej produkcji mięsa na świecie i szacuje się że do 2025 roku osiągnie największy wzrost spożycia w ciągu dekady. Podobnie było w sektorze produkcji jaj, gdzie w 2019 r. odnotowano wzrost produkcji o 18% w stosunku do ilości jaj produkowanej 10 lat wcześniej (Conway, 2019). W ślad za tak znaczącą intensyfikacją produkcji idzie rosnące zagrożenie zanieczyszczenia pokarmów drobnoustrojami patogennymi dla ludzi m.in. pałeczkami *Salmonella* (*S.*), będącymi po *Campylobacter* najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych u ludzi na świecie (EFSA raport, 2021).

Jak wynika z raportu EFSA za rok 2020, przypadki salmonellozy u ludzi w UE, przenoszonej przez żywność, były spowodowane głównie przez serowary *S. Enteritidis* (48,7% oznaczonych szczepów), *S. Typhimurium* (12,4%) i jednofazowy *S. Typhimurium* (11,1%). Trzema najczęściej diagnozowanymi źródłami zatruc były jaja i produkty jajeczne, wieprzowina oraz jej produkty, a także wyroby piekarnicze. W 2020 r. serotypowano ponad 17 tys. izolatów *Salmonella* pochodzących od zwierząt (m.in.:

brojlerów, bydła, indyków, kur niosek i świń) oraz ich produktów. Izolaty *S. Enteritidis* pochodziły najczęściej ze stad brojlerów (59,3%) oraz kur niosek i jaj (34,8%). Z kolei, izolaty *S. Typhimurium* pochodziły od brojlerów (37%) oraz świń (33,5%) (EFSA raport, 2021). Najnowsze badania przeprowadzone w Polsce przez Pasim i wsp., (2021) którzy wyizolowali 94 szczepy *Salmonella* od drobiu wodnego, należące do 13 różnych serowarów, dowodzą, że niemal połowę z nich (48,94%) stanowiła *S. Typhimurium*. Kolejnym dominującym serowarem była *S. Enteritidis* (15,96%) oraz jednofazowy wariant *S. Typhimurium* (8,51%). Pozostałe serowary zidentyfikowano jako *S. Indiana* i *S. Kottbus* (po 6,38%), *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Schleissheim* (po 2,13%) oraz *S. Senftenberg*, *S. Anatum*, *S. Bispebjerg* (po 1,06%). W trzech (2,09%) gospodarstwach stwierdzono jednoczesne zakażenie dwoma różnymi serowarami *Salmonella*.

Krajowe programy monitorowania zakażeń pałeczkami *Salmonella*, wdrożone od 2007 roku obejmują stada kur niosek reprodukcyjnych i towarowych, kurcząt rzeźnych oraz indyków hodowlanych i rzeźnych, a także środki żywienia zwierząt (Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 28 marca 2007 r. w sprawie wprowadzenia „Krajowego programu zwalczania niektórych serotypów Salmonelli w stadach hodowlanych gatunku kura (*Gallus gallus*)” na lata 2007—2009). Programy te nie obejmują stad drobiu wodnego. Nie oznacza to jednak, że gęsi i kaczki nie są badane przed ubojem. Wynik ujemny w kierunku zakażenia pałeczkami *Samonella* jest niezbędny przed wprowadzeniem zwierząt do ubojni. Możliwe jest także leczenie stada drobiu wodnego chemioterapeutykami w przypadku uzyskania wyniku dodatniego. Należy jednak pamiętać, że drób wodny jest bezobjawowym nosicielem wielu gatunków pałeczek *Salmonella* (Grigar i wsp., 2017, Pasim i wsp., 2021), u którego objawy kliniczne mogą być słabo wyrażone, a tym samym staje się ukrytym zagrożeniem dla zdrowia publicznego (Martelli i wsp., 2017).

Do zakażenia ptaków pałeczkami *Salmonella* dochodzi zarówno drogą poziomą jak i pionową, przy czym po zakażeniu drogą pionową następuje kolonizacja jajnika i jajowodu u nioski a tym samym znoszenia jaj z których pisklęta kłują się z systemową, uogólnioną salmonellozą (Yu i wsp., 2008, Su i wsp., 2011). Wśród piskląt i młodych ptaków dochodzi najczęściej do zejść śmiertelnych w skutek posocznicy. U dorosłych ptaków z kolei przebieg choroby jest zazwyczaj bezobjawowy. W przypadku drogi poziomej do zakażeń może dochodzić przez kontakt pośredni z zanieczyszczoną

pałeczkami *Salmonella* wodą, paszą, ściółką, kurzem oraz bezpośrednio m.in. poprzez zjedzenie owadów będących nosicielami zarazka: karalucha czy mącznika. Również myszy i szczury stanowią duże zagrożenie epidemiologiczne zanieczyszczając odchodami paszę i wodę. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, że w przypadku chowu gęsi istnieje bezpośredni dostęp ptaków do środowiska zewnętrznego poprzez korzystanie z pastwisk i wybiegów. Badania środowiskowe przeprowadzone przez Wang i wsp. (2020) z prób kału, paszy, jaj a także próbek wody z ferm gęsi, wskazywały, że najwyższy wskaźnik izolacji pałeczek *Salmonella* uzyskano w przypadku próbek wody (40%).

Przebieg infekcji u drobiu wodnego może być subkliniczny, choć zdarzają się także przypadki przebiegu w pełni objawowego z wysoką śmiertelnością (Wang i wsp. 2020). Pisklęta gęsi padają w przebiegu posocznicy oraz z objawami biegunki (Yu i wsp., 2008). U starszych gęsi można zaobserwować zaburzenia w poruszaniu się a także objawy porażenne i przewracanie się na grzbiet. W obrazie sekcyjnym dominują stany zapalne (często włóknikowe) błon surowiczych, co ma związek z zakażeniem ogólnoustrojowym i powikłaniami bakteryjnymi (Yu i wsp., 2008).

Bioasekuracja fermy odgrywa istotną rolę w przerywaniu łańcucha transmisji wielu patogenów, aczkolwiek specyfika produkcji drobiu wodnego często ogranicza jej założenia, głównie ze względu na ciągły kontakt ptaków z środowiskiem zewnętrznym podczas przebywania na wybiegach. Podstawowe strategie zwalczania zakażeń pałeczkami *Salmonella* obejmują: uzyskiwanie 1-dniowych piskląt wolnych od zakażeń pałeczkami *Salmonella*, przeprowadzanie szczepień, stosowanie preparatów zasiedlających przewód pokarmowy ptaków zgodnie z zasadą tzw. kompetencyjnego wykluczania (ang. competitive exclusion - CE) a także eliminowania pałeczek *Salmonella* z pasz oraz środowiska fermy (Dar i wsp., 2017). Kluczową rolę w przerywaniu transmisji patogenu, odgrywa dezynfekcja budynków inwentarskich, zwłaszcza usuwanie zanieczyszczeń resztkowych w poidłach czy karmidłach (Martelli i wsp., 2017). Wiele leków ogranicza śmiertelność, ale nie jest w stanie całkowicie wyeliminować infekcji, jest to związane z nosicielstwem u ptaków po przechorowaniu zakażenia. Dodatkowo problem narastającej lekooporności i rozwijającego się udziału rolnictwa ekologicznego w rynku światowym obliuguje do poszukiwania metod alternatywnych do antybiotykoterapii. Jedną z nich mogą okazać się szczepienia ochronne (Shoaib i wsp., 2017). Obecnie na Polskim rynku dostępna jest jedynie

szczepionka dla kaczek AviPro Salmonella Duo (żywa szczepionka przeciwko zakażeniom *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*), nadal brakuje produktu dla gęsi.

Wszystkie państwa członkowskie Unii Europejskiej są objęte koniecznością realizacji postanowień zawartych w Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2003/99/WE z dnia 17 listopada 2003 roku w sprawie monitorowania chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych oraz Rozporządzeniu nr 2160/2003 dotyczącym zwalczania salmonelli. Przepisy te kontrolują zakażenia pałeczkami *Salmonella* na każdym etapie łańcucha produkcyjnego drobiu grzebiącego, łącznie z paszami zgodnie z zasadą „od pola do stołu”. Mimo, że regulacje te nie obejmują drobiu wodnego, jest on badany przed wprowadzeniem na ubojnię w kierunku zakażeń pałeczkami *Salmonella*, w związku z handlem zagranicznym i bezpieczeństwem żywności konsumentów. Kontrola i zapobieganie wystąpienia salmonellozy opiera się o przestrzeganie zasad HACCP (ang. Hazard Analysis Critical Control Point - HACCP), które powinny zostać wdrożone w każdym gospodarstwie aby zapewnić konsumentowi bezpieczny produkt o najwyższej jakości. Zintegrowane podejście do pojęcia zdrowia publicznego, bezpieczeństwa żywności oraz zdrowia zwierząt wpisuje się w ramy strategii One Health, której celem jest osiągnięcia optymalnego zdrowia ludzi i zwierząt.

Zasady postępowania ze stadem podejrzanym, zakażonym lub chorym na salmonellozę w przypadku drobiu grzebiącego, zostały określone w krajowych programach zwalczania salmonelloz. Badanie w kierunku wykrywania obecności pałeczek *Salmonella* oraz identyfikację serologiczną wykonuje się zgodnie z polską normą PN-EN ISO 6579-1:2017- 04/A1:2020-09 Schemat White'a- Kauffmanna- Le Minora 2007 będącą metodą badawczą regulowaną prawnie.

1.2.3 Zakażenia włoskowcem różycy- *Erysipelothrix rhusiopathiae*

W ostatnich latach w krajowych stadach gęsi, diagnozuje się zakażenia włoskowcem różycy (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)- Gram-dodatnią pałeczką, szeroko rozpowszechnioną w środowisku. Drobnoustrój ten może infekować wiele gatunków ptaków i ssaków, a z uwagi na swój potencjał zoonotyczny także ludzi. Choroba może mieć charakter endemiczny i pojawiać się cyklicznie w kolejnych wstawieniach na danej fermie. Jej występowanie potwierdzono m.in. w stadach: indyków, brojlerów, kur niosek, gęsi, bażantów i przepiórek. Ekspozycja na chorobę w przypadku gęsi jest ściśle związana z dostępem do wybiegów, gdzie źródłem skażenia gleby są odchody nosicieli

włoskowca różycy np. świń lub owiec (Bailie i wsp., 1970, Janowska i wsp., 1978). Dodatkowo umożliwiony jest kontakt z wektorami zarazka: gryzoniami, dzikimi ptakami, ssakami i owadami (Morgan i wsp., 1994, Mazaheri i wsp., 2006, Eriksson i wsp., 2009). Nie bez znaczenia pozostanie kanibalizm i wydziobywanie piór, które zdarzają się dość często wśród starszych gęsi i sprzyjają dostawaniu się zarazka do organizmu przez uszkodzoną skórę i błony śluzowe.

Różycy u drobiu przebiega w formie ostrej, a nawet piorunującej, którą zwiastują pojedyncze padnięcia ptaków, po czym śmiertelność gwałtownie rośnie. Przypadek wybuchu różycy w stadzie gęsi opisała Bobrek i wsp. (2016). Gęsi, które padały były w dobrej kondycji, w tkance podskórnej powstały wybroczyny, mięśnie piersiowe i udowe miały ciemny kolor. Obserwowano także wybroczyny na sercu- mniejsze, pojedyncze na powierzchni przedsionków i większe obszary przekrwienia na powierzchni komór. Trzustka pozostała biała z czerwonymi wybroczynami na powierzchni. Tłuszcz w jamie brzusznej był czerwony, nerki lekko przekrwione, żyły w mózgu wypełnione krwią ale bez objawów przekrwienia na jego powierzchni. W badaniu histopatologicznym w próbkach mięśnia sercowego zaobserwowano liczne, małe kolonie bakteryjne, obwodowe miejscowe nacieki zapalne i degradację kardiomiocytów. Wśród zakażonych gęsi dominowały zmiany naczyniowe w narządach mięsnych, wśród których najbardziej dotknięte były: wątroba, śledziona, serce i trzustka. Zmiany sugerowały uogólnioną posocznicę, a badania histopatologiczne wykazały skupiska bakterii otoczone trombocytami w naczyniach włosowatych oraz małych tętnicach i żyłach.

Jak wynika z przeglądu najnowszego piśmiennictwa dotyczącego różycy ptaków jest to choroba występująca najczęściej w małych gospodarstwach, zwłaszcza w gospodarstwach ekologicznych, dodatkowo zmiany klimatu, zanieczyszczenie środowiska czy spadek odporności gospodarza mogą wpłynąć na pojawienie się choroby u zwierząt (Oppriesnig i wsp., 2020). Niedawne przypadki różycy wśród drobiu zostały opisane w stadach kur niosek (Wattrang i wsp., 2020), brojlerów (Wattrang i wsp., 2019) a także indyków (Silva i wsp., 2020). Ostatnie badania dotyczące występowania różycy wśród gęsi w Polsce zostały przeprowadzone przez Dec i wsp. (2021). Autorzy wykazali, że występowanie różycy u drobiu wodnego jest skorelowane z wiekiem ptaków i porą roku, chorują ptaki starsze, głównie jesienią.

Jedynym gatunkiem drobiu dla którego zarejestrowano szczepionki inaktywowane przeciwko różycy są indyki (Bobrek i wsp., 2016). Według Gawła (2008) dwukrotne podanie gęsiom szczepionki inaktywowanej Ruvax (zarejestrowanej dla świń), podskórnie w odstępie trzech tygodni, w dawce 0,5 ml na ptaka, dawało zabezpieczenie przed zachorowaniem na fermach z endemicznie występującą różycą. Szczepionki autogenne (autoszczepionki) są popularnym produktem w hodowli trzody chlewnej oraz drobiu i wykorzystywane w momencie braku na lokalnym rynku odpowiedniego produktu komercyjnego. Tego typu szczepionki mają ograniczone zastosowanie, do takiego gospodarstwa z którego pochodzą izolaty, gdyż zawierają specyficzne szczepy bakterii. Mają także swoje wady m.in. brak walidacji oraz możliwość skażenia innym patogenem (Oppriesing i wsp., 2020).

Badanie anatomopatologiczne może być przydatne w diagnostyce różycy, jednak z uwagi na podobny przebieg do pasterelozy czy grypy ptaków, powinno być zawsze rozszerzone o badanie bakteriologiczne, wirusologiczne i molekularne próbek narządów (wątroba, serce, stawy). Metody identyfikacji włoskowca różycy opierają się o hodowlę drobnoustrojów, połączoną z identyfikacją biochemiczną i/lub badaniem PCR uzyskanego izolatu. Lekami z wyboru są penicyliny i cefalosporyny (Veraldi i wsp., 2009).

1.2.3 Zakażenia pałeczkami *Pasteurella multocida*

Pasteurella multocida subsp. *multocida* to bakteria wywołująca cholerę drobiu, należąca do rodziny *Pasteurellaceae*. Do tej samej rodziny należy także rodzaj *Gallibacterium*- drobnoustrój zasiedlający drogi oddechowe (jamę nosową, tchawicę) oraz układ rozrodczy (jajnik, jajowód), a także końcowy odcinek przewodu pokarmowego u zdrowych ptaków (Bojesen i wsp., 2003).

Cholerę drobiu notuje się głównie wśród drobiu wodnego, utrzymywanego w systemach półzamkniętych, często z dostępem do zbiorników wodnych. W Polsce w wielu przypadkach choroba występuje endemicznie w stadach gęsi i powtarza się w każdym cyklu produkcyjnym. Epidemie cholery wśród drobiu często wiążą się z wysoką śmiertelnością, występującą w krótkim czasie. Ptaki padają bez charakterystycznych objawów klinicznych, czasem można zaobserwować wodnistą biegunkę koloru zielonego, osowienie, zmierzwione upierzenie, ewentualnie sinicę nieopierzonych części ciała. W przypadku postaci chronicznej może dochodzić do uogólnionych stanów

zapalnych układu oddechowego, stawów, jamy otrzewnej lub jajowodu (Varga i wsp., 2013). Bakterie dostają się do organizmu *per os*, poprzez błony śluzowe górnych dróg oddechowych, uszkodzoną skórę lub spojówki.

Dziki ptactwo wodne może być dodatkowym źródłem infekcji stad drobiu (Samuel i wsp., 2003). Pałeczka *Pasteurella* może przeżyć w środowisku do 2 tygodni, czas ten jest znacznie krótszy po oddzieleniu jej od materiału organicznego, staje się wtedy bardzo wrażliwa na popularne środki dezynfekcyjne, promieniowanie słoneczne, suszenie i temperaturę $>56^{\circ}\text{C}$ (Blackall i Hofacre, 2020).

Przypadek wystąpienia cholery drobiu u kaczek i kurcząt brojlerów opisał w ostatnim czasie Shalaby i wsp. (2021). Epidemie pasterelozy w danym stadzie często powtarzają się przy kolejnych wstawieniach w związku z zasiedleniem obiektu przez dany serotyp *Pasteurella* lub jego ponowne wprowadzenie do środowiska fermy (Varga i wsp., 2013).

Obecnie od drobiu, w tym od drobiu wodnego, izoluje się coraz częściej bakterie z rodzaju *Gallibacterium*, uprzednio określane jako *Pasteurella haemolítica-like*, *Actinobacillus salpingitis* lub *Pasteurella anatis*. W przypadku *Gallibacterium anatis*, zakażenie tym drobnoustrojem potwierdzono u kur, indyków, kaczek, perliczek, gęsi, bażantów, gołębi, pawi i kuropatw (Narasinakuppe Krishnegowda i wsp., 2020). Na patogenność pałeczek *Gallibacterium* mają wpływ różne czynniki m.in.: rodzaj szczepu, droga zakażenia czy stan fizjologiczny organizmu ptaka. Szczególną patogennością charakteryzuje się biowar hemolityczny *G. anatis*, wywołujący zapalenie jajnika, zapalenie jajowodu, zapalenie otrzewnej, zapalenie torebki wątrobowej, martwicę wątroby, zapalenie osierdzia, zapalenie worków powietrznych, zapalenie tchawicy, zapalenie jelit czy posocznicy u kurcząt (Narasinakuppe Krishnegowda i wsp., 2020). Z badania Bisgaard i wsp. (2009) wynika, że może występować też nowo wyodrębniony takson- *Gallibacterium salpingitidis sp. nov.*, wywołujący zapalenie jajnika, jajowodu i otrzewnej u gęsi. W Polsce doniesienia na temat *Gallibacterium* u drobiu, w tym u gęsi, zostały przedstawione w 2021 r. na konferencji drobiarskiej przez Karwańską i wsp. (2021).

Szczepienia są jedną z metod zapobiegania wystąpienia pasterelozy w stadach drobiu. Na świecie dostępnych jest kilka komercyjnych szczepionek przeznaczonych dla drobiu opartych na bakterynach i/lub ich toksynach, jednak nie są one zarejestrowane dla

gęsi w Polsce. Obecnie trwają prace nad szczepionkami nowej generacji (podjednostkowe, rekombinowane czy DNA), które mogą zostać w przyszłości wykorzystane do immunizacji indyków i kur (Mostaan i wsp., 2020). W Polsce rutynowo nie szczepi się stad gęsi przeciwko pasterelozie.

1.2.4 Zakażenia grzybicze drobiu wodnego - aspergiloza

Zakres badań w pierwotnej wersji nie obejmował zakażeń grzybiczych wśród gęsi, jednak z uwagi na ich częste występowanie w stadach drobiu wodnego, uznałam, że należy przytoczyć choćby liczbę przypadków aspergilozy płuc potwierdzonych w grupie badawczej.

Wśród zakażeń grzybiczych u drobiu wodnego najczęściej stwierdzana jest aspergiloza płuc, której czynnikiem etiologicznym są grzyby pleśniowe z rodzaju *Aspergillus*, najczęściej *Aspergillus fumigatus*, na drugim miejscu plasuje się *Aspergillus flavus* (Mahmud i wsp., 2017). W związku z jego ubikwitalnym charakterem występowania, można go z łatwością wyizolować ze środowiska bytowania ptaków m.in. z karmideł, ściółki a także wilgotnego i ciepłego środowiska fermy (Shirin Sultana i wsp., 2014). Ponadto do zakażeń może dochodzić także podczas pozyskiwania jaj wylęgowych, lężenia jaj niezdezynfekowanych i w zanieczyszczonych *Aspergillus spp.* aparatach wylęgowych. Pisklęta, które są najbardziej podatne na infekcje grzybicze, zakażają się w klujniku. Wysoka temperatura i wilgotność powietrza, które są często spotykane na fermach drobiu, sprzyjają szybkiemu rozmnażaniu bezpłciowemu grzybów oraz wzrostowi ich strzępek. W rezultacie dochodzi do powstania hydrofobowej zawiesiny konidi w powietrzu wdychanym przez ptaki (Arné i wsp., 2011). Konidia są bez trudu wdychane i osadzają się w dolnych drogach oddechowych powodując choroby układu oddechowego i immunosupresję. Po wnikięciu do płuc zarodniki mogą przenosić się drogą krwi do mózgu i oka. Jensen i wsp., (1994) opisał także możliwość przenoszenia się ziarniaków grzyba z worków powietrznych na błony surowicze pobliskich narządów.

Objawy kliniczne różnicują się w zależności od rodzaju stada, wieku ptaków czy poziomu narażenia. Powszechnie wiadomo, że najbardziej wrażliwe są młode ptaki, u których może rozwinąć się postać ostra przebiegająca z niewydolnością oddechową, dusznością, często skutkująca wysoką zachorowalnością i śmiertelnością a tym samym stratami ekonomicznymi w stadzie (Sajid i wsp, 2006). Gąsięta chorujące na grzybicę charakteryzują zaburzenia oddechowe, apatia, duszność, problemy z poruszaniem się.

Nie osiągają one fizjologicznych przyrostów masy ciała i odstają od stada (Nururrozi i wsp., 2020). Łagodniejsze przypadki obserwuje się u osobników starszych, u których występuje głównie postać przewlekła, ze słabo wyrażonymi, często nietypowymi objawami (duszność, letarg, odwodnienie i objawy neurologiczne, takie jak ataksja, drgawki, niedowład i kulawizna) (Beernaert i wsp., 2010). Przewlekła forma choroby występuje rzadziej, zazwyczaj u ptaków reprodukcyjnych i przebiega z mniejszą śmiertelnością (Femenia i wsp., 2007).

W badaniu sekcyjnym u gąsiąt widoczne są żółto-białe ziarniniaki na powierzchni płuc, których wielkość waha się od prosówkowatych do guzów o średnicy 1 cm, powodując obliteracje dużej części płatów płucnych. Ściana worków powietrznych jest widocznie zgrubiona, pokryta gęsto białym nalotem grzybiczym. Drobne ziarniniaki mogą lokalizować się także wewnątrz tchawicy, przełyku, żołądka, jelita oraz na powierzchni błon surowiczych wątroby, śledziony, nerek, jelita cienkiego doprowadzając do całkowitego zniszczenia jego ściany.

Rokowania w przypadku wystąpienia aspergilozy u drobiu są złe, głównie ze względu na ograniczone możliwości terapeutyczne. Badania przeprowadzone przez Ziółkowską i wsp. (2014) dotyczące grzybicy u gęsi wykazały, że wyizolowane szczepy *A. fumigatus* prezentowały wysoki stopień oporności na powszechnie stosowane środki przeciwgrzybicze. Autorzy wykazali, że 100% szczepów, niezależnie od źródła izolacji (gardło, płuca lub woda) było opornych na mikonazol, a następnie malejąco na: amfoterycynę B (90,6%), klotrimazol (84,7%), ketokonazol (84,7%) i tiokonazol (70,6%). Natomiast ostatnie wyniki badań opublikowane przez Nawrot i wsp. (2019), wskazują że prawie wszystkie (98%) badane szczepy *Aspergillus* wyizolowane od brojlerów, gęsi, indyków i kaczek (59/60) były wrażliwe na itrakonazol. Według opinii Nawrot i wsp. (2019), w związku z szerokim zastosowaniem środków przeciwgrzybiczych w przemyśle rolniczym opartych na pochodnych imidazolu-enilikonazol/imazalil (Janssen Pharmaceutica), temat rozwoju oporności grzybów na triazole powinien być cyklicznie monitorowany.

1.3 Zakażenia wirusowe w stadach gęsi

Najczęściej notowaną chorobą wirusową wśród gęsi tuczowych w kraju jest choroba Derzsy'ego wywoływana przez parwowirus gęsi (GPV). Równie często notowane są ostatnio zakażenia polyomawirusem (GHPV) oraz cirkowirusem (GoCV) gęsi. W swoich badaniach Kozdruń i wsp. (2019) potwierdzili GPV w 33,3% badanych stad, GHPV w 40,9% badanych stad, a GoCV w 72,7% stad, na przestrzeni lat 2010-2018. W przypadku zakażeń GoCV stwierdzono w takich stadach dodatkowo znaczny odsetek (ponad 80%) wtórnych zakażeń bakteryjnych.

1.3.1 Zakażenia parwowirusem gęsi (GPV- Goose Parvovirus Infection)

W intensywnej hodowli drobiu wodnego najczęściej stwierdzaną chorobą wirusową jest choroba Derzsy'ego. Stanowi ona poważny problem epizootyczny oraz ekonomiczny w wielkostadnej produkcji drobiu wodnego i podlega obowiązkowi urzędowej rejestracji (Dz. U. 2004 nr 69, poz.625;1). Wyróżnia się 2 warianty parwowirusa drobiu wodnego: GPV wywołujący chorobę Derzsy'ego u gęsi oraz MDPV (ang. Moscowy Duck Parvovirus - MDPV) wywołujący parowirozę kaczek piżmowych. GPV powoduje zakażenia nie tylko gęsi ale także kaczek piżmowych, łabędzi czy gęsi łabędzionosej (*Anser cygnoides*), natomiast MDPV powoduje zachorowania wyłącznie u kaczek piżmowych. Wszystkie wymienione wyżej parwowirusy należą do tego samego gatunku *Anseriform dependoparvovirus 1* z rodzaju *Dependoparovirus*, podrodziny *Parvovirinae* i rodziny *Parvoviridae* (wg. International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV). Wirusy należące do tego gatunku posiadają liniowe, jednoniciowe DNA oraz genom o długość 5-kb, w którym występują 2 główne ramki odczytu (ang. open reading frames - ORFs): ORF *rep* kodujący proteiny Rep (białka regulatorowe) oraz strukturalną ORF kodującą białka kapsydu: Vp1, Vp2 oraz Vp3, które mają kontakt z przeciwciałami i komórkami kompetentnymi. Białko Vp3 jest najsilniej ekspresjonowane oraz najbardziej zmienne spośród wszystkich trzech białek a także odpowiedzialne za indukcję powstawania przeciwciał neutralizujących i rozwój odporności u drobiu wodnego (Palya wsp., 2020). Brak otoczki sprawia, że wirus jest bardzo odporny na czynniki fizyczne jak i chemiczne.

Choroba Derzsy'ego ma niemałe znaczenie dla produkcji gęsi. Od pierwszego przypadku jej zdiagnozowania we wczesnych latach 60-tych, do dzisiejszego dnia powoduje dotkliwe straty w przemyśle drobiarskim na całym świecie. Niedawne

wybuchy parwowirusy w stadach gęsi w Turcji opisali Isidan i wsp. (2021) a także w Chinach Li i wsp., (2019). Notowane są także przypadki koinfekcji m.in. z astrowirusami (Liu i wsp., 2020). W Polsce ostatnie przypadki choroby Derzsy'ego opisali Woźniakowski i wsp. w 2012 r.

W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia m.in. z Chin o licznych zachorowaniach kaczek Pekin powodowanych przez nowy wariant genetyczny GPV (ang. Novel Goose Parvovirus - nGPV) wywołujący syndrom karłowatości i skróconego dzioba (ang. Short Beak and Dwarfism Syndrome - SBDS lub inaczej Beak Atrophy and Dwarfism Syndrome - BADS). Zdiagnozowany izolat oznaczono jako SDLC01, a wstępna analiza genomu wykazała, że zawiera on 90,8-94,6% nukleotydów tożsamy z GPV i 78,6-81,6% nukleotydów identycznych jak MDPV (Chen i wsp., 2015). W Polsce pierwsze przypadki SBDS na tle nGPV pojawiały się w 2019 roku, kiedy to na fermach zaczęto obserwować kaczki z objawami skróconego dzioba, dysplazji języka, ubytkami w pierzeniu i zmniejszonymi przyrostami masy ciała. Przeprowadzone w kraju badania diagnostyczne wraz z sekwencjonowaniem materiału genetycznego wirusa wykazały 98.57–99.28% podobieństwo ze szczepami izolowanymi wcześniej w Chinach podczas wybuchów SBDS (Matczuk i wsp., 2020).

Analizując polskie szczepy parwowirusów gęsi, Woźniakowski i wsp. (2009) potwierdzili że sekwencja nukleotydów regionów kodujących białka kapsydu wirusa szczepów terenowych jest podobna do szczepów szczepionkowych stosowanych w profilaktyce choroby Derzsy'ego.

Wirus rozprzestrzenia się zarówno drogą pionową poprzez zakażone jaja jak i poziomą: bezpośrednio poprzez zakażony kał, a także pośrednio przez zanieczyszczony sprzęt, wodę, paszę, a nawet za pośrednictwem ludzi i samochodów przemieszczających się pomiędzy fermami. Przebieg choroby różni się w zależności od statusu immunologicznego piskląt oraz wieku ptaków. W przypadku kilkudniowych piskląt, w pełni wrażliwych na zakażenie dochodzi do wysokich upadków, często bez charakterystycznych objawów klinicznych, a śmiertelność w stadzie może sięgać nawet 100%. Analiza objawów klinicznych występujących podczas zakażenia terenowego, przeprowadzona przez Woźniakowskiego i wsp. (2012) wykazała, że manifestowały się one zaburzeniem w pierzeniu oraz apatią, głównie u ptaków powyżej 3 tygodnia życia. Podobnie objawy sekcyjne: wodobrzusze, zapalenie osierdzia, powiększenie wątroby i

nerek było widoczne u ptaków powyżej 3 tygodnia życia. Udowodniono także, że największa ilość kopii wirusa występowała w wątrobie i w sercu, co korelowało z obserwowanymi objawami klinicznymi i anatomopatologicznymi u 3-5 tygodniowych ptaków.

Nie bez znaczenia pozostaje kwestia wprowadzenia szczepień, które w znacznej mierze przyczyniły się do ograniczenia występowania ostrej postaci choroby Derzsy'ego. Obecnie częściej obserwowana jest postać przewlekła choroby przebiegająca z utratą apetytu, biegunką i znacznym zróżnicowaniem stada. Śmiertelność może sięgać 19-30%. Z kolei w przypadku postaci ostrej, dotyczącej głównie piskląt, śmiertelność może wynosić 60-80% stada. Charakterystycznym objawem jest również zaburzenie w opieraniu się gęsi oraz „postawa- pingwina” pojawiająca się w efekcie występowania wodobrzusza. Do tego procesu dołączają się powikłania bakteryjne, co w obrazie sekcyjnym obserwowane jest jako włóknikowe zapalenie błon surowiczych. Najczęściej pojawiające się zmiany w wątrobie obejmowały błądź lub przekrwienie, powiększenie narządu, włóknikowe zapalenie torebki wątrobowej oraz pojedyncze ogniska martwicze (Kozdruń i wsp., 2012, Kozdruń, 2019).

Dostępnych jest wiele metod identyfikacji parwowirusów gęsi, poczynając od detekcji w mikroskopie elektronowym, poprzez izolację i identyfikację na zarodkach gęsi lub hodowlach komórkowych, a kończąc na metodach serologicznych i biologii molekularnej. Test hamowania hemaglutynacji (HI- hemagglutination inhibition) oraz dyfuzji w żelu agarozowym (ang. Agar Gel Immunodiffusion Assay - AGID) są obecnie rzadziej stosowane ze względu na dużą pracochłonność. Alternatywą dla nich są testy immunoenzymatyczne (ELISA) w których wykorzystuje się całe, oczyszczone cząsteczki wirusa lub rekombinowane białka kapsydu jako antygeny opłaszczającego. Tarasiuk i wsp. (2019) w PIW-PIB w Puławach opracowali test ELISA, do wykrywania przeciwciał anti-GPV z użyciem białka VP3ep4-6 jako antygeny opłaszczającego, czyniąc ten test łatwiejszym, wysoce czułym i specyficznym.

Metody molekularne, Real-Time PCR jest porównywalny z klasycznym PCR pod względem czułości, pozwala także na ilościową ocenę materiału genetycznego w badanej próbce. Alternatywą dla tych testów może być metoda LAMP (loop-mediated isothermal amplification), będąca modyfikacją PCR jednak nie wymaga ona naprzemiennego grzania i chłodzenia mieszaniny reakcyjnej dzięki czemu procedura staje się szybsza.

Real-Time PCR dzięki ilościowej ocenie liczby kopii wirusa GPV oraz MDPV może być wykorzystywany do monitoringu miana wirusa oraz jego korelacji z rozwojem choroby. Woźniakowski i wsp. (2012) potwierdzili w swoich badaniach, że liczba kopii wirusa ściśle koreluje z przebiegiem klinicznym choroby. U młodych gęsi i kaczek piżmowych (do 2 tygodnia życia), nie wykazujących żadnych objawów klinicznych choroby, liczba kopii wirusa była znacząco niższa niż u ptaków w wieku 3-5 tygodni życia z objawami wodobrzusza, zaburzeniami pierzenia, zapaleniem osierdzia, wątroby i jelit. Dowodzi to występowania silniejszej infekcji u ptaków starszych. Yang i wsp. (2009) stwierdzili, że można zastosować Real-Time PCR do wykrywania i ilościowego oznaczania GPV u piskląt gęsich już w 2 dobie po zakażeniu (zakażenia transowarialne). Materiał genetyczny wirusa GPV jest wykrywalny we krwi, sercu, wątrobie, śledzionie, nerkach, torbie Fabrycjusza, grasicy, gruczole Hardera już po 4 godzinach po inokulacji (Yang i wsp., 2009)

Przeciwciała matczyne utrzymują się we krwi piskląt średnio do 35 doby, zaś po immunizacji wykrywane są do 20 tygodnia życia. Z badań Ting i wsp. (2021) wynika, że jeśli ptak przechoruje chorobę Derzsy'ego staje się nosicielem wirusa do końca życia, a przeciwciała anti-GPV wykrywane są do 80 tygodni po infekcji. Eksperymentalne zakażenie parwowirusem wywołuje wczesną i silną odpowiedź immunologiczną, miano przeciwciał wzrasta tydzień po zakażeniu i długo utrzymuje się na wysokim poziomie. Ponadto wykazano, że miano przeciwciał pozostawały na wyższym poziomie jeśli do zakażenia dochodziło u ptaków powyżej 3 tygodnia życia, co dowodzi silniejszej odpowiedzi immunologicznej u ptaków starszych (Glávits i wsp., 2005).

Przełom w ograniczeniu występowania choroby Derzsy'ego w kraju nastąpił po wprowadzeniu szczepień stad reprodukcyjnych oraz towarowych gęsi. Na polskim rynku dostępna jest jedna szczepionka przeznaczona dla gęsi i kaczek piżmowych, która zawiera w swoim składzie inaktywowany parwowirus kaczek (szczep FM) oraz inaktywowany szczep parwowirusa gęsiego (szczep LB). Obserwacje Kozdrunia i wsp. (2012) potwierdzają tezę, że wprowadzenie szczepionki biwalentnej przyczyniło się do znacznego ograniczenia zachorowalności ptaków na tę chorobę. Na dowód tego śmiertelność gęsi w kraju z powodu choroby Derzsy'ego w roku 2008 wynosiła 17,4% a w roku 2010 już tylko 5,4%. W Polsce wszystkie stada gęsi, zarówno towarowe jak i reprodukcyjne są szczepione przeciwko chorobie Derzsy'ego. Mimo to na przestrzeni ostatnich lat pojawiały się przypadki parwowirozy u gęsi co miało związek z okresowymi

niedoborami szczepionki na rynku i zastąpieniem jej szczepionką żywą zarejestrowaną dla kaczki piżmowej, po podaniu której odpowiedź układu immunologicznego była silniejsza ale utrzymywała się krócej. (cyt.: Kozdruń, wyniki badań niepublikowanych oraz obserwacje własne)

1.3.2 Zakażenia polyomawirusem gęsi (GHPV - Goose Hemorrhagic Polyomavirus Infection)

Krwotoczne zapalenie nerek i jelit u gęsi (ang. Hemorrhagic Nephritis and Enteritis of Geese - HNEG) to zakażenie wywoływane przez wirus należący do rodziny *Polyomaviridae*, nazywane początkowo jako "choroba młodych gęsi" lub "późna choroba Derzsy'ego". Polyomawirus gęsi (GHPV) posiada dwuniciowe DNA i należy do rodziny *Polyomaviridae*, rodzaju *Gammampolyomavirus*. Genom GHPV zbudowany jest z 5252-5256 par zasad zawierających geny kodujące białka strukturalne VP1-VP3, małe i duże antygeny nowotworów (LTA i STA) oraz ORF-X o nieznanej funkcji (Kaszab i wsp., 2020a). Ze względu na dużą ilość konserwatywnych sekwencji genomowych wolno ewoluuje i ma ograniczoną liczbę żywicieli (Torres, 2020). Co ciekawe, GHPV ma tylko 59% podobieństwa sekwencji aminokwasowych z polyomawirusem wywołującym chorobę papug zwaną francuskim pierzeniem papużek falistych (ang. Budgerigar Fledgling Disease - BFD), co sugeruje, że wirusy te znacznie różnią się od siebie. Przypuszcza się nawet, że mogą stanowić odrębny gatunek (Guerin i wsp., 2000). Na poziomie komórkowym wirus replikuje w limfocytach B czego skutkiem jest ich liza w rdzeniu Bursy Fabrycjusza. Podobne zjawisko (replikacja w limfocytach B) ma miejsce podczas infekcji BFD u papug.

Choroba u gęsi została po raz pierwszy zdiagnozowana w 1969 r. na Węgrzech, następnie w innych krajach Europy, takich jak Niemcy, Francja, Polska i Belgia (Schettler, 1980, Guerin i wsp., 2000, Gaweł i wsp., 2014; Garmyn i wsp., 2017) a w ostatnim czasie potwierdzono jej występowanie na Tajwanie (Tu i wsp., 2021). Udowodniono także występowanie GHPV w stadach kaczek, które stają się bezobjawowymi nosicielami wirusa (Pingret i wsp., 2008, Corrand i wsp., 2011, badania własne, dane nieopublikowane).

Polyomawirusy odpowiadają za zakażenia subkliniczne o łagodnym przebiegu u wielu ssaków, w tym u ludzi, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością. Jedynie zakażenia wirusem BFD występujące m.in. u papug, zięb, sokołów mają nadostry przebieg, zmienny w zależności od gatunku (Guerin i wsp., 2000). Patogeneza zakażenia

związana jest z tropizmem wirusa do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, zwłaszcza przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego. Konsekwencją tego jest martwica beztlenowa kanalików nerkowych zlokalizowanych wokół dużych żył a następnie zaburzenia w krążeniu powodujące obrzęki, przekrwienie i martwicę miąższu nerek. W przypadku zakażenia piskląt gęsi obserwuje się wodobrzusze i obrzęki związane ze zmianami naczyniowymi. Jeśli dojdzie do zakażenia starszych ptaków przebieg kliniczny jest wolniejszy, związany z odkładaniem się moczanów na skutek uszkodzenia nerek (Lacroux i wsp., 2004). Krwotoczne zapalenie jelit i nerek występuje najczęściej u ptaków między 3 a 6 tygodniem życia, choć zdarzają się przypadki zachorowań gąsią jak i ptaków dorosłych. Wirus przenosi się przede wszystkim drogą poziomą choć zdarza się transmisja pionowa poprzez wprowadzenie do „czystej fermy” piskląt ze stad trwale zakażonych polyomawirusem (Palya i wsp., 2004). Według Kozdrunia (2019) i Piekarskiej i wsp. (2021), zakażenia polyomawirusem stad gęsi w Polsce na przestrzeni ostatnich lat kształtują się na wysokim poziomie (od 37,6% do 40,9%).

Diagnostyka zakażeń GHPV polega na izolacji wirusa i/lub wykryciu jego materiału genetycznego z użyciem metody PCR i jej modyfikacji (Real-Time PCR). Badania Leon i wsp. (2013) wskazują, że 80% prób ujemnych w klasycznym teście PCR było dodatnich po badaniu Real-Time PCR, co świadczy o znacznie większej czułości tego testu. Mimo, że próby do badań prowadzonych przez Leon i wsp. (2013) były pobierane ze stad nie wykazujących objawów zakażenia, większość z nich była dodatnia, co sugeruje że GHPV przenosi się między zdrowymi ptakami.

Brak jest komercyjnej szczepionki przeciwko GHPV lecz wcześniejsze badania eksperymentalne Mató i wsp. (2009) oraz Gelfi i wsp. (2010) sugerują, że podanie dwukrotne szczepionki podjednostkowej zapewnia 100% odporność szczepionych ptaków. W związku z niewielką zmiennością genomu wirusa można przepuszczać że immunoprofilaktyka byłaby wysoce skuteczna w zwalczaniu krwotocznego zapalenia jelit i nerek u gęsi.

1.3.3 Zakażenia cirkowirusem gęsi (GoCV - Goose Circovirus Infections)

Cirkowirus gęsi należy do rodziny *Circoviridae*, do rodzaju *Circovirus*. Posiada jednoniciowe i koliste DNA (ssDNA) będąc tym samym jednym z najmniejszych znanych drobnoustrojów (Rosario i wsp., 2017). Obecnie rodzina *Circoviridae* obejmuje 2 rodzaje: *Circovirus* i *Cyclovirus*. Do rodzaju Cirkowirus zalicza się: cirkowirus świń

typ I, typ II i typ III (PCV1, PCV2 i PCV3), wirus choroby dzioba i piór papug (ang. Psittacine Beak and Feather Disease Virus - PBFDV), cirkowirus gołębi (PiCV), cirkowirus ptaków z rodzaju gołębiowych (CoCV), cirkowirus łabędzia niemego (SwCV), cirkowirus kaczek (DuCV) oraz cirkowirus gęsi (GoCV). Choroba u gęsi została zdiagnozowana po raz pierwszy w Niemczech w 1999 r. przez Soike i wsp. (1999), następnie pojawiały się doniesienia z Europy i Azji potwierdzające wystąpienie GoCV (Yang i wsp., 2020). Po przeprowadzonych badaniach histologicznych i strukturalnych wtretów komórkowych stwierdzono, że opisane zmiany wykazują duże podobieństwo do tych, które występują w przypadku choroby dzioba i piór u papug (BFDF) (Ritchie i wsp., 1989) oraz u gołębi zakażonych cirkowirusem (PiCV) (Stenzel i wsp., 2020)

Gęsi zakażone GoCV wykazują niespecyficzne objawy związane z zahamowaniem tempa wzrostu, biegunką oraz zaburzeniami pierzenia. W badaniach sekcyjnych można zaobserwować powiększenie śledziony, grasicy i wątroby oraz wybroczyny na nasierdziu, wsierdziu, płucach i grasicy. Najbardziej charakterystycznymi zmianami histopatologicznymi jest zanik limfocytów T w tkance limfoidalnej śledziony, grasicy oraz bursy Fabrycjusza. Należy podkreślić, że są to wirusy immunosupresyjne, obniżające ogólną odporność organizmu ptaka. Na podstawie eksperymentalnych zakażeń stwierdzono, że czynniki takie jak dawka wirusa, szczep wirusa, droga inokulacji, obecność lub brak koinfekcji czy rasa gęsi mogą znacząco wpływać na przebieg choroby (Guo i wsp., 2011).

Badania przeprowadzone przez Ball i wsp. (2004) sugerują, że przeciwciała matczyne-MDA (ang. Maternally Derived Antibody - MDA) chronią ptaki przez okres 3-4 tygodni po wykluciu, jednakże ich poziom może być na tyle zmienny u poszczególnych osobników, że nie zapewnia protekcji dla całego stada. Dodatkowo, ustalono że narastanie przeciwciał anty-GoCV koreluje z wiekiem ptaków, im starsze osobniki tym wyższy poziom przeciwciał. Po przebadaniu 5 tygodniowych ptaków okazało się, że większość z nich (90,5%) była dodatnia w teście PCR w kierunku zakażenia GoCV co dowodzi, że ptaki zakażają się w momencie obniżenia MDA.

Należy podkreślić, że cirkowirus gęsi może występować w infekcjach mieszanych w danym stadzie, na dowód czego, badania przeprowadzone przez Czekał i wsp., (2021) w latach 2012-2020 wykazały, że mieszane zakażenia wirusem GPV i GoCV czy też GoCV oraz GHPV stwierdzane są w około 20% badanych stad. Taka sytuacja

epidemiczna, wskazuje na potrzebę stałego monitorowania zakażeń GoCV, zwłaszcza w świetle rosnącej populacji gęsi w Polsce.

2. Cel pracy

Celem badań było określenie statusu zdrowotnego gęsi przeznaczonych do tuczu w chowie intensywnym, w dwuletnim cyklu obserwacji. Grupę badawczą stanowiły ptaki pochodzące z różnych zakładów wylęgowych (ZWD). W badaniach uwzględniono też wpływ obecności przeciwciał matczynych przeciwko parwowirusowi gęsi (GPV) na zdrowotność ptaków oraz termin dostarczania piskląt na fermę (tzw. „sezon”)

Dodatkowo, przeprowadzona została analiza filogenetyczna uzyskanych w toku projektu szczepów bakteryjnych oraz materiału genetycznego wirusów pochodzącego od gęsi w celu określenia stopnia ich zróżnicowania genetycznego oraz określenia statusu epidemiologicznego stad.

Cel ten realizowałam poprzez:

- badania bakteriologiczne, izolację drobnoustrojów i tworzenie kolekcji szczepów
 - określenie wrażliwości szczepów *E. coli* na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki
 - charakterystykę molekularną izolatów bakteryjnych (*E. coli*) dotyczącą oceny prewalencji wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki oraz oceny prewalencji genów zjadliwości
 - określenie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *E. coli*
 - typizację wyizolowanych bakterii z rodzaju *Salmonella*, *Gallibacterium* oraz *Erysipelothrix* a także określenie wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki
- badania mikologiczne
- określenie poziomu specyficznych przeciwciał przeciwko parwowirusowi gęsi (GPV)
 - badania w kierunku zakażeń wirusowych (GPV, GoCV, GHPV) z wykorzystaniem metod biologii molekularnej oraz analiza filogenetyczna uzyskanego materiału genetycznego parwowirusów i cirkowirusów gęsi.

3. Materiał i metody

Badania prowadzone były w dwuletnim cyklu obserwacyjnym tj. 2019 i 2020 roku. Gąsięta wstawiane na fermy pochodziły z 3 różnych zakładów wylęgu (X, Y, Z). Program monitorowania stad prowadzony był przez cały okres odchowu oraz tuczu i obejmował 27 stad gęsi w obsadzie od 3000 do 13000 sztuk. Fermy zlokalizowane były w południowo-zachodniej i centralnej części Polski (województwo dolnośląskie, wielkopolskie i łódzkie). Ponadto, ze względu na immunoprofilaktykę choroby Derzsy'ego w stadach rodzicielskich gęsi i wydłużony sezon nieśności w analizie zdrowotności stad uwzględniono 2 okresy wstawień gąsiąt na fermę: pierwszy (I) sezon wylęgowy obejmujący wylęgi w okresie luty-marzec-kwiecień oraz drugi (II) sezon wylęgowy obejmujący wylęgi w okresie: maj-czerwiec-lipiec (Tabela 1).

Materiał do badań stanowiły:

- pisklęta 1-3 dniowe, padłe w transporcie lub na fermie;
- wycinki narządów wewnętrznych pobierane w trakcie sekcji diagnostycznych ptaków padłych na fermie lub przeznaczonych do badań przez lekarza weterynarii opiekującego się fermą gęsi;
- krew;
- kał i/lub wymazy kałowe

Założenia do realizacji pracy doktorskiej obejmowały badania tych samych ferm w dwuletnim cyklu produkcyjnym, jednak ze względu na nawracające przypadki wysoce zjadliwej grypy ptaków (HPAI) w regionie skąd pochodziła grupa badawcza, założenia te uległy niewielkiej modyfikacji. W trakcie wystąpienia HPAI (H5N8) w Polsce w latach 2016/2017 wyznaczono 65 ognisk grypy ptaków z czego 38 u drobiu fermowego. Spowodowało to nie tylko uśmiercanie części stad reprodukcyjnych w regionie ale też blokadę wstawień ptaków na fermy, w momencie znalezienia się jej w obszarze zapowietrzonym lub zagrożonym. Konsekwencją tych działań była też ograniczona liczba piskląt gęsich w kolejnych latach, z uwagi na brak stad reprodukcyjnych gęsi. W związku z tym powtarzalność wstawień piskląt z mojej grupy badawczej na poszczególnych fermach uległa zmianom. Część hodowców otrzymało tylko jedno stado zamiast dwóch lub w kolejnym roku wstawiali tylko kaczki. Dlatego też do projektu zaangażowano większą liczbę ferm niż pierwotnie zakładano. W konsekwencji tego, Hodowca D otrzymał tylko jedno wstawienie w roku 2019 (w 1 sezonie). Z kolei, hodowcy F i G otrzymali gąsięta tylko w 2019 roku (w I i II sezonie), dlatego w 2020

roku dołączono do badań 2 fermy – hodowców H oraz I, którzy otrzymali gąsięta w obu sezonach, aby utrzymać reprezentatywną liczbę badanych stad. Ponadto, warunki utrzymania gęsi hodowców H oraz I były bardzo zbliżone do tych jakie były na fermie F i G. Schemat ten obrazuje tabela 1.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badawczej gęsi

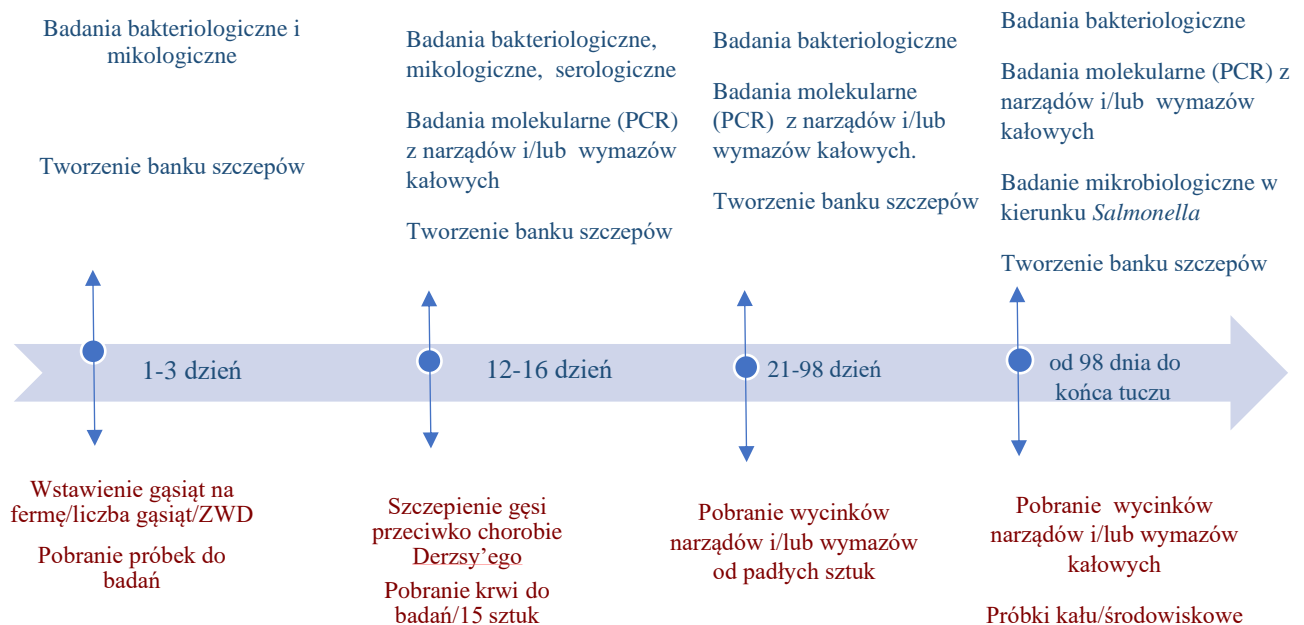
Rok	2019			2020			Sezon wylęgowy piskląt
	L.p.	Hodowca	ZWD	Wielkość stada	Hodowca	ZWD	
1	A	X	6700	A	X	7500	Sezon I (luty, marzec, kwiecień)
2	B	X	13000	B	Y	13000	
3	C	X	4500	C	X	3000	
4	D	Y	6900	D	Y	7500	
5	E	X	7777	E	X	7000	
6	F	X	8000	H	Y	3700	
7	G	Z	4500	I	Y	7200	
8	A	X	7500	A	X	8000	Sezon II (maj, czerwiec, lipiec)
9	B	X	11300	B	Y	8000	
10	C	X	4500	C	X	3500	
11	-	-	-	D	Y	7000	
12	E	X	7500	E	X	4500	
13	F	X	7500	H	Y	4000	
14	G	Z	4500	I	Y	7000	

Pobieranie próbek do badań odbywało się zgodnie z poniższym schematem:

- 1-3 dzień życia gąsiąt (wizyta na fermie). Oceniano stan zdrowotny piskląt, pobierano standardowo próbki do badań bakteriologicznych, w tym w kierunku *Salmonella*, oraz do badań mikologicznych; z wyizolowanych bakterii utworzono bank szczepów.
- 12-16 dzień życia ptaków (wizyta na fermie). Ocena stanu zdrowotnego stada, pobranie próbek krwi (15 sztuk/stado) do badania serologicznego celem określenia poziom przeciwciał matczynych anty- GPV (przeciwko wirusowi choroby Derzsy’ego). W tym okresie wykonywano szczepienie przeciwko chorobie Derzsy’ego. Pobieranie wycinków narządów wewnętrznych od padłych sztuk i/lub wymazów kałowych przyżyciowo do badań w kierunku zakażeń bakteryjnych oraz wirusowych.

- 21-98 dzień życia ptaków (wizyta na fermie). Pobieranie wycinków narządów wewnętrznych od padłych sztuk i/lub wymazów kałowych przyżyciowo do badań w kierunku zakażeń bakteryjnych oraz wirusowych.
- Od 98 dnia życia ptaków do końca tuczu (wizyta na fermie). Pobieranie wycinków narządów od padłych sztuk i/lub wymazów kałowych przyżyciowo do badań w kierunku zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Ponadto z każdego stada, na 3 tygodnie przed odstawą ptaków do ubojni pobierano próbki środowiskowe (kał) do badań w kierunku *Salmonella*.

Schemat pobierania próbek do badań został przedstawiony na rycinie 3.



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie procedury pobierania próbek do badań

3.1. Badania w kierunku zakażeń bakteryjnych i grzybiczych

3.1.1 Badania bakteriologiczne

W trakcie wizyt na fermach pobierano padłe pisklęta i/lub narządy ptaków poddawanych badaniu anatomopatologicznemu w dalszych etapach tuczu. Były to najczęściej narządy wewnętrzne: płuca, serce, wątroba, śledziona oraz próbki kału (badania środowiskowe). Izolację bakterii przeprowadzano na podłożach stałych na płytce Petriego (agar odżywczy - Nutrient agar, agar z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej - Columbia Blood Agar Base oraz MacConkey) (Oxoid, United Kingdom),

inkubacja odbywała się w warunkach tlenowych przez 18-24 godz. Uzyskane kolonie bakteryjne przesiewano na agar odżywczy oraz w przypadku podejrzenia różycy, pasterelozy lub wzrostu *Gallibacterium*, na agar z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej celem uzyskania czystej kultury bakteryjnej. W przypadku pałeczek *Salmonella* izolacja odbywała się zgodnie z Polską Normą PN-EN ISO 6579 załącznik 3 1:2017-04/A1:2020-09 + Schemat White'a- Kaufmanna- Le Minora 2007. W przypadku *Gallibacterium* i *Erysipelothrix* przynależność do gatunku potwierdzano badaniem molekularnym (PCR). Z uzyskanych czystych hodowli bakterii: *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Gallibacterium anatis* oraz *Salmonella* Typhimurium utworzono kolekcję szczepów, które następnie zamrożono na kriobankach w temperaturze -80°C do czasu wykonywania dalszych badań. W przypadku *E. coli* dalsze badania obejmowały:

- oznaczanie wartości MIC dla wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków
- izolację bakteryjnego DNA
- ocenę prewalencji wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki
- ocenę prewalencji wybranych genów zjadliwości szczepów
- ocenę zdolności tworzenia biofilmu

Dla bakterii z rodzaju *Erysipelothrix*, *Gallibacterium* oraz *Salmonella* określono: przynależność do gatunku/serowaru oraz lekowrażliwość metodą dyfuzyjno-krażkową, zgodnie z instrukcją producenta (Antibiotic Disc - Liofilchem oraz Oxoid Antimicrobial Susceptability Test Discs, UK).

3.1.2. Badania mikologiczne

Materiał do badań stanowiły płuca, pobrane losowo, od 1 – 14 dniowych piskląt. Pobrany materiał posiewano na podłoże Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu (Sabouraud Dextrose Agar z chloramfenikolem, GrasoBiotech Polska), które następnie inkubowano 72h w warunkach tlenowych i temperaturze 30-35°C. Wynik dodatni stanowił wzrost kolonii grzybów na płycie o typowym zabarwieniu i morfologii.

3.1.3 Charakterystyka wyizolowanych szczepów *E. coli*

3.1.3.1 Określenie wrażliwości szczepów *E. coli* na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki.

Określenie wrażliwości szczepów *E. coli* na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki zostało przeprowadzone dzięki wyznaczeniu minimalnych stężeń hamujących (ang. Minimal Inhibitory Concentration, MIC). W tym celu użyto testu Thermo Scientific™ Sensititre™ Avian AVIAN1F AST Plate (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), który zawiera rozcieńczenia dla 16 antybiotyków i chemioterapeutyków.

3.1.3.1.1 Wykonanie oznaczenia wartości MIC wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków

Procedura wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego (MIC) wybranych związków przeciwbakteryjnych przeprowadzona została zgodnie z zaleceniami producenta. Hodowla szczepów *E. coli* odbywała się na podłożu stałym - agar odżywczy (Nutrient agar, Oxoid, UK). Z czystej hodowli pobierano 3-5 kolonii, które zawieszano w 0,9% NaCl – soli fizjologicznej do uzyskania gęstości optycznej 0,5 McFerlanda. Następnie przenoszono 10 µl zawiesiny bakteryjnej do 11 ml podłoża Mueller-Hinton Broth (MHB) (Thermo Scientific, USA). Przy użyciu pipety wielokanałowej przenoszono po 50 µl zawiesiny bakteryjnej w MHB do każdego dołka na płytce Sensititre™ Avian AVIAN1F AST Plate, po czym inkubowano ją w temp. 37°C przez 24 godziny. Jako szczep referencyjny został użyty *Escherichia coli* ATCC 25922, zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczenia Lekowrażliwości EUCAST (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) do określania lekowrażliwości pałeczek *Enterobacteriaceae*.

Na rycinie 4 przedstawiono schemat rozmieszczenia szeregu rozcieńczeń antybiotyków i chemioterapeutyków na płytce Thermo Scientific™ Sensititre™ Avian AVIAN1F AST Plate.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ENRO 2	ENRO 1	ENRO 0.5	ENRO 0.25	ENRO 0.12	SPE 64	SDM 256	FFN 8	PEN 8	STR 1024	NOV 4	CLI 4
B	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	GEN 0.5	SPE 32	SDM 128	FFN 4	PEN 4	STR 512	NOV 2	CLI 2
C	XNL 4	XNL 2	XNL 1	XNL 0.5	XNL 0.25	SPE 16	SDM 64	FFN 2	PEN 2	STR 256	NOV 1	CLI 1
D	NEO 32	NEO 16	NEO 8	NEO 4	NEO 2	SPE 8	SDM 32	FFN 1	PEN 1	STR 128	NOV 0.5	CLI 0.5
E	ERY 4	ERY 2	ERY 1	ERY 0.5	ERY 0.25	ERY 0.12	SXT 2/38	STZ 256	PEN 0.5	STR 64	TYLT 20	NEG
F	OXY 8	OXY 4	OXY 2	OXY 1	OXY 0.5	OXY 0.25	SXT 1/19	STZ 128	PEN 0.25	STR 32	TYLT 10	POS
G	TET 8	TET 4	TET 2	TET 1	TET 0.5	TET 0.25	SXT 0.5/9.5	STZ 64	PEN 0.12	STR 16	TYLT 5	POS
H	AMOX 16	AMOX 8	AMOX 4	AMOX 2	AMOX 1	AMOX 0.5	AMOX 0.25	STZ 32	PEN 0.06	STR 8	TYLT 2.5	POS

Legenda: ENRO - enrofloksacyna, GEN - gentmycyna, XNL - ceftiofur, NEO - neomycyna, ERY - erytromycyna, OXY - oksytetracyklina, TET - tetracyklina, AMX - amoksycylina, SPE - spektynomycyna, SDM - sulfadimetoksyna, SXT - trimetoprim/sulfametoksazol, FFN - florfenikol, STZ - sulfatiazol, PEN - penicylina, STR - streptomycyna, NOV - nowobiocyna, TYLT - tylozyna, CLI - klindamycyna, POS - kontrola pozytywna, NEG - kontrola negatywna

Rycina 4. Schemat rozmieszczenia szeregu rozcieńczeń antybiotyków i chemioterapeutyków na płytce Thermo Scientific™ Sensititre™ Avian AVIAN1F AST Plate. Fotografia pochodzi z instrukcji-Sensititre Plate Guide, Sensititre™ Avian AVIAN1F AST Plate.

3.1.3.1.2 Odczyt i interpretacja wyników oznaczania wartości MIC wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków

Po 24 godzinnej inkubacji w temp. 37°C dokonano odczytu wartości MIC na podstawie oceny wizualnej płytki. Wartość MIC to najniższa wartość stężenia antybiotyku, która jest w stanie zahamować wzrost danego szczepu bakterii. Po wyznaczeniu wartości MIC, wrażliwość (ang. susceptible, S), średnia wrażliwość (ang. intermediate, I) oporność (ang. resistant, R) badanych szczepów oceniono na podstawie wytycznych EUCAST- wersja V12, 2022 (EUCAST, 2022) przedstawionych w tabeli 2. W przypadku braku wartości granicznych dla danego antybiotyku lub chemioterapeutyku, wykorzystano wytyczne Instytutu Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. Clinical Laboratory Standards Institute CLSI) (CLSI-M100 oraz VET01S ED5:2020). W przypadku braku wyznaczonych granicznych wartości w EUCAST jak i CLSI, w omówieniu podano tylko wartości MIC bez określenia

wrażliwości. Dotyczyło to: neomycyny, streptomycyny, spektynomycyny, penicyliny, erytromycyny, tylozyny oraz klindamycyny.

Tabela 2. Wartości graniczne minimalnego stężenia hamującego (MIC) [$\mu\text{g/ml}$] wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków wobec pałeczek *Enterobacteriaceae* opracowano na podstawie wytycznych EUCAST oraz CLSI (M100 oraz VET01S ED5:2020)

Grupa	Antybiotyk/chemioterapeutyk	EUSAST		CLSI		
		S \leq	R $>$	S \leq	I	R \geq
Aminoglikozydy	GEN - gentmycyna	2	2			
	NEO - neomycyna					
	STR - streptomycyna					
	SPE - spektynomycyna					
Betalaktamy	AMX - amoksycylina	8	8			
	PEN - penicylina					
Cefalosporyny	XNL - ceftiofur			2	4	8
Chinolony	ENRO - enrofloksacyna			0,5	1-2	4
Amfenikole	FFN - florfenikol			4	8	16
Makrolidy	ERY - erytromycyna					
	TYLT - tylozyna					
Tetracykliny	OXY - oksytetracyklina			4	8	16
	TET - tetracyklina			4	8	16
Sulfonamidy	SDM - sulfadimetoksyna			256		512
	SXT - trimetoprim/sulfametoksazol			2/38		4/76
	STZ - sulfatiazol			256		512
Linkozamidy	CLI - klindamycyna					
Polimyksyny	COL - kolistyna	2	2			


Legenda: S (ang. susceptible) = wrażliwy, I (ang. intermediate) = średnio wrażliwy, R (ang. resistant) = oporny

Na podstawie granicznych wartości MIC wyznaczono szczepy wielolekooporne (ang. Multidrug Resistant- MDR) tj. posiadające oporność na przynajmniej jeden antybiotyk/chemioterapeutyk z co najmniej trzech grup związków przeciwdrobnoustrojowych.

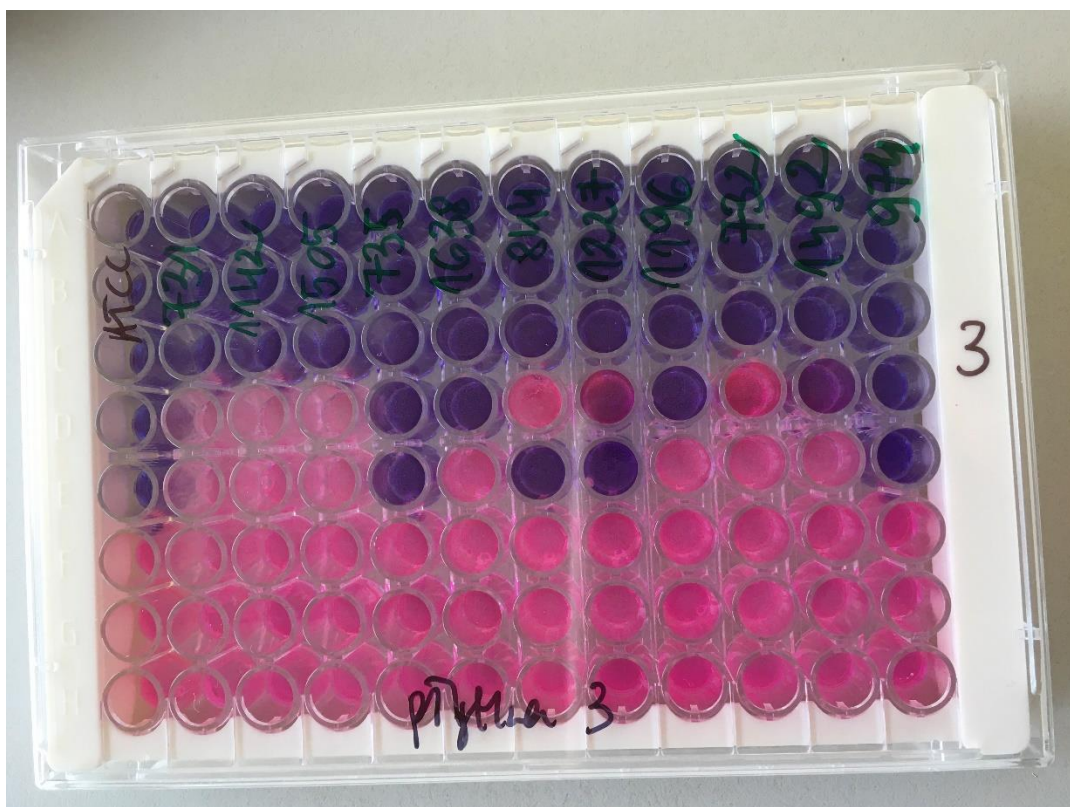
3.1.3.1.3 Określenie wartości MIC dla kolistyny z użyciem testu mikrorozcieńczeń MIC stripy/ stripped plates

Oznaczenie wartości MIC dla kolistyny zostało przeprowadzone przy użyciu testu mikrorozcieńczeń MIC stripy/ stripped plates (DIAGNOSTICS s.r.o., Słowenia). Test składa się z paska z 7 rozcieńczeniami antybiotyku (0,25-16 mg/l) oraz dołka kontroli

wzrostu drobnoustrojów. Hodowla szczepów *E. coli* odbywała się na podłożu stałym - agar odżywczy (Nutrient agar, Oxoid, United Kingdom). Z czystej hodowli pobierano 3-4 kolonie, które zawieszano w soli fizjologicznej do uzyskania gęstości optycznej 0,5 McFerlanda. Następnie przenoszono 60 µl zawiesiny bakteryjnej do płynnego podłoża (suspension media) dołączonego do testu przez producenta. Przy użyciu pipety wielokanałowej przenoszono po 100 µl zawiesiny bakteryjnej do każdego dołka na płytce MIC stripy/stripped plates, po czym inkubowano ją w temp. $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ przez 16-20 godzin. Jako szczep referencyjny został użyty *Escherichia coli* ATCC 25922, zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczenia Lekowrażliwości EUCAST do określania lekowrażliwości pałeczek *Enterobacteriaceae*. Następnie dokonano oceny zmiany zabarwienia studzienek, w porównaniu do mikrostudzienki kontrolnej (K). Za wartość MIC uznaje się pierwszą studzienkę o zabarwieniu fioletowym, czyli innym niż mikrostudzienka kontrolna (K), która jest różowa. Rozkład stężeń antybiotyku na poszczególnym pasku znajduje się na rycinie 5.

 MIC COL v.1.01		Ref. / Lot.:	Dátum: / Date: / Datum:				
Kmeň č.: / Strain no.: / Kmen č.: / Törzs sz.:		Sprac.: / Processed by: / Zprac.: / Feldolgozott:	Poznámky: / Notes: / Megjegyzések:				
Rozloženie ATB / ATB dilution layout [mg/l]							
16 ○	8 ○	4 ○	2 ○	1 ○	0,5 ○	0,25 ○	Kontrola rastu / Grow control ●
Hodnota MIC / MIC value:							
<small>DIAGNOSTICS s.r.o., Hodská 68, Galanta, 924 01, SR www.diagnostics.sk info@diagnostics.sk</small>							

Rycina 5. Rozkład stężeń kolistyny na pasku MIC stripy/stripped plate



Rycina 6. Płytki MIC stripy/stripped plate z hodowlą bakteryjną po inkubacji, gotowa do odczytu

3.1.3.2 Ocena prewalencji wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki

Wszystkie szczepy *E. coli* zostały zbadane na obecność występowania wybranych genów oporności na chemioterapeutyki. Do tego celu przeprowadzono reakcje simplex- i multiplex-PCR (Song i wsp., 2020, Domniguez i wsp., 2018, Türkyılmaz i wsp., 2009). W tabeli 3 przedstawiono wykaz wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki.

Tabela 3. Wybrane geny oporności na chemioterapeutyki wg. Song, 2019¹; Domniguez, 2018²; Türkyılmaz 2009³; Rebelo, 2018⁴

Grupy antybiotyków i chemioterapeutyków	Badane geny
Betalaktamy	<i>blaCTX-M, blaSHV, blaTEM</i> ¹
Fluorochinolony	<i>qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, qepA, acc(6')-Ib-cr</i> ²
Amfenikole	<i>cat1, cat2, cat3</i> ³
Tetracykliny	<i>tetA, tetB, tetC, tetD</i> ¹
Sulfonamidy	<i>sul1, sul2, sul3</i> ¹
Polimyksyny	<i>mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5</i> ⁴

Do reakcji wykorzystano materiał genetyczny *E. coli* opisany w podrozdziale 3.1.3.2.1

Startery użyte do reakcji, wraz z ich sekwencjami, temperaturą przyłączania i wielkością uzyskiwanych produktów przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Nazwy starterów, ich sekwencje, wielkość produktów oraz temperatury przyłączania starterów użytych do amplifikacji wybranych genów oporności na chemioterapeutyki

Gen	Sekwencje oligonukleotydów	Produkt PCR [pz]	Temperatura przyłączania [°C]
<i>blaCTX-M</i>	F-AGTGAAAGCGAACCGAATC R-CTGTCACCAATGCTTTACC	365	55
<i>blaSHV</i>	F-ATGCGTATATTCGCCTGTG R-CCTCATTCAGTTCGGTTTCC	502	55
<i>blaTEM</i>	F-CAGAAACGCTGGTGAAAGTA R-ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	719	55
<i>qnrA</i>	F-AGAGGATTTCTCACGCCAGG R- TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	54
<i>qnrB</i>	F-GGMATHGAAAATCGCCACTG R- TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	264	54
<i>qnrC</i>	F-GGGTTGTACATTTATTGAATCG R-CACCTACCCATTTATTTCA	330	50

<i>qnrD</i>	F-CGAGATCAATTTACGGGGAATA R-AACAAGCTGAAGCGCCTG	582	50
<i>qnrS</i>	F-GCAAGTTCATTGAACAGGGT R-TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	54
<i>qepA</i>	F-ACATCTACGGCTTCTTCGTCTG R-AACTGCTTGAGCCCGTAGATC	501	50
<i>acc (6')- Ib-cr</i>	F-CGATCTCATATCGTCGAGTGTT R-TTAGGCATCACTGCGTGTTTC	447	50
<i>cat1</i>	F- CCTATAACCAGACCGTTCAG R- TCACAGACGGCATGATGAAC	491	56
<i>cat2</i>	F- CCGGATTGACCTGAATACCT R- TCACATACTGCATGATGAAC	456	56
<i>cat3</i>	F- CCCACAATTCACCGTATTCC R- GAACCTGTACTGAGAGCGGC	310	58
<i>tetA</i>	F-GGCCTCAATTTCTGACG R-AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	372	57
<i>tetB</i>	F-GAGACGCAATCGAATTCGG R-TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC	228	57
<i>tetC</i>	F-CTTGAGAGCCTTCAACCCAG R-ATGGTCGTCTACCTGCC	418	60
<i>tetD</i>	F-GGAATATCTCCCGGAAGCGG R-CACATTGGACAGTGCCAGCAG	187	60
<i>sul1</i>	F-GTGACGGTGTTCGGCATTCT R-TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	779	68
<i>sul2</i>	F-CGGCATCGTCAACATAACCT R-TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	721	66
<i>sul3</i>	F-GAGCAAGATTTTTGGAATCG R-CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	880	51
<i>mcr-1</i>	F- AGTCCGTTTGTCTTGTGGC R- AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	320	58
<i>mcr-2</i>	F- CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT R- TCTAGCCCCGACAAGCATACC	715	58
<i>mcr-3</i>	F- AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG R- AATGGAGATCCCCGTTTTT	929	58
<i>mcr-4</i>	F- TCACTTTCATCACTGCGTTG R- TTGGTCCATGACTACCAATG	1,116	58
<i>mcr-5</i>	F- ATGCGGTTGTCTGCATTTATC R- TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	1,644	58

3.1.3.2.1 Procedura izolacji DNA bakterii Gram ujemnych przez gotowanie

Materiał genetyczny w postaci genomowego DNA poszczególnych szczepów *E. coli* został wyizolowany z 24 godzinnej hodowli szczepów *E. coli* na podłożu stałym – agar odżywczy (Nutrient agar, Oxoid, UK) inkubowanej w temp. 37°C przez 24h. Następnie, w 200µl jałowej wody destylowanej zawieszono po 10 kolonii bakteryjnych i inkubowano w 100°C przez 20 minut. Po upływie tego czasu próbki schładzano w temp. -20°C przez okres 5 minut. Uzyskana zawiesina została poddana wirowaniu o prędkości 13000 rpm przez 3 minuty a powstały supernatant w ilości 180µl przenoszono do jałowych probówek typu eppendorf. Stężenie DNA w otrzymanym produkcie zostało zbadane przy użyciu spektrofotometru (NanoDrop). Uzyskany materiał genetyczny *E. coli* został zabezpieczony i przechowywany w temp. -20°C do dalszych badań

3.1.3.2.2 Reakcje simplex PCR – geny oporności na betalaktamy, fluorochinolony amfenikole tetracykliny oraz sulfonamidy

Reakcja simplex-PCR została przeprowadzona dla wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki: *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM* (betalaktamy), *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* (tetracykliny), *sul1*, *sul2*, *sul3* (sulfonamidy) wg. metodyki opisanej przez Song i wsp. (2020), *qnrC*, *qnrD*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *acc (6')-Ib-cr* (fluorochinolony) wg. Dominguez i wsp. (2018) oraz *cat1*, *cat2*, *cat3* (amfenikole) wg. Türkyılmaz i wsp. (2009).

Mieszanina reakcyjna przygotowana została według poniższego schematu w objętości 25 µl. Do reakcji wykorzystano materiał genetyczny, którego procedura pozyskania poprzez gotowanie została opisana w podrozdziale 3.1.3.2.1

10x Dream Taq™Green Buffer (Thermo Scientific, USA)	2,5 µl
Starter (Forward, Reverse)	po 0,25 µl
dNTP Mix 10mM (Thermo Scientific, USA)	0,5 µl
Taq polymerase DNA DreamTaq™Green (Thermo Scientific, USA)	2 U
Genomowe DNA	2µl
Woda MiliQ	dopełnić do 25 µl

Reakcje simplex - PCR po uprzednich optymalizacjach przeprowadzono w termocyklerze DNA Thermal Cycler T100tm (Bio-Rad, USA) według profilu termiczno-czasowego:

Etap	Temperatura [°C]	Czas
Wstępna denaturacja	95	3 min
Denaturacja	95	30s
Przyłączanie starterów	**	30s
Wydłużanie nici DNA	72	30s
Końcowe wydłużanie	72	5 min

** Informacja na temat temperatury przyłączania danego startera znajduje się w tabeli 4.

3.1.3.2.3 Reakcje multipleks-PCR- geny oporności na kolistynę

Reakcje multipleks-PCR przeprowadzono dla genów oporności na polimyksyny: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* wg. Rebelo (2018).

Mieszanina reakcyjna została przygotowana zgodnie z poniższym schematem w objętości 25µl:

10x Dream Taq™Green Buffer (Thermo Scientific, USA)	2,5 µl
Starter (Forward, Reverse)	po 0,25 µl
dNTP Mix 10mM (Thermo Scientific, USA)	0,5 µl
Taq polymerase DNA DreamTaq™Green (Thermo Scientific, USA)	2 U
Genomowe DNA	2µl
Woda MiliQ	dopełnić do 25 µl

Reakcję multiplex-PCR (*mcr-1+mcr-2+mcr-3+mcr-4+mcr-5*) przeprowadzono w termocyklerze DNA Thermal Cycler T100tm (Bio-Rad, USA) według następującego profilu termiczno-czasowego:

Etap	Temperatura [°C]	Czas
Wstępna denaturacja	95	15 min
Denaturacja	95	30s
Przyłączanie starterów	51	1,5 min
Wydłużanie nici DNA	72	1 min
Końcowe wydłużanie	72	10 min

} 30 cykli

Kontrole dodatnie dla genów *mcr-1*, *mcr-2* stanowiły odpowiednio szczepy *E. coli* KP81 oraz *E. coli* KP37 udostępnione przez Christine Lammens z Uniwersytetu w Antwerpii (Belgia). Dla genów *mcr-3*, *mcr-4* oraz *mcr-5* wykorzystano szczepy *E. coli* SQ352, *E. coli* DH5 α oraz *Salmonella* paratyphi B-SA01718 pozyskane z Laboratorium referencyjnego Unii Europejskiej ds. Oporności Przeciwdrobnoustrojowej w Narodowym Instytucie Żywności Uniwersytetu Technicznego w Danii. Wszystkie szczepy kontrolne były udostępnione do badań naukowych prowadzonych w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych we Wrocławiu.

3.1.3.2.4 Elektroforeza w żelu agarozowym

Produkty uzyskane w reakcji simplex- i multiplex-PCR poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w stałym napięciu elektrycznym w buforze TAE (Thermo Scientific, Litwa), w 2,0% żelu agarozowym. Wizualizację produktów uzyskano dzięki użyciu barwnika Midori Green DNA (Nippon Genetics, Niemcy). GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) został użyty jako marker masy. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w stałym napięciu elektrycznym 110V przez około 60 minut przy użyciu zasilacza PowerPac™ Basic Power Supply (Bio Rad, USA).

Zdjęcia elektroforogramów przeprowadzono z użyciem aparatu Gel-Doc UV Trans Illuminator System (Bio-Rad, USA), a ich analizę przeprowadzono przy użyciu oprogramowanie Quantity One (Bio-Rad, USA). Wszystkie reakcje PCR przeprowadzono w co najmniej dwóch powtórzeniach.

3.1.3.3 Prewalencja wybranych genów zjadliwości

Na podstawie przeglądu literatury określono występowanie poszczególnych genów zjadliwości charakterystycznych dla szczepów *E. coli*. Reakcja multipleks-PCR

potwierdzająca obecność genów zjadliwości została przeprowadzona zgodnie z metodyką Ewers i wsp. (2005). Startery wykorzystane w reakcji, wraz z wielkością produktu zostały przedstawione w tabeli 5.

Tabela 5. Geny zjadliwości, sekwencje starterów i wielkość produktów PCR

Gen	Sekwencje oligonukleotydów (5'-3')	Produkt PCR [pz]
<i>astA</i>	F-TGCCATCAACACAGTATATCC R-TCAGGTCGCGAGTGACGGC	116
<i>Iss</i>	F-ATCACATAGGATTCTGCCG R-CAGCGGAGTATAGATGCCA	309
<i>Irp2</i>	F-AAGGATTTCGCTGTTACCGGAC R-AACTCCTGATACAGGTGGC	413
<i>papC</i>	F-TGATATCACGCAGTCAGTAGC R-CCGGCCATATTCACATAA	501
<i>iucD</i>	F-ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC R-CCTGATCCAGATGATGCTC	714
<i>tsh</i>	F-ACTATTCTCTGCAGGAAGTC R-CTTCCGATGTTCTGAACGT	824
<i>vat</i>	F-TCCTGGGACATAATGGTCAG R-GTGTCAGAACGGAATTGT	981
<i>cva A/B</i> <i>cvi cvaC</i>	F-TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG R-GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	1181

Reakcję multiplex-PCR przeprowadzono w termocyklerze DNA Thermal Cycler T100tm (Bio-Rad, USA) według następującego profilu termiczno-czasowego:

Etap	Temperatura [°C]	Czas
Wstępna denaturacja	95	15 min
Denaturacja	95	30s
Przyłączanie starterów	51	1,5 min
Wydłużanie nici DNA	72	1 min
Końcowe wydłużanie	72	10 min

} 30 cykli

Elektroforeza w żelu agarozowym służąca do rozdzielenia produktów PCR została przeprowadzona zgodnie z opisem w podrozdziale 3.1.3.2.4

3.1.3.4 Ocena zdolności tworzenia biofilmu przez *E. coli*

Szczepki *E. coli* hodowano na 96-dołkowych płytkach titracyjnych (Corning Inc., USA), które następnie barwiono fioletem krystalicznym zgodnie z metodyką Stepanović i wsp. (2004). Barwnik ten łączy się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami biofilmu, takimi jak: kwasy nukleinowe i kwaśne polisacharydy, dzięki czemu możliwe staje się określenie ilości powstałego biofilmu (Burmøle i wsp. 2006). Metodyka badania, wraz z modyfikacjami zakresu temperatur i czasu inkubacji, została przeprowadzona zgodnie z Lamas i wsp. (2016). Eksperyment wykonano w co najmniej dwóch powtórzeniach. Kontrolę ujemną stanowiło podłoże LB (Biocorp, Polska) bez zawiesiny bakteryjnej, a kontrolę dodatnią izolat *E. coli* ATCC 25922.

3.1.3.4.1 Przygotowanie hodowli szczepów *E. coli*

W doświadczeniu wykorzystano podłoże LB (BIOCORP, Polska) na którym przeprowadzono 18 godziną hodowlę szczepów *E. coli*. Do sterylnych 96-dołkowych płytek płaskodennych dodano po 230 µl podłoża LB a następnie do każdego dołka dodano 20 µl hodowli odpowiedniego szczepu *E. coli* (1 McF, pomiar na densytometrze). Test wykonano w pięciu powtórzeniach dla każdego szczepu *E. coli* (1 szczep powtórzono pięciokrotnie w dołkach płytki). Na każdej płytce 5 dołków stanowiło kontrolę ujemną. Płytki zabezpieczono przed parowaniem poprzez umieszczenie ich w zamkniętych pojemnikach plastikowych, wyścielonych zwilżoną, jałową gazą. Przygotowane płytki były inkubowane przez okres 18-24 godzin w temp. 37°C.

3.1.3.4.2 Płukanie płytek i barwienie biofilmu

Po zakończonej inkubacji, hodowle bakteryjne zostały usunięte z płytek poprzez odessanie płynu pipetą wielokanałową, a następnie trzykrotnie przepłukano dołki 300 µl PBS (Fisher BioReagents™, USA). Po osuszeniu dołki zalano 250 µl 0,1% fioletu krystalicznego (Sigma-Aldrich, USA) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie zlano ostrożnie fiolet krystaliczny i ponownie płukano dwukrotnie PBS. Po osuszeniu płytek w suszarce laboratoryjnej, dołki napełniono 250 µl 95% alkoholu etylowego (CHEMPUR, Polska). Do odczytu w spektrofotometrze przeniesiono 200 µl otrzymanego roztworu po barwieniu do nowych płaskodennych 96-dołkowych płytek.

3.1.3.4.3 Pomiar i odczyt OD

Absorbancję mierzono z wykorzystaniem czytnika Spark (TECAN, Szwajcaria) przy długości fali 590 nm.

3.1.3.4.4 Zdolność tworzenia biofilmu

Ocena wartości OD posłużyła do kwalifikacji szczepu do silnie tworzących biofilm, średnio, słabo oraz nie tworzących biofilmu. Wartości pomiarów zestawiono i interpretowano zgodnie z poniższymi wytycznymi:

$OD \leq OD_c$	Szczep nie tworzący biofilmu
$OD_c < OD \leq 2OD_c$	Szczep słabo tworzący biofilm
$2OD_c < OD \leq 4OD_c$	Szczep średnio tworzący biofilm
$4OD_c < OD$	Szczep mocno tworzący biofilm

OD_c - gęstość optyczna kontroli; OD - gęstość optyczna badanej próby

3.1.4 Typizacja wyizolowanych bakterii z rodzaju *Salmonella*, *Erysipelothrix* oraz *Gallibacterium*

Typizację pałeczki *Salmonella* przeprowadzono zgodnie z normą ISO-TR 6579-3 oraz w oparciu o Schemat White'a- Kauffmanna- Le Minora 2007.

- Wybór kolonii do badań potwierdzających

Z dwóch pożywek selektywnych: XLD (Biomaxima, Polska) oraz Chromogenic Salmonella Selective LAB-AGAR (Biomaxima, Polska) pobrano jedną lub kilka podejrzanych kolonii (do 5), które następnie przesiano na agar odżywczy (Argenta, Polska) tak aby uzyskać pojedyncze kolonie. Płytki z agarem odżywczym inkubowano w temp. 34°C-38°C przez 24h ± 3h.

- Testy biochemiczne

Następnie przeprowadzono testy biochemiczne potwierdzające przynależność badanych bakterii do gatunku *Salmonella*. Testy biochemiczne obejmowały: pożywka TSI, pożywka do dekarboksylacji L-lizyny, pożywka z mocznikiem (Biomaxima, Polska). Inkubację ww. pożywek przeprowadzono w temp. 34°C-38°C przez 24h ± 3h. Po zakończeniu inkubacji przeprowadzono interpretację wyników.

- Serologiczna typizacja *Salmonella*

Po wykluczeniu szczepów autoaglutynujących, z użyciem testu aglutynacji szkiełkowej z 3% roztworem NaCl, dokonano potwierdzeń serologicznych wg Schematu Whiet'a-Kauffmana-Le Minora. Najnowsze wytyczne dotyczące serotypizacji pałeczek

Salmonella zawarte są w przewodniku do serotypizacji- ISO/TR 6579-3, Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella- Part 3. W celu potwierdzenia przynależności pałeczek *Salmonella* do danego serowaru przeprowadzono aglutynację z poliwalentną surowicą HM, następnie z surowicami somatycznymi i rzęskowymi. W przypadku *Salmonella* Typhimurium pozytywny wynik z użyciem surowicy somatycznej O:4, pozwolił na określenie grupy serologicznej, negatywny z kolei wskazywałby na konieczność prowadzenia dalszych badań z surowicami dla antygenów grupowych.

W dalszym toku postępowania identyfikacyjnego, w celu określenia serowaru badanego szczepu użyto surowic zawierających przeciwciała przeciwko antygenom rzęskowym. W tym celu materiał pobrany z czystej kolonii, nie wykazującej właściwości autoaglutynujących (z agaru odżywczego) posiano na podłoże miękkie wg Garda i inkubowano w temp. 34°C-38°C przez 24h ± 3h. Następnie przeprowadzono aglutynację z surowicami rzęskowymi np. H:i oraz H:2 które są dodatnie w przypadku *Salmonella* Typhimurium (tzw. szczep dwufazowy).

Typizację bakterii z rodzaju *Erysipelothrix* przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Takeshi i wsp. (1999). Primery zsyntetyzowano w firmie Genomed S.A., Warszawa. Profil termiczny reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej dobrano eksperymentalnie w oparciu o wytyczne producenta zestawu odczynników do reakcji PCR z firmy Eurx Sp. z o.o. (Gdańsk, Polska). Kontrolę dodatnią (PC) do reakcji Real-Time PCR stanowił szczep referencyjny *Erysipelothrix rhusiopathiae* uzyskany z PIW w Puławach do wcześniejszych badań prowadzonych przez dr K. Bobrek w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych we Wrocławiu.

Primer	Sekwencja
MO101-F	5'-AGATGCCCATAGAAACTGGTA-3'
MO102-R	5'-CTGTATCCGCCATAACTA-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej (50µl):

H2O	22,6 µl
Color OptiTaq PCR Master Mix (2x)	25 µl
MO101-F 100µM	0,2 µl
MO102-R 100µM	0,2 µl
DNA	2 µl

Reakcje PCR przeprowadzono zgodnie z poniższym profilem termicznym:

95°C	03:00 min	
94°C	00:20 min	} x 35
54°C	00:30 min	
72°C	00:30 min	
72°C	03:00 min	
12°C	20:00 min	

Wielkość produktu wynosiła 407 pz.

Wszystkie reakcje zostały przeprowadzone z użyciem termocyklera C1000 Touch z firmy Bio-Rad z dostawką do Real-Time PCR - CFX96 Deep Well. Analizę sygnałów fluorescencyjnych prowadzono w oparciu o oprogramowanie Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2.

Typizację bakterii z rodzaju *Gallibacterium* przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Bojesen i wsp. (2007). Primery oraz sondę zsyntetyzowano w firmie Genomed S.A., Warszawa. Profil termiczny reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej dobrano eksperymentalnie w oparciu o wytyczne producenta zestawu odczynników do reakcji Real-Time PCR z sondą z firmy Eurx Sp. z o.o. (Gdańsk, Polska). Kontrolę dodatnią (PC) do reakcji Real-Time PCR stanowił szczep referencyjny *Gallibacterium anatis* DSM 166844

Pimer	Sekwencja
1133fgal	5'- TATTCTTTGTTACCArCGG -3'
114r	5'- GGTTTCCCCATTCGG -3'

Skład mieszaniny reakcyjnej (50µl):

H ₂ O	22,6 µl
Color Taq PCR MM EurX	25 µl
1133fgal (100µM)	0,2 µl
114r (100µM)	0,2 µl
DNA	2 µl

Reakcje PCR przeprowadzono zgodnie z poniższym profilem cieplnym.

95°C	03:00 min	} x 35
94°C	00:20 min	
55°C	00:50 min	
72°C	01:10 min	
72°C	03:00 min	
12°C	20:00 min	

Wielkość produktu wynosiła 1030-1080 pz.

3.1.4.1 Elektroforeza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR

Procedura elektroforezy w żelu agarozowym została opisana w podrozdziale 3.1.3.2.4

3.2 Określenie poziomu specyficznych przeciwciał anti-GPV

Krew pobraną od gęsi odwirowano przy 3000 x g przez 5 min. Uzyskaną surowicę przenoszono do jałowych probówek typu eppendorf. Do 96 dołkowych płytek opłaszczonych oczyszczonym wirusem GPV (namnożonym uprzednio na hodowli fibroblastów zarodka gęsiego (ang. Goose Embryo Fibroblasts - GEF) dodawano po 100 ul reagentów. Kontrolę dodatnią stanowiła surowica pozyskana od gęsi immunizowanych szczepem GPV. Kontrolę ujemną z kolei, surowica pozyskana od dorosłych gęsi odchowywanych w ściśle izolowanych pomieszczeniach. Koniugatem użytym do reakcji były immunoglobuliny królicze przeciwko immunoglobulinie gęsiej sprzęgnięte z enzymem peroksydazą chrzanową. Rozcieńczenie koniugatu stanowiło proporcję: 1:1000. Badania zostały wykonane w Zakładzie Chorób Drobii w Piwet-PIB Puławy z wykorzystaniem opatentowanego przez zespół Piwet-PIB Puławy, testu immunoenzymatycznego ELISA (nr patentu 183936).

3.2.1 Odczyt i interpretacja wyników

Odczyt OD (gęstości optycznej) odbywał się przy długości fali 405 nm. Za wynik ujemny przyjmowano wartość OD surowicy ≤ 150 , za wynik wątpliwy wartość $150 > OD < 200$, a za wynik dodatni wartość $OD \geq 200$.

3.3 Badania w kierunku zakażeń wirusowych

3.3.1 Izolacja materiału genetycznego

Wirusowe DNA zostało wyizolowane z wymazów kałowych pobieranych od gęsi przyżyciowo i/lub z narządów wewnętrznych (wątroba, śledziona, nerki, serce) pobieranych od ptaków podczas sekcji. Do izolacji wykorzystano zestaw komercyjny Syngen Viral Mini PLUS (Syngen Biotech) i postępowano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Po izolacji jakość oraz ilość wyizolowanego materiału genetycznego była potwierdzana spektrofotometrycznie (Genova Nano, Jenway).

3.3.2 Procedura wykrywania materiału genetycznego parwowirusa gęsi

Identyfikację parwowirusa gęsiego prowadzono metodą Real-Time PCR z sondą typu Taq-Man, w oparciu o metodykę opisaną przez Woźniakowski i wsp. (2012). Primery oraz sondę zsyntetyzowano w firmie Genomed S.A. (Warszawa). Profil termiczny reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej dobrano eksperymentalnie w oparciu o wytyczne producenta zestawu odczynników do reakcji Real-Time PCR z sondą z firmy Eurx Sp. z o.o (Probe qPCR Master Mix (2x), Polska). Kontrolę dodatnią (PC) do reakcji Real-Time PCR – parwowirusa gęsiego stanowił materiał genetyczny wirusa wyizolowany ze szczepionki Pamivax (Merial, obecnie Boehringer Ingeheim).

Primer	Sekwencja
Parwo-WF (WfParvF)	5'-ACCGGAAGTCACGTGAC-3'
Parwo-WR (WfParvR)	5'-GTTCGTTTCGTTTCAACC-3'
Parwo Probe (WfParvPro)	5'-FAM ACCGGAAGCAyGTGACCGGAA TAMRA(Q)-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej (25 μ l):

H ₂ O wolna od nukleaz	8,95 μ l
Probe qPCR Master Mix (2x)	12,5 μ l

Parwo- WF 10 μ M	0,5 μ l
Parwo- WR 10 μ M	0,5 μ l
Parwo Probe 10 μ M	0,3 μ l
UNG Enzyme	0,25 μ l
ssDNA*/PC/NC	2 μ l

*do kaŹdej reakcji PCR dodawano ok. 100 ng DNA lub H₂O wolnego od nukleaz w przypadku NC

Reakcje PCR przeprowadzono zgodnie z poniŹszym profilem cieplnym:

50°C	02:00 min	
95°C	10:00 min	
94°C	00:15 min	} x 40
60°C	01:00 min	

Reakcje zostały przeprowadzone z uŹyciem termocyklera C1000 Touch z firmy Bio-Rad z dostawką do Real-Time PCR - CFX96 Deep Well. Analizę sygnałów fluorescencyjnych prowadzono w oparciu o oprogramowanie Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2.

3.3.3 Procedura wykrywania materiału genetycznego polyomawirusa gęsi

Identyfikację polyomawirusa gęsiego prowadzono metodą PCR w oparciu o metodykę opisaną przez Styś-Fijoł i wsp. (2016). Primery zsyntetyzowano w firmie Genomed S.A. (Warszawa). Profil termiczny reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej dobrano eksperymentalnie w oparciu o wytyczne producenta zestawu odczynników do reakcji PCR z firmy Eurx Sp. z o.o. (Gdańsk, Polska). Kontrolę dodatnią (PC) do reakcji Real-Time PCR – polyomawirusa gęsiego uzyskano z Laboratorium Weterynaryjnego Agro-Vet we Wrocławiu, stanowił ją izolat pochodzący z pozytywnego przypadku klinicznego, potwierdzonego sekwencjonowaniem.

Primer	Sekwencja
POLVP1-F	(5'-ACC CGT GCT TCC ATT CAC AA-3')
POLVP1-R	(5'-CTG CTC CCC AAA CCT GTC AA-3')

Mieszanki reakcyjne przygotowano w objętości 50 µl w odpowiednich proporcjach:

H ₂ O	22,6 µl
Color Taq PCR Master Mix (2x)	25 µl
POLVP1-F 100µM	0,2 µl
POLVP1-R 100µM	0,2 µl
Ss DNA*/PC/NC	2 µl

*do każdej reakcji PCR dodawano ok. 100 ng DNA lub H₂O wolnego od nukleaz w przypadku NC

Reakcje PCR przeprowadzono zgodnie z poniższym profilem cieplnym:

95°C	03:00 min	} x 38
94°C	00:20 min	
62°C	00:30 min	
72°C	00:20 min	
72°C	03:00 min	
12°C	10:00 min	

Wielkość produktu wynosiła 379 pz. Reakcje przeprowadzono w cyklerze T100 Thermal Cycler z firmy Bio-Rad.

3.3.4 Procedura wykrywania materiału genetycznego cirkowirusa gęsi

Identyfikację cirkowirusa gęsiego prowadzono metodą PCR w oparciu o metodykę opisaną przez Ball i wsp. (2004 r). Primery zsyntetyzowano w firmie Genomed S.A., Warszawa. Profil termiczny reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej dobrano eksperymentalnie w oparciu o wytyczne producenta zestawu odczynników do reakcji PCR z firmy Eurx Sp. z o.o. (Gdańsk, Polska). Kontrolę dodatnią (PC) do reakcji Real-Time PCR – cirkowirusa gęsiego uzyskano z Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych we Wrocławiu, stanowił ją izolat cirkowirusa gęsiego z pozytywnego przypadku klinicznego, potwierdzonego sekwencjonowaniem.

Primer	Sekwencja
GOCVP1-F	5'-TAAATGCGAGTTTGATGTGTCT 3'
GOCVP2-R	5'-CATTTAACCCCTTCCAAAGAGT 3'

Mieszanki reakcyjne przygotowano w ilości 50 µl, w odpowiednich proporcjach:

H ₂ O	22,6 µl
Color Taq PCR Master Mix (2x)	25µl
GOCVP1-F 100µM	0,2 µl
GOCVP2-R 100µM	0,2 µl
ssDNA*/PC/NC	2 µl

*do każdej reakcji PCR dodawano ok. 100ng DNA lub H₂O wolnego od nukleaz w przypadku NC

Reakcje PCR przeprowadzono zgodnie z poniższym profilem cieplnym:

95°C	03:00 min	
94°C	00:20 min	
60°C	00:30 min	
72°C	01:00 min	} x 38
72°C	03:00 min	
12°C	20:00 min	

Wielkość produktu wyniosła 565 pz. Reakcje przeprowadzono w cyklerze T100 Thermal Cycler z firmy Bio-Rad.

3.3.5 Elektroforeza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR

3.3.5.1. Przygotowanie 2% żeli agarozowych

Składniki żelu:

- Woda dejonizowana – 98 ml
- Agaroz – 2 g (Prona Agarose, Bio Standard, Abo, Gdańsk)
- 50 x TAE – 2 ml (Eurx, Gdańsk)
- Midori Green Advance DNA Stain - 3µl (Nippon Genetics, Niemcy)
- Midori Green Extra - 3µl (Nippon Genetics, MG10) – tylko dla prób przygotowywanych do sekwencjonowania, w celu ich wizualizacji w świetle niebieskim

Do przygotowanej naważki agarozy, dodawano odmierzone objętości wody dejonizowanej oraz buforu 50 x TAE. Całość podgrzewano w kuchence mikrofalowej do całkowitego rozpuszczenia agarozy. Po przestygnięciu dodawano barwnik Midori Green. Do przygotowania żeli korzystano z systemu do wylewania żeli z firmy Bio-Rad (Sub-Cell GT Gel Caster)

3.3.5.2 Przeprowadzanie elektroforezy agarozowej produktów reakcji PCR

Rozdział elektroforetyczny odbywał się w stałym napięciu 100V przez 40 minut przy użyciu zestawu do elektroforezy poziomej z firmy Bio-Rad (Sub-Cell GT). Prążki zostały zwizualizowane z użyciem zestawu do wizualizacji Gel-Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad, USA). Elektroforogramy analizowano przy użyciu oprogramowania Image Lab (Bio-Rad, USA). Wielkości uzyskanych produktów PCR porównywano do markera masy – Perfect 100bp DNA Ladder (Eurx, Gdańsk).

3.3.6 Przygotowanie produktów do sekwencjonowania

Do reakcji wykorzystano matrycowe DNA uzyskane z wymazów i/lub narządów. Wszystkie reakcje przeprowadzono w cyklerze T100 Thermal Cycler z firmy Bio-Rad (USA). Do reakcji PCR wykorzystano polimerazę o wysokiej wierności amplifikacji: One-Phusion high-speed-fidelity DNA polymerase z firmy Gene-On (Niemcy).

Mieszanki reakcyjne przygotowano w objętości 50 µl zgodnie z poniższymi schematami:

a) Parwovirus gęsi:

Do reakcji sekwencjonowania wykorzystano primery zaprojektowane w oparciu o metodykę Bian i wsp. (2019). Primery zsyntetyzowano w firmie Genomed S.A. z Warszawy. Warunki reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej dobrano eksperymentalnie.

Primer	Sekwencja	Wielkość produktu PCR [pz]
P5nF	5'-TTG CGA TTC CCA ATG GAT G 3-'	1171
P5nR	5'-CCCAAATAGGTCCCTGTAGATA - 3'	

Mieszanki reakcyjne przygotowano w ilości 50 µl, w odpowiednich proporcjach:

H ₂ O	23,6 µl
2,5x UNI Buffer	20 µl
10mM dNTPS	1 µl
P5nF 100µM	0,2 µl
P5nR 100µM	0,2 µl
One-Phusion DNA Polymerase (2U/µl)	1 µl
DNA*/PC/NC	2 µl

*do każdej reakcji PCR dodawano ok. 100ng DNA

Reakcję PCR przeprowadzano zgodnie z poniższym profilem cieplnym:

98°C	03.00 min	} x 39
98°C	00:10 min	
61°C	00:20 min	
72°C	01:00 min	
72°C	05:00 min	
12°C	10:00 min	

b) Cirkowirus gęsi:

Do reakcji sekwencjonowania wykorzystano 3 pary primerów. Pary primerów I i III zaprojektowanych w oparciu o dostępne w bazie GenBank sekwencje genomowe znanych cirkowirusów gęsich oraz parę primerów nr II, zaprojektowanych w oparciu o metodykę opisaną przez Ball i wsp. (2004 r.) - procedura 3.1.4. Primery zsyntetyzowano w firmie Genomed S.A. (Warszawa). Warunki reakcji oraz skład mieszanin reakcyjnych dobrano eksperymentalnie.

Primer zestaw I	Sekwencja	Wielkość produktu [pz]
F1GOCVFor	(5'- CGT CCG ATG TGT AGC CTT CGT-3')	1100
F1GOCVRev	(5'-CAT AAA CTC GGG GGC GGG TG-3')	
Primer zestaw II	Sekwencja	Wielkość produktu [pz]
GOCVP1-F	5'-TAAATGCGAGTTTGATGTGTCT 3'	565
GOCVP1-R	5' -CATTTAACCCCTTCCAAAGAGT 3'	
Primer zestaw III	Sekwencja	Wielkość produktu [pz]
F3GOCVFor	(5'- GCC CAG TCC ATT GTC CGA ATC-3')	750
F3GOCVRev	(5'-GCC CAT CAT GCC GCT GTA TCG-3')	

Mieszanki reakcyjne przygotowano w ilości 50 μ l, w odpowiednich proporcjach:

H ₂ O			23,6 μ l
2,5x UNI Buffer			20 μ l
10mM dNTPS			1 μ l
<i>MIX I</i>	<i>MIX II</i>	<i>MIX III</i>	
F1GOCVFor 100 μ M	GOCVP1-F 100 μ M	F3GOCVFor 100 μ M	0,2 μ l
F1GOCVRev 100 μ M	GOCVP1-R 100 μ M	F3GOCVRev 100 μ M	0,2 μ l
One-Phusion DNA Polymerase (2U/ μ l)			1 μ l
DNA*/PC/NC			2 μ l

*do każdej reakcji PCR dodawano ok. 100ng DNA lub H₂O wolnego od nukleaz w przypadku NC

Reakcję PCR przeprowadzano zgodnie z poniższym profilem cieplnym:

Profil 1 (Primery I)		Profil 2 (Primery II)		Profil 3 (Primery III)	
98°C	03:00 min	98°C	03:00 min	98°C	03:00 min
98°C	00:10 min	98°C	00:10 min	98°C	00:10 min
57°C	00:20 min	60°C	00:20 min	57°C	00:20 min
72°C	01:00 min	72°C	00:32 min	72°C	01:00 min
72°C	05:00 min	72°C	05:00 min	72°C	05:00 min
12°C	10:00 min	12°C	10:00 min	12°C	10:00 min

Note: The three middle rows of each profile are grouped together with a bracket and labeled '39x'.

Do uzyskanych w reakcji PCR produktów, dodawano roztwór obciążnika roztworu 6x loading buffer blue (Eurx, Gdańsk) w ilości 5 μ l, na 50 μ l produktu PCR. Całość umieszczano w studzienkach żelu agarozowego, prowadzono rozdział elektroforetyczny (procedury 3.1.5.1 i 3.1.5.2), a następnie produkty wizualizowano w świetle niebieskim

(transilluminator safeView-Mini2, Cleaver Scientific) i wycinano z żelu za pomocą skalpela. Tak przygotowany produkt oczyszczano komercyjnym zestawem do oczyszczania produktów PCR z żelu – GeneClean Kit (MP Biomedicals, USA), zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Jakość i stężenie oczyszczonego produktu PCR potwierdzano elektroforetycznie. W tym celu do oczyszczonego produktu PCR w ilości 4 µl dodawano 2 µl obciążnika 6x loading buffer i rozdzielano względem 4 µl markera mas.

Produkty PCR wysyłano do sekwencjonowania do firmy Genomed S.A., (Warszawa). Każdy produkt poddawano sekwencjonowaniu metodą Sangera w obu kierunkach (5' – 3' i 3' – 5').

3.3.7 Sekwencjonowanie - opracowanie wyników

Otrzymane chromatogramy sprawdzano za pomocą programu Finch. W programie MEGA7 opracowywano wspólny kontig dla sekwencji otrzymanych w wyniku sekwencjonowania z 2 stron. Sekwencje porównywano do sekwencji zdeponowanych w bazie danych GenBank za pomocą programu Blast (NCBI).

Analizę filogenetyczną przeprowadzono w programie MEGA7. Aligment przeprowadzono za pomocą algorytmu ClustalW, a analizę filogenetyczną sekwencji metodą najbliższego sąsiada (N-J- neighbour-joining) z wartością bootstrap wynoszącą 1000.

Uzyskane sekwencje zdeponowano w bazie GenBank, pod numerami GPV: OK085819.1, OK085812.1, OK085818.1, OK085811.1, OK085817.1, OK085813.1, OK085815.1, OK085822.1, OK085820.1, OK085816.1, OK085823.1, OK085814.1, OK085821.1 oraz GoCV: OK070800.1, OK070801.1, OK070802.1, OK070807.1, OK070803.1, OK070804.1, OK070810.1, OK070811.1, OK070805.1, OK070808.1, OK070809.1, OK070806.1.

4. Wyniki

4.1 Wyniki badań w kierunku zakażeń bakteryjnych i grzybiczych

Uzyskane wyniki badań bakteriologicznych i mikologicznych przedstawiono w tabelach nr 6,8 i 9.

Tabela 6. Izolaty bakteryjne i grzybicze uzyskane w latach 2019/2020 z materiału pobranego od gęsi

Rok	Sezon	Izolaty drobnoustrojów				
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Gallibacterium anatis</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
2019	I	14	0	1	0	3
	II	9	0	0	0	4
2020	I	8	0	0	0	2
	II	12	2	1	1	1
Razem		43	2	2	1	10

4.2 Wyniki badań w kierunku zakażeń bakteryjnych

Z pobranego materiału pochodzącego od gęsi ze wszystkich stad, zarówno w 2019 jak i w 2020 roku, w obu sezonach odchowu, najczęściej izolowano pałeczki *E. coli*. Praktycznie z każdego stada, drobnoustroje te izolowano zarówno od piskląt jednodniowych jak i od ptaków starszych w okresie odchowu. Nierzadko, w stadach, w których potwierdzono kliniczną postać kolibakteriozy, diagnozowano także zakażenia wirusowe GPV, GoCV lub GHPV a także mieszane zakażenia wirusowe np. GPV+GoCV+GHPV, GPV+GHPV, GPV+GoCV. Łącznie potwierdzono obecność *E. coli* w 43 przypadkach (tabela 8 i 9). Izolaty *E. coli* poddano dalszym badaniom.

Ponadto, w 2020 roku potwierdzono dwukrotnie obecność włoskowca różycy - *Erysipelothrix rhusiopathiae* w badanym materiale pochodzącym od gęsi wstawionych w II sezonie, co stanowiło 14,28% wszystkich badanych stad w tym roku. Obecność *E. rhusiopathiae* potwierdzono w stadzie 91 dniowych gęsi (hodowca B) oraz gęsi 126 dniowych (hodowca C) (tabela 9). W przypadku różycy u gęsi, w badanych stadach również obserwowano zwiększone upadki oraz charakterystyczne zmiany anatomopatologiczne.

Z kolei *Gallibacterium anatis* wyizolowano jednokrotnie w 2019 roku w I sezonie (Hodowca A) od 35-dniowych gęsi, co stanowiło 7,69% badanych stad i również

jednokrotnie w 2020 roku (hodowca B), tym razem od 91- dniowych ptaków, w II sezonie, co stanowiło 7,14% badanych stad (tabela 8 i 9).

Wzrost pałeczek *Salmonella* Typhimurium potwierdzono tylko w 2020 roku, w stadzie gęsi wstawionych w II sezonie odchowu (hodowca I) co stanowiło 7,14% badanych stad (tabela 9). Stado to wykazywało problemy zdrowotne związane z zaburzeniami lokomotorycznymi oraz okresową biegunką.

Każdorazowo, w przypadku objawów klinicznych oraz zwiększonych upadków, podejmowano terapię poprzedzoną badaniami laboratoryjnymi, izolacją drobnoustrojów oraz określeniem ich wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki. Leczenie ptaków odbywało się zgodnie z oznaczoną lekowrażliwością danego szczepu (antybiogramem).

Tabela 7. Wyniki wrażliwości szczepów *E. rhusiopathiae*, *G. anatis* oraz *S. Typhimurium* na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki

Antybiotyk/chemioterapeutyk	Drobnoustrój				
	<i>E. rhusiopathiae</i>		<i>G. anatis</i>		<i>S. Typhimurium</i>
	Hodowca C, sezon II 2020	Hodowca B, sezon II 2020	Hodowca A, sezon I 2019	Hodowca B, sezon II 2020	Hodowca I, sezon II 2020
Amoksycylina (20 µg)	S	S	S	S	I
Amoksiklav (30 µg)	S	S	S	S	S
Doksycylina (30 µg)	S	S	S	R	S
Oksytetracyklina (30 µg)	R	S	S	S	S
Enrofloksacyna (5 µg)	R	S	S	R	R
Flumechina (30 µg)	R	S	S	R	R
Norfloksacyna (10 µg)	R	S	S	S	-
Linco-Spectin (109 µg)	S	S	S	S	-
Neomycyna (30 µg)	S	R	S	S	S
Spektynomycyna (100 µg)	R	S	S	R	-
Florfenikol (30 µg)	S	S	S	S	S
Kolistyna (10 µg)	S	R	S	S	S
Tylmikozyzna (15 µg)	S	S	R	R	-
Tylozyna (30 µg)	S	S	R	S	-
Trimetoprim/sulfametoksazol (25 µg)	S	S	S	R	-

Badany szczep *E. rhusiopathiae* pochodzący od gęsi hodowcy C (sezon II, 2020 r.) był wrażliwy na amoksycylinę, amoksiklav, doksycylinę, linco-spectin, neomycynę, florfenikol, kolistynę, tylmikozyne, tylozynę oraz trimetoprim/sulfametoksazol. Z kolei, oporność potwierdzono na oksytetracyklinę, enrofloksacynę, flumechinę, norfloksacynę, spektynomycynę. Szczep *E. rhusiopathiae* pochodzący ze stad od hodowcy B (sezon II,

2020 r.) był wrażliwy na wszystkie badane antybiotyki/chemioterapeutyki z wyjątkiem neomycyny oraz kolistyny, na które był oporny.

W przypadku szczepu *G. anatis* pochodzącego ze stada od hodowcy A (sezon I, 2019 r.), potwierdzono jego wrażliwość wszystkie badane chemioterapeutyki z wyjątkiem tylmikozyiny i tylozyny. Izolat *G. anatis* pozyskany ze stada od hodowcy B (sezon II, 2020 r.) wykazywał wrażliwość na amoksycylinę, amoksiklaw, oksytetracyklinę, norfloksacynę, linko-spectin, neomycynę, florfenikol, kolistynę oraz tylozynę. Oporność z kolei, została potwierdzona na doksycylinę, enrofloksacynę, flumechinę, spektynomycynę, tylmikozyinę oraz trimetoprim/sulfametoksazol.

Wyizolowany szczep *S. Typhimurium* wykazywał wrażliwość na amoksiklaw, doksycylinę, oksytetracyklinę, neomycynę, florfenikol i kolistynę. Średnią wrażliwość potwierdzono w stosunku do amoksycyliny. Oporność natomiast, występowała na enrofloksacynę oraz flumechinę.

Tabela 8. Wyniki badań bakteriologicznych, mikologicznych oraz w kierunku zakażeń wirusowych, stad gęsi przebadanych w 2019 roku w I i II sezonie

Sezon	ZWD	Hodowca	Izolaty bakteryjne/grzybicze				Wyniki badań w kierunku zakażeń wirusowych						
			Wiek ptaków (dni)	wynik	Nr szczepu	<i>Aspergillus spp.</i>	Wiek ptaków (dni)	GPV	sekw.	GoCV	sekw.	GHPV	Nr matrycy/tkanki do PCR
I	X	A	3	<i>E.coli</i>	A01	-	35	+	+	-	-	+	M/18/2019
			35	<i>E.coli, G. anatis</i>	A04	-	70	+	-	+	+	+	M/23/2019
	X	B	2	<i>E.coli</i>	A07	+	56	+	+	+	-	+	M/4/2019
			35	<i>E.coli</i>	A06	-	105	+	-	-	-	-	M/19/2019
			84	<i>E.coli</i>	A08	-							
	X	C	28	<i>E. coli</i>	A12	-	56	+	-	-	-	+	M/6/2019
							28	+	-	-	-	+	M/8/20219
	Y	D	2	<i>E.coli</i>	A13	+	21	+	-	-	-	-	M/5/2019
			42	<i>E.coli</i>	A14	-	91	+	+	-	-	+	M/20/2019
	X	E	1	<i>E.coli</i>	A17	+	63	+	+	+	+	+	M/10/19
			35	<i>E.coli</i>	A18	-							
	X	F	10	<i>E. coli</i>	A21	-	56	+	-	-	-	-	M/7/2019
			28	<i>E.coli</i>	A19	-	98	+	+	-	-	+	M/14/19
	Z	G	1	<i>E.coli</i>	A23	-	15	+	-	-	-	-	M/13/2019
35			<i>E.coli</i>	A15	-	35	+	-	+	+	-	M/3/19	
II	X	A	1	<i>E.coli</i>	A03	+	63	+	-	-	-	+	M/9/2019
			56	<i>E.coli</i>	A02	-							
			91	<i>E.coli</i>	A05	-							
	X	B	1	<i>E.coli</i>	A09	+	49	+	-	+	+	-	M/1/2019
	X	C	14	<i>E. coli</i>	A11	+	98	+	-	+	+	-	M/15/2019
			42	<i>E.coli</i>	A10	-	112	+	+	+	-	+	M/22/2019
	X	E	1	<i>E.coli</i>	A16	+	14	+	-	-	-	+	M/25/2019
							98	+	-	-	-	-	M/2/19
	X	F	9	<i>E.coli</i>	A20	-	105	+	-	-	-	+	M/21/2019
							98	+	+	-	-	+	M/24/2019
Z	G	14	<i>E.coli</i>	A22	-	77	+	+	-	-	-	M/11/19	

Tabela 9. Wyniki badań bakteriologicznych, mikologicznych oraz w kierunku zakażeń wirusowych, stad gęsi przebadanych w 2020 roku w I i II sezonie

Sezon	ZWD	Hodowca	Izolaty bakteryjne/grzybicze				Wyniki badań w kierunku zakażeń wirusowych						
			Wiek ptaków (dni)	Wynik	Nr szczepu <i>E. coli</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	Wiek ptaków (dni)	GPV	sekw.	GoCV	sekw.	GHPV	Nr matrycy/tkanki do PCR
I	X	A	14	<i>E. coli</i>	B01	+	98	+	-	+	+	-	M/4/2020
	Y	B	5	<i>E. coli</i>	B04	-	21	+	+	-	-	-	M/18/2020
			105	<i>E. coli</i>	B06	-	35	+	-	-	-	+	M/19/2020
	X	C	63	<i>E. coli</i>	B08	-	35	+	-	-	-	-	M/5/2020
							105	+	-	-	-	-	M/20/2020
	Y	D	2	pojedyncza <i>E. coli</i>	-	+	21	+	-	-	-	-	M/17/2020
			28	<i>E. coli</i>	B11	-	84	+	-	-	-	-	M/14/2020
	X	E	1	pojedyncza <i>E. coli</i>	-	-	35	+	-	-	-	-	M/16/2020
	Y	H	1	<i>E. coli</i>	B15	-	28	+	+	-	-	-	M/10/2020
			28	<i>E. coli</i>	B14	-	91	+	-	-	-	-	M/12/2020
Y	I	63	<i>E. coli</i>	B16	-	56	+	-	-	-	-	M3/2020	
II	X	A	1	<i>E. coli</i>	B02	+	63	+	-	+	+	+	M/13/2020
			98				98	+	-	+	+	-	M/7/2020
			63	<i>E. coli</i>	B03	-	112	+	-	-	-	-	M/11/2020
	Y	B	49	<i>E. coli</i>	B05	-	42	+	-	-	-	+	M/15/2020
			91	<i>E. coli, E. rhusiopathiae, G. anatis</i>	B20	-							
	X	C	21	<i>E. coli</i>	B10	-	21	+	+	-	-	+	M/2/2020
			35				35	+	+	+	+	+	M/1/2020
			126	<i>E. coli, E. rhusiopathiae</i>	B09	-	126	+	-	-	-	-	M/23/2020
	Y	D	3	<i>E. coli</i>	B12	-	63	+	-	+	+	-	M/9/2020
			63	<i>E. coli</i>	B13	-	119	+	-	-	-	+	M/22/2020
	Y	E	42	<i>E. coli</i>	B07	-	49	+	+	+	+	-	M/24/2020
	Y	H	14	<i>E. coli</i>	B18	-	21	+	-	+	+	-	M/8/2020
			56	<i>E. coli</i>	B19	-							
Y	I	28	<i>E. coli, S. Typhimurium</i>	B17	-	28	+	-	-	-	+	M/6/2020	

4.3 Wyniki badań w kierunku zakażeń grzybiczych

Wyniki w kierunku zakażeń grzybiczych zostały przedstawione w tabeli 6, 8 i 9.

Zakażenia grzybicze nie stanowiły celu powyższej pracy, jednak z uwagi na ich częste występowanie w stadach drobiu wodnego, a zwłaszcza piskląt w pierwszych etapach odchowu, zostały ujęte w trakcie badań oraz omawiania wyników.

W roku 2019 w I sezonie wstawienia ptaków, potwierdzono obecność *Aspergillus fumigatus* w płucach piskląt gęsi pochodzących z 3 stad (tj. 23,07%) (Hodowca B, E - ZWD X, Hodowca D - ZWD Y). W sezonie drugim z kolei potwierdzono obecność grzybów *A. fumigatus* w materiale pochodzącym z 4 stad gęsi (Hodowca A, B, C, E - ZWD X), co stanowiło 30,77% badanych stad.

W roku 2020 dodatni wynik badania mikologicznego uzyskały 2 stada (Hodowca A - ZWD X, Hodowca D - ZWD Y) w I sezonie (tj. 14,29%) i tylko 1 stado w II sezonie (Hodowca A - ZWD X) (tj. 7,14%). We wszystkich dodatnich stadach obserwowano nieco zwiększone upadki na wczesnych etapach odchowu piskląt. Zastosowano niezbędne leczenie tj. siarczan miedzi, jodek potasu, preparaty ziołowe udrażniające drogi oddechowe do picia oraz w inhalacji a także enilkonazol stosowany w formie aerozolu.

4.4 Określenie wartości MIC dla szczepów *E. coli*

Oceny lekowrażliwości badanych szczepów *E. coli* dokonano na podstawie wyznaczonych minimalnych stężeń hamujących (MIC). W badaniach zastosowano komercyjne zestawy do oznaczeń granicznych wartości MIC, zawierające szeroki zakres mikrorozcieńczeń wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków, stosowanych w leczeniu drobiu oraz ptaków ozdobnych. Badane szczepy *E. coli* klasyfikowano zgodnie z wytycznymi EUCAST jako wrażliwe (ang. susceptible, S) lub odporne (ang. resistant, R) na dany antybiotyk/chemioterapeutyk. Natomiast zgodnie z CLSI szczepy oznaczano jako wrażliwe, średniowrażliwe (ang. intermediate, I) lub odporne. Wykorzystane do interpretacji wartości graniczne minimalnych stężeń hamujących wybranych związków, zostały zebrane w tabeli 2 w podrozdziale 3.1.3.1.2.

W zależności od dostępności wartości granicznych w rekomendacjach EUCAST lub CLSI, dokonano interpretacji otrzymanych wyników MIC. Dla części antybiotyków i chemioterapeutyków nie wyznaczono wartości granicznej ze względu na brak wytycznych dotyczących lekooporności dla gatunku *Enterobacteriaceae* (w tym *E. coli*)

zarówno w wytycznych EUCAST jak i CLSI. W konsekwencji, dla takich preparatów przeciwdrobnoustrojowych jak: neomycyna, streptomycyna, spektynomycyna, penicylina, erytromycyna, tylozyna oraz klindamycyna wyznaczono graniczną wartości MIC, jednak nie określono czy szczepy są wrażliwe, średniowrażliwe czy odporne na powyższe chemioterapeutyki.

4.4.1 Odczyt i interpretacja wyników oznaczenia granicznych wartości MIC wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków dla izolatów *E. coli* otrzymanych w 2019 roku

Otrzymane wartości MIC dla szczepów *E. coli* zostały zebrane w tabeli 10. Ponadto na rycinie 7 został przedstawiony udział procentowy szczepów *E. coli* wrażliwych, średniowrażliwych i opornych na działanie danego antybiotyku/chemioterapeutyku.

Wszystkie szczepy *E. coli* wyizolowane od gęsi w roku 2019 (n=23) wykazały wrażliwość na gentamycynę oraz ceftiofur (100%). Natomiast wysoki odsetek izolatów wykazywało oporność na amoksycylinę (78,26%), a także na sulfonamidy: sulfadimetoksyna (73,91%), sulfametoksazol i trimetoprim (52,17%) oraz sulfatiazol (52,17%). W przypadku tetracyklin, odsetek szczepów *E. coli* opornych na tetracyklinę wynosił 56,52%, a w przypadku oksytetracykliny 52,17%. Odsetek izolatów opornych na enrofloksacynę oraz florfenikol wynosił odpowiednio: 34,78% i 13,04%. Tylko 1 szczep (4,35%) był oporny na kolistynę.

Szczepy średniowrażliwe na enrofloksacynę wykazywały wartość MIC równą 2 µg/ml (13,04%) oraz 1 µg/ml (17,39%), z kolei wrażliwe: <0,12 µg/ml (4,35%), 0,12 µg/ml (8,69%) 0,25 µg/ml (4,35%) oraz 0,5 µg/ml (17,39%). W przypadku szczepów opornych wartość MIC przekraczała 2 µg/ml (34,78%).

Zdecydowana większość szczepów była wrażliwa lub średniowrażliwa na florfenikol, a stężenia: 2 µg/ml (4,35%), 4 µg/ml (60,87%) oraz 8 µg/ml (21,74%) hamowały ich wzrost. Trzy izolaty (13,04%), które wykazywały oporność, wzrastały na podłożu przy stężeniu antybiotyku przekraczającym 8 µg/ml.

Wartości MIC dla gentamycyny wynosiły <0,5µg/ml (21,74%), 0,5µg/ml (34,78%), 1µg/ml (39,13%) oraz 2 µg/ml (4,35%).

W odniesieniu do neomycyny, wartość MIC wynoszącą 2µg/ml wykazywało 34,78% szczepów, z kolei równą 2µg/ml obserwowano wśród 43,48% szczepów. Po jednym szczepie wykazywało wartość 4 µg/ml oraz 16 µg/ml co stanowiło 4,35%. Wzrost dwóch (8,69%) szczepów został zahamowany przez stężenia neomycyny wynoszące 32µg/ml. Tylko jeden szczep *E. coli* (4,35%) wykazywał wzrost przy stężeniach >32µg/ml.

Rozkład wartości MIC dla streptomycyny był zróżnicowany i wynosił kolejno <8µg/ml (17,4%), 8µg/ml (30,43), 16 µg/ml (13,04%), 32 µg/ml (4,35%), 128 µg/ml (4,35%), 256 µg/ml (13,04%), 1024 µg/ml (4,35%) oraz >1024 µg/ml (13,04%).

Wartość MIC dla ponad połowy (52,17%) badanych szczepów wynosiła 16 µg/ml w przypadku spektynomycyny. Wzrost tylko jednego szczepu został zahamowany przez stężenia spektynomycyny wynoszące 32 µg/ml (4,35%), wzrost pozostałych izolatów hamowały stężenia 64 µg/ml (13,04%) oraz >64 µg/ml (30,43%).

Ponad 78% badanych szczepów była oporna na amoksyicylinę i wykazała wartość MIC przekraczającą 16 µg/ml. Pozostałe szczepy były wrażliwe, a wartość MIC wynosiła dla nich 4 µg/ml (8,69%) oraz 8 µg/ml (13,04%).

W przypadku penicyliny wzrost 91,30% izolatów nie został zahamowany przez stężenia antybiotyku przekraczające 8 µg/ml. Z kolei tylko dwa szczepy (8,69%) nie wykazywały wzrostu przy stężeniu penicyliny równym 8 µg/ml.

Wysoki odsetek izolatów *E. coli* wykazał wartość MIC równą 0,5 µg/ml (91,30%) w przypadku ceftiofuru. Wzrost jednego szczepu (4,35%) zahamowało stężenie <0,25 µg/ml i tyleż samo (4,35%) w przypadku stężenia 0,25 µg/ml.

Wartość MIC dla erytromycyny wynosiła 4 µg/ml dla jednego izolatu (4,35%) oraz >4 µg/ml w przypadku pozostałych szczepów (95,65%). Wartość MIC dla tylozyny przekraczała 20µg/ml dla wszystkich badanych izolatów (100%).

Ponad połowa szczepów była oporna na tetracyklinę (56,52%) i oksytetracyklinę (52,17%), a wzrost *E. coli* obserwowano przy stężeniu antybiotyku przekraczającym 8 µg/ml. Pozostałe szczepy były wrażliwe lub średniowrażliwe na tetracyklinę, a wartość MIC wynosiła: 1 µg/ml (4,35%), 2 µg/ml (30,43%) 4 µg/ml (4,35%) oraz 8µg/ml (4,35%). Podobnie kształtowała się wartość MIC dla szczepów wrażliwych na oksytetracyklinę: 2 µg/ml (26,09%), 4 µg/ml (13,04%) oraz średniowrażliwych 8 µg/ml (8,7%).

Większość badanych szczepów *E. coli* była oporna na sulfonamidy. Oporność na działanie sulfadimetoksyny wykazało 73,91% szczepów, natomiast pozostałe szczepy były wrażliwe i wykazały wartość MIC: 64 µg/ml (4,35%), 128 µg/ml (13,04%) oraz 256 µg/ml (8,69%). Oporność na sulfametoksazol i trimetoprim wykazało 52,17% szczepów. Wartości: <0,5/9,5 µg/ml (8,69%), 0,5/9,5 µg/ml (26,09%) oraz 2/38 µg/ml (13,04%) hamowały wzrost badanych szczepów. Połowa szczepów była także oporna na sulfatiazol (52,17%). Wartości MIC <32 µg/ml (4,35%), 32 µg/ml (13,04%), 64 µg/ml (17,39%), 128 µg/ml (4,35%) oraz 256 µg/ml (8,69%) hamowały wzrost badanych szczepów.

Wzrost wszystkich szczepów został zahamowany przez stężenia klindamycyny wynoszące >4µg/ml.

Tylko 1 szczep był oporny na kolistynę i wykazywał wzrost przy stężeniu antybiotyku przekraczającym 4 µg/ml (4,35%). Pozostałe szczepy *E. coli* pozostały wrażliwe i nie wykazywały wzrostu przy stężeniu antybiotyku równemu 0,5 µg/ml (26,08%) i 1 µg/ml (69,57%).

4.4.2 Odczyt i interpretacja wyników oznaczenia granicznych wartości MIC wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków dla izolatów *E. coli* otrzymanych w 2020 roku

Otrzymane wartości MIC dla szczepów *E. coli* zostały zebrane w tabeli 11. Na rycinie 8 przedstawiono udział procentowy szczepów *E. coli* wrażliwych i opornych na działanie danego antybiotyku/chemioterapeutyku.

Wszystkie badane szczepy *E. coli* izolowane od gęsi w 2020 roku (n=20) wykazywały wrażliwość na ceftiofur oraz gentamycynę (100%). Natomiast badane izolaty wykazywały znaczną oporność na tetracyklinę (70%) oraz oksytetracyklinę (70%). Dodatkowo w przypadku oksytetracykliny 2 szczepy (10%) były średniowrażliwe. Na sulfonamidy opornych było odpowiednio: 75% na sulfadimetoksynę, 60% na sulfatiazol i 35% na trimetoprim i sulfametoksazol. Z kolei, 50% badanych izolatów wykazywała oporność na amoksycylinę, a tylko 20% było opornych na florfenikol, enrofloksacynę oraz kolistynę.

W przypadku gentamycyny dla zdecydowanej większości szczepów *E. coli* (85%) wartość MIC nie przekraczała 0,5 µg/ml. Wzrost pozostałych szczepów został zahamowany przez stężenia 1 µg/ml (10%) lub 2 µg/ml (5%).

Tylko dwa szczepy (10%) w przypadku neomycyny wykazywały wartość MIC przekraczającą 32 µg/ml. Pozostałe izolaty nie wykazywały wzrostu przy stężeniu <2 µg/ml (65%) oraz 4 µg/ml (25%).

W odniesieniu do streptomycyny, 35% izolatów nie wykazywało wzrostu przy stężeniu antybiotyku <8 µg/ml a 20% przy stężeniu 16 µg/ml. Stężenia streptomycyny wynoszące 64 µg/ml hamowały wzrost 1 izolatu, 128 µg/ml 4 izolatów (20%), a stężenia wynoszące 256 µg/ml 3 izolatów (15%). Dla jednego szczepu wartość MIC przekraczała 1024 µg/ml (5%). Wartość MIC dla spektynomycyny wyznaczono przy stężeniach: <8µg/ml (10%), 8 µg/ml (5%) 16 µg/ml (50%), 32 µg/ml (20%) oraz >64 µg/ml w 3 przypadkach (15%).

Dla połowy (50%) szczepów opornych na amoksycylinę wartość MIC przekraczała 16 µg/ml. Wśród pozostałych wzrost został zahamowany przez stężenia: 1 µg/ml (5%), 2 µg/ml (5%) oraz 4 µg/ml (40%).

Wszystkie badane szczepy były wrażliwe na ceftiofur (100%). Ich wzrost był hamowany przez stężenia <0,25 µg/ml (45%), 0,5µg/ml (50%) oraz 1 µg/ml (5%).

W przypadku enrofloksacyny 4 szczepy (20%) były odporne i wykazywały wzrost przy stężeniu antybiotyku: >2 µg/ml, pozostałe szczepy były wrażliwe lub średniowrażliwe, a ich wzrost hamowały stężenia: <0,12 µg/ml (30%), 0,25 µg/ml (10%), 0,5 µg/ml (30%), 1 µg/ml (5%) oraz 2 µg/ml(10%).

W odniesieniu do florfenikolu wzrost 15 szczepów był hamowany przez stężenia chemioterapeutyku wynoszące: 2 µg/ml (35%) 4 µg/ml (40%). Jeden izolat (5%) wykazywał średnią wrażliwość przy stężeniu florfenikolu na poziomie 8 µg/ml. Pozostałe 4 izolaty (20%) wykazywały wzrost przy stężeniu przekraczającym 8µg/ml.

W przypadku erytromycyny, wzrost drobnoustrojów został zahamowany przez stężenia: >4 µg/ml (80%), 4 µg/ml (5%), 1 µg/ml (10%) oraz 0,5 µg/ml (5%). Wartość MIC dla tylozyny wynosiła >20 µg/ml w przypadku 19 szczepów (95%), tylko jeden z badanych izolatów nie rósł na płycie przy stężeniu 20 µg/ml (5%).

Aż 70% szczepów wykazywało oporność na tetracyklinę i oksytetracyklinę, a wartości MIC przekraczały dla nich 8 µg/ml. Pozostałe szczepy nie wykazywały wzrostu przy stężeniu tetracykliny wynoszącym: 0,5 µg/ml (10%), 2 µg/ml (15%) oraz 4 µg/ml (5%). Z kolei oksytetracyklina hamowała wzrost drobnoustrojów wrażliwych przy stężeniu 0,5 µg/ml (10%), 4 µg/ml (10%) oraz średniowrażliwych przy stężeniu 8 µg/ml (10%).

Badane szczepy *E.coli* izolowane od gęsi cechowały się wysoką opornością na chemioterapeutyki należące do grupy sulfonamidów. W przypadku sulfadimetoksyny 75% badanych izolatów nie wykazywało wzrost przy stężeniu chemioterapeutyku przekraczającym 256 µg/ml. Wśród izolatów wrażliwych na sulfadimetoksynę wartość MIC wynosiła 128 µg/ml (10%) oraz 256 µg/ml (15%). Z kolei sulfatiazol nie był skuteczny przy stężeniu przekraczającym 256µg/ml w 60% przypadków. W odniesieniu do sulfatiazolu rozkład wartości MIC przedstawiał się następująco: <32 µg/ml (10%), 64 µg/ml (10%), 128 µg/ml (10%) oraz 256 µg/ml (10%). Trimetoprim/sulfametoksazol nie zahamował wzrostu 35% szczepów przy stężeniu 2/38 µg/ml, z kolei wzrost izolatów został zahamowany przez stężenia wynoszące: 2/38 µg/ml (10%), 1/19 µg/ml (10%) oraz <0,5/9,5 µg/ml (45%).

Wzrost wszystkich szczepów został zahamowany przez stężenia klindamycyny wynoszące >4µg/ml.

Oporność na kolistynę, obserwowano w przypadku 4 szczepów, które wykazywały wzrost przy stężeniu antybiotyku przekraczającym 4 µg/ml (20%). Pozostałe izolaty nie wykazywały wzrostu przy stężeniach antybiotyku wynoszących: 1 µg/ml (60%) oraz 2 µg/ml (20%).

Na podstawie interpretacji granicznych wartości MIC wg. EUCAST oraz CLSI wyznaczono profile oporności szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi. Termin wielolekooporność (ang. Multiple Drug Resistance, MDR) dotyczy braku wrażliwości drobnoustrojów (szczepy odporne oraz średnio wrażliwe) na przynajmniej jeden antybiotyk/chemioterapeutyk z co najmniej trzech grup związków przeciwbakteryjnych.

Analiza otrzymanych wyników potwierdziła, że 18 szczepów wyizolowanych w 2019 r. wykazywało fenotyp wielolekooporny, co stanowiło 78,26%. Z kolei, w 2020 r. wyizolowano 12 szczepów wykazujących fenotyp wielolekooporny (MDR), co stanowiło 60% wszystkich badanych szczepów. Ponadto, wyznaczono łącznie 12 różnych profili wielolekooporności dla izolatów *E. coli* z 2019 r. oraz 10 profili wielolekooporności dla izolatów z 2020 r. Zostały one przedstawione w tabeli 12 i 13

Tabela 10. Wyznaczone wartości minimalnych stężeń hamujących [$\mu\text{g/ml}$] wzrost szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi [n=23] w 2019 r., dla wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków

Sezon	ZWD	Hodowca	Szczep	Antybiotyki/ chemioterapeutyki (wartość MIC $\mu\text{g/ml}$)																	
				Aminoglikozydy				Betalaktamy		Cefalosporyny	Chinolony	Fenikole	Makrolidy		Tetracykliny		Sulfonamidy			Linkozamidy	Polimyksyny
				GEN	NEO	STR	SPE	AMOX	PEN	XNL	ENRO	FFN	ERY	TYLT	OXY	TET	SDM	SXT	STZ	CLI	COL
I	X	A	A01	0,5	2	8	32	>16	>8	0,5	0,5	8	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	0,5
		A	A04	<0,5	2	<8	16	8	>8	0,5	1	4	>4	>20	2	2	64	0,5/9,5	<32	>4	1
		B	A07	1	4	8	16	>16	>8	0,5	0,12	4	>4	>20	2	2	>256	>2/38	>256	>4	1
		B	A06	0,5	32	256	>64	>16	>8	0,5	1	4	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	1
		B	A08	<0,5	<2	<8	>64	>16	>8	0,5	>2	>8	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	1
		C	A12	0,5	32	16	64	8	8	0,5	0,12	>8	>4	>20	8	>8	>256	0,5/9,5	64	>4	4
		E	A17	0,5	2	8	16	>16	8	0,5	>2	4	>4	>20	>8	>8	256	2/38	256	>4	0,5
		E	A18	0,5	2	128	>64	>16	>8	0,5	>2	>8	>4	>20	>8	2	>256	>2/38	>256	>4	1
		F	A19	1	2	256	>64	>16	>8	0,5	>2	4	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	0,5
	F	A21	2	2	8	16	>16	>8	0,5	2	4	>4	>20	2	>8	>256	0,5/9,5	64	>4	1	
	Y	D	A13	0,5	2	16	16	>16	>8	0,5	1	4	>4	>20	2	2	>256	2/38	64	>4	0,5
		D	A14	<0,5	<2	<8	>64	>16	>8	0,5	<0,12	4	>4	>20	>8	1	>256	<0,5/9,5	256	>4	1
	Z	G	A23	0,5	16	32	16	4	>8	0,5	0,25	8	>4	>20	8	>8	>256	0,5/9,5	32	>4	1
G		A15	1	<2	>1024	16	>16	>8	0,5	0,5	8	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	1	
II	X	A	A03	1	2	8	16	4	>8	0,5	0,5	4	>4	>20	4	2	128	2/38	32	>4	1
		A	A02	1	2	8	16	>16	>8	0,5	1	8	>4	>20	4	4	128	0,5/9,5	32	>4	0,5
		A	A05	<0,5	<2	<8	16	>16	>8	0,5	2	4	>4	>20	>8	>8	128	<0,5/9,5	64	>4	1
		B	A09	1	<2	256	64	>16	>8	0,5	>2	4	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	1
		C	A11	1	>32	>1024	16	>16	>8	0,5	0,5	4	4	>20	2	2	>256	>2/38	>256	>4	0,5
		C	A10	1	<2	>1024	64	>16	>8	0,5	>2	4	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	1
		E	A16	0,5	2	8	16	8	>8	0,25	2	4	>4	>20	4	>8	256	0,5/9,5	128	>4	1
		F	A20	<0,5	<2	16	>64	>16	>8	0,5	>2	8	>4	>20	2	2	>256	>2/38	>256	>4	1
	Z	G	A22	1	<2	1024	>64	>16	>8	<0,25	>2	2	>4	>20	>8	8	>256	>2/38	>256	>4	1

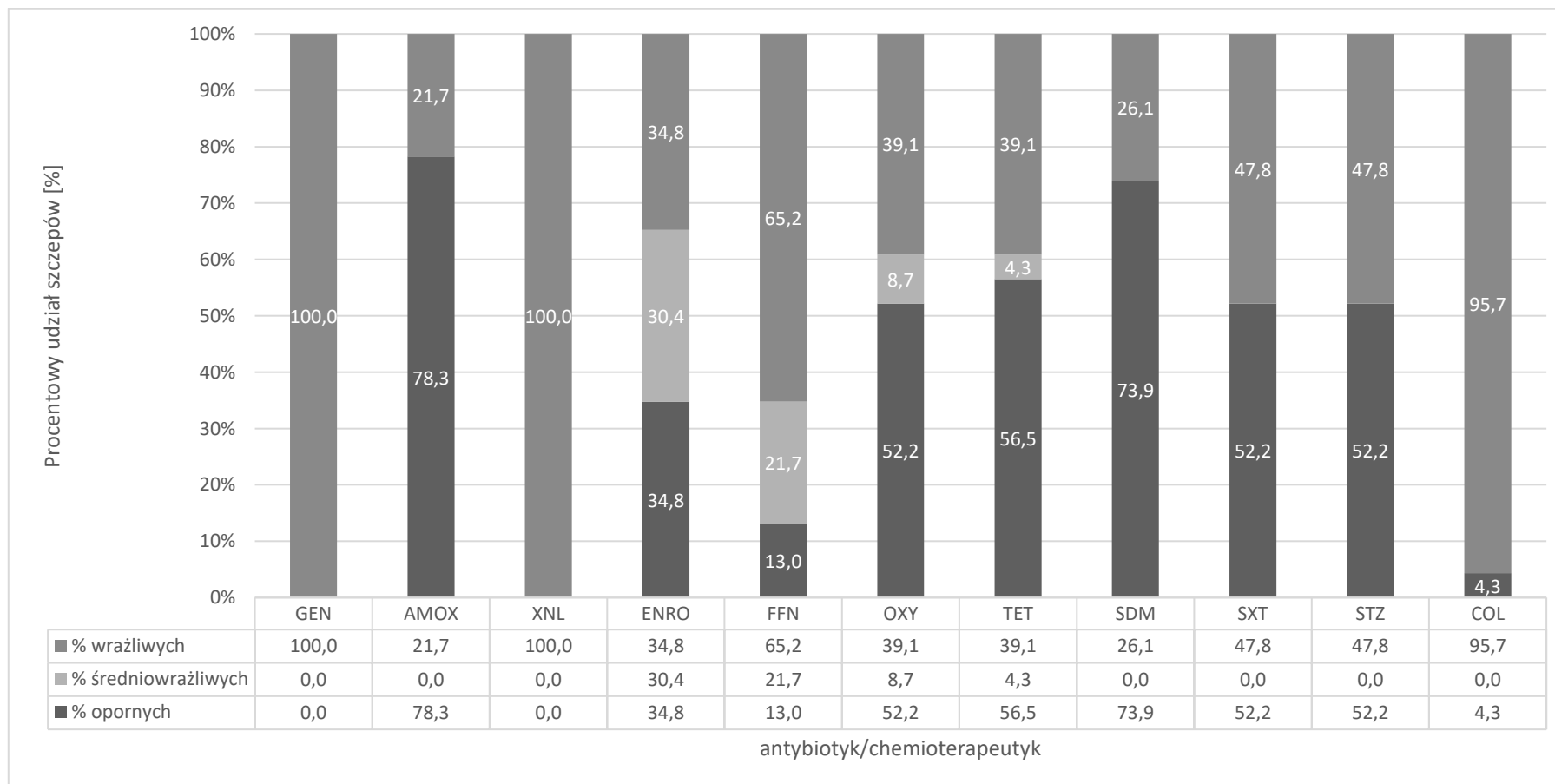
	Szczepy wrażliwe (S)
	Szczepy średniowrażliwe (I)
	Szczepy odporne (R)

Tabela 11. Wyznaczone wartości minimalnych stężeń hamujących [$\mu\text{g/ml}$] wzrost szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi [n=20] w 2020 r., dla wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków

Sezon	ZWD	Hodowca	Szczep	Antybiotyk/ chemioterapeutyk (wartość MIC $\mu\text{g/ml}$)																	
				Aminoglikozydy				Betalaktamy		Cefalosporyny	Chinolony	Fenikole	Makrolidy		Tetracykliny		Sulfonamidy			Linkozamidy	Polimyksyny
				GEN	NEO	STR	SPE	AMOX	PEN	XNL	ENRO	FFN	ERY	TYLT	OXY	TET	SDM	SXT	STZ	CLI	COL
I	X	A	B01	<0,5	>32	16	>64	4	>8	0,5	2	4	>4	>20	>8	>8	>256	<0,5/9,5	>256	>4	4
		C	B08	<0,5	<2	>1024	16	4	>8	0,5	0,5	4	>4	>20	>8	>8	256	<0,5/9,5	64	>4	1
	Y	B	B04	<0,5	<2	<8	16	4	>8	0,5	0,5	4	>4	>20	>8	>8	>256	<0,5/9,5	256	>4	1
		B	B06	<0,5	<2	<8	16	4	>8	<0,25	0,5	2	>4	>20	4	2	128	<0,5/9,5	<32	>4	1
		D	B11	<0,5	<2	128	32	>16	>8	0,5	0,5	4	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	4
		H	B15	1	4	<8	<8	1	>8	<0,25	<0,12	2	1	>20	0,5	0,5	>256	>2/38	>256	>4	1
		H	B14	<0,5	<2	<8	16	>16	>8	0,5	0,5	4	>4	>20	4	4	>256	1/19	128	>4	1
I	B16	<0,5	<2	128	32	>16	>8	0,5	>2	4	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	1		
II	X	A	B02	<0,5	>32	16	>64	4	>8	0,5	2	8	>4	>20	>8	>8	>256	<0,5/9,5	>256	>4	4
		A	B03	<0,5	<2	256	16	>16	>8	<0,25	<0,12	2	>4	>20	8	2	>256	>2/38	>256	>4	4
		C	B10	<0,5	<2	256	16	>16	>8	0,5	>2	>8	>4	>20	>8	>8	>256	<0,5/9,5	>256	>4	2
		C	B09	2	4	16	32	>16	>8	<0,25	>2	2	4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	1
	Y	B	B05	<0,5	<2	<8	16	4	>8	0,5	0,25	4	>4	>20	>8	>8	256	<0,5/9,5	256	>4	2
		E	B07	<0,5	4	<8	<8	4	>8	<0,25	0,25	2	1	>20	0,5	0,5	>256	2/38	64	>4	1
		D	B12	<0,5	4	128	16	2	>8	<0,25	<0,12	2	>4	>20	8	2	128	1/19	<32	>4	1
		D	B13	<0,5	<2	64	32	>16	>8	0,5	0,5	>8	>4	>20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	2
		H	B18	<0,5	<2	16	16	>16	>8	<0,25	<0,12	4	>4	>20	>8	>8	256	<0,5/9,5	>256	>4	1
		H	B19	<0,5	<2	256	16	4	>8	<0,25	1	>8	>4	>20	>8	>8	>256	<0,5/9,5	>256	>4	1
B	B20	1	4	<8	8	>16	>8	<0,25	<0,12	2	0,5	>20	>8	>8	>256	2/38	128	>4	1		
I	B17	<0,5	<2	128	>64	>16	>8	1	>2	>8	>4	20	>8	>8	>256	>2/38	>256	>4	2		

	Szczepy wrażliwe (S)
	Szczepy średniowrażliwe (I)
	Szczepy odporne (R)

Rycina 7. Procentowy rozkład szczepów *E. coli* izolowanych od gęsi w 2019 r. [n=23], wrażliwych, średniowrażliwych i opornych na działanie wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków



Rycina 8. Procentowy rozkład szczepów *E. coli* izolowanych od gęsi w 2020 r. [n=20], wrażliwych, średniowrażliwych i opornych na działanie wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków

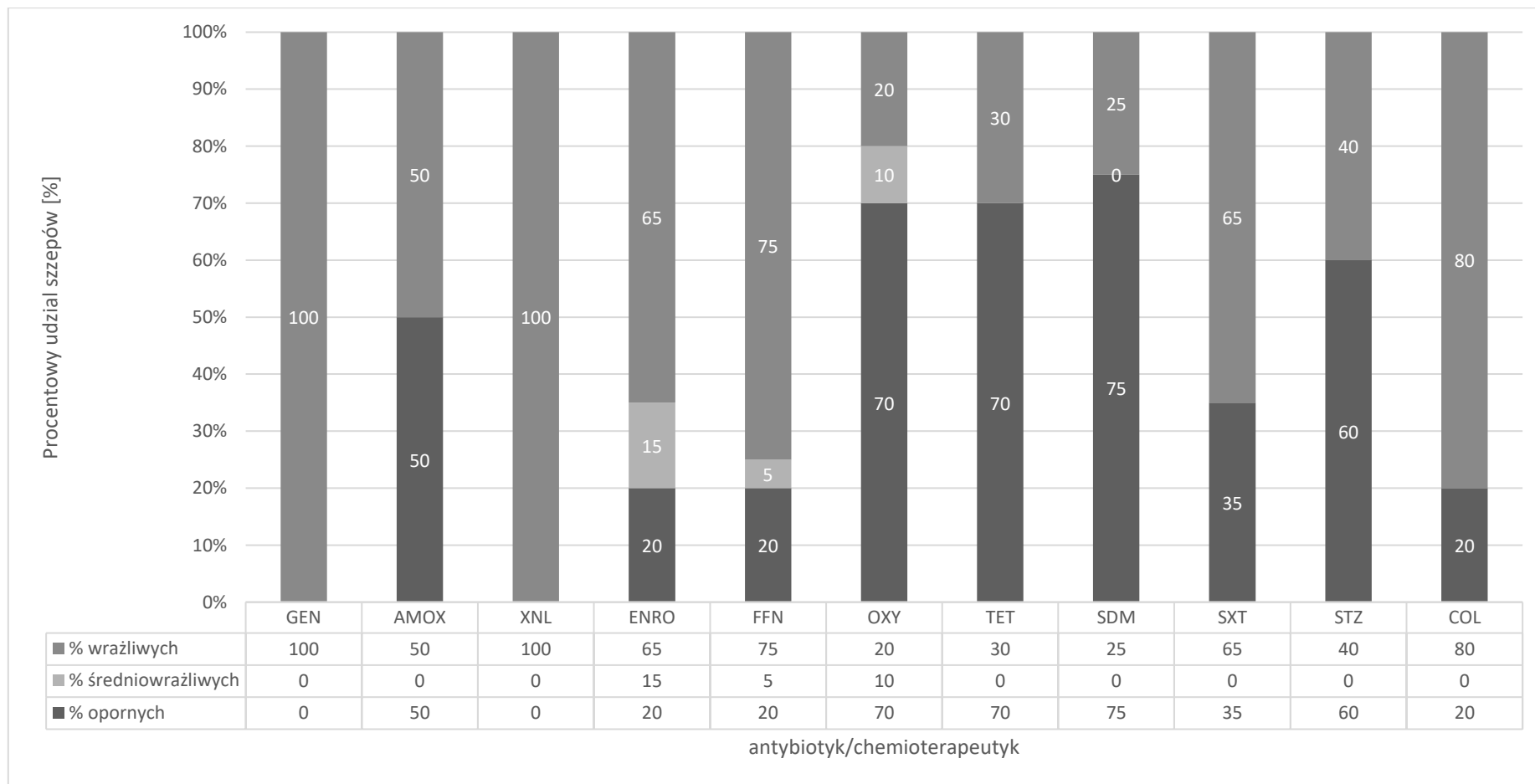


Tabela 12. Profile wielolekooporności pałeczek *E. coli* wyizolowanych od gęsi w 2019 roku

L.p.	Profil lekooporności	Szczep
1	AMOX ENRO FFN OXY TET SDM SXT STZ	A08
2	AMOX ENRO FFN OXY SDM SXT STZ	A18
3	AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ	A06, A09, A10, A19, A22
4	AMOX ENRO FFN SDM SXT STZ	A20
5	AMOX FFN OXY TET SDM SXT STZ	A01, A15
6	AMOX ENRO TET SDM	A21
7	FFN OXY TET SDM COL	A12
8	AMOX ENRO OXY TET	A05, A17
9	FFN OXY TET SDM	A23
10	AMOX OXY SDM	A14
11	AMOX ENRO FFN	A02
12	AMOX ENRO SDM	A13

Tabela 13. Profile wielolekooporności pałeczek *E. coli* wyizolowanych w 2020 roku

L.p.	Profil lekooporności	Szczep
1	AMOX ENRO FFN OXY TET SDM SXT STZ	B17, B10
2	ENRO FFN OXY TET SDM SXT STZ COL	B02
3	AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ	B16, B09
4	AMOX FFN OXY TET SDM SXT STZ	B13
5	ENRO FFN OXY TET SDM STZ	B19
6	ENRO OXY TET SDM STZ COL	B01
7	AMOX OXY TET SDM SXT STZ COL	B11
8	AMOX OXY SDM SXT STZ COL	B03
9	AMOX OXY TET SDM	B20
10	AMOX OXY TET STZ	B18

Najczęściej występującym profilem wielolekooporności w 2019 r. był: AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ, który wyznaczono dla 5 szczepów *E. coli* (A06, A09, A10, A19, A22) i profile: AMOX FFN OXY TET SDM SXT STZ wyznaczony dla szczepów A01 i A15 oraz AMOX ENRO OXY TET wyznaczony dla szczepów A05 i A17.

Z kolei, w 2020 roku dla 2 szczepów *E. coli* wyznaczono profil: AMOX ENRO FFN OXY TET SDM SXT STZ (B17, B10). Również 2 szczepy posiadały profil: AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ (B16, B09). Analiza wartości MIC wykazała, że

najwyższą opornością charakteryzowały się szczepy A08, A18, B02, B10 i B17 są odporne na chemioterapeutyki z 5 różnych grup środków przeciwdrobnoustrojowych.

4.5 Ocena prevalencji wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki

W ramach badań szczepów *E. coli* dokonano detekcji genów warunkujących oporność na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe. Wybrano 25 genów oporności na poniższe antybiotyki i chemoterapeutyki:

- Betalaktamy: *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM*
- Fluorochinolony: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *acc(6')-Ib-cr*
- Amfenikole: *cat1*, *cat2*, *cat3*
- Tetracykliny: *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*
- Sulfonamidy: *sul1*, *sul2*, *sul3*
- Polimyksyny: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*

Techniki PCR niezbędne do wykonania powyższych badań zostały omówione w podrozdziale 3.1.3.2. Na podstawie elektroforogramów z produktami PCR o znanej wielkości, utworzono ryciny przedstawiające prevalencję wszystkich genów oporności, które zostały poddane badaniu. Dodatkowo na rycinach uwzględniono dwa sezony pobierania prób do badań oraz zakład wylęgu drobiu z którego pochodziły gąsienki. Rycina 9 przedstawia rozkład obecnych genów oporności wśród szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi, pochodzących z pierwszego lub drugiego sezonu wylęgu w roku 2019. Rycina 10, analogicznie ukazuje prevalencję genów oporności w grupie szczepów *E. coli* wyizolowanych w roku 2020.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że wśród szczepów *E. coli* pochodzących od gęsi w 2019 roku najczęściej stwierdzano obecność genu warunkującego oporność na betalaktamy *blaTEM* (65,20%). Ponadto, 9 szczepów (39,13%) posiadało gen *tetA* warunkujący oporność na tetracykliny. Wśród izolatów *E. coli* pochodzących od gęsi wykryto wszystkie trzy badane geny oporności na sulfonamidy: *sul1*, *sul2*, *sul3*, z czego po 3 szczepy (13,04%) posiadały gen *sul2* oraz *sul3*, a u dwóch szczepów potwierdzono występowanie genu *sul1* (8,69%).

Z kolei tylko jeden szczep (4,34%) posiadał gen *mcr-1* warunkujący oporność na polimyksyny. Występowanie genu *cat1* potwierdzono u jednego izolatu *E. coli* (4,34%), a u trzech (13,04%) potwierdzono występowanie genu *cat2*. Żaden z badanych szczepów nie posiadał genów warunkujących oporność na fluorochinolony.

Analizując wyniki, wykazano, że 82,6% badanych szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi 2019 r. posiadało co najmniej jeden gen oporności. Spośród badanych izolatów, geny oporności na dwa związki przeciwdrobnoustrojowe posiadało 26,08% szczepów, geny oporności na trzy związki przeciwdrobnoustrojowe posiadało 6 szczepów (26,08%) i były to: A01, A08, A12, A23, A15 i A10. Ponadto, tylko 4 (17,40%) szczepy *E. coli* nie posiadały żadnego z poszukiwanych genów oporności, były to szczepy: A04, A07, A09 i A22.

Podobnie jak w 2019 r., w roku 2020 na wysokim poziomie kształtował się odsetek szczepów *E. coli* (55%), które posiadały gen *blaTEM* odpowiedzialny za oporność na betalaktamy. Na wyższym poziomie (50%) kształtowała się częstotliwość występowania genu oporności na tetracykliny- *tetA*, z kolei gen *tetB* posiadały tylko 2 szczepy (10%). Odsetek izolatów *E. coli* posiadających gen oporności na sulfonamidy *sul1*, *sul2* i *sul3* wynosił odpowiednio 25%, 35% i 5%. Tylko jeden szczep posiadał gen oporności na amfenikole – *cat2* (5%). Podobnie jak w roku 2019, wśród badanych izolatów, żaden nie posiadał genów warunkujących oporność na fluorochinolony. Ponadto, nie potwierdzono obecności genów determinujących oporność na polimyksyny.

Analizując wyniki uzyskane dla szczepów w 2020 roku, stwierdzono, że częstotliwość występowania co najmniej jednego genu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród badanych izolatów była wysoka i wynosiła 80%. Z kolei występowanie dwóch genów oporności potwierdzono w 25% przypadków (B08, B03, B10, B18, B19), trzech genów oporności w 25% przypadków (B01, B09, B13, B20, B17), a cztery geny oporności posiadało 10% szczepów (B11 i B16). Ponadto, tylko 4 (20%) izolaty nie posiadały żadnego genu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, były to szczepy: B06, B14, B15 i B07.

Nie zaobserwowano istotnych różnic w obecności genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w odniesieniu do szczepów izolowanych w I lub II sezonie, a także izolatach pochodzących od gęsi z różnych ZWD.

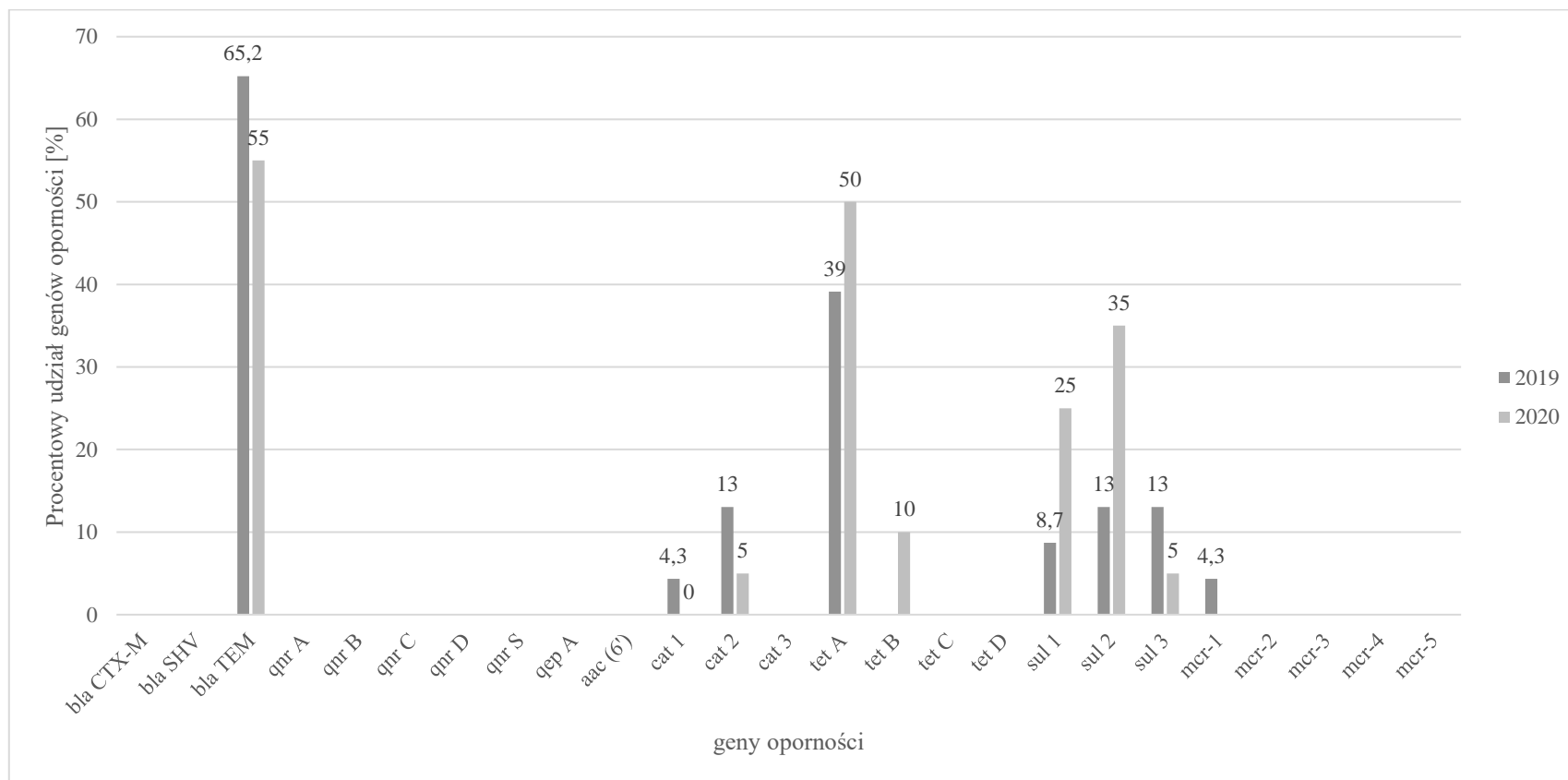
Na rycinie 11 porównano procentowy udział genów oporności badanych szczepów *E. coli*, wyizolowanych od gęsi w 2019 oraz 2020 roku. Analizując powyższy wykres można dostrzec zwiększającą się liczbę szczepów *E. coli* z obecnością genów oporności na sulfonamidy (*sul1* i *sul2*) oraz tetracykliny (*tetA*, *tetB*), których częstotliwość detekcji wzrosła w roku 2020 w porównaniu z rokiem 2019 (wzrost detekcji genu *tetA* z 39% wśród szczepów *E. coli* z 2019 r. do 50% - wśród izolatów z 2020r.). Z kolei analizując obecność genów odpowiedzialnych za wystąpienie oporności na amfenikole (*cat1* i *cat2*) oraz betalaktamy (*blaTEM*), zauważalny jest spadek częstotliwości ich detekcji w roku 2020 w porównaniu z rokiem 2019 (np. obecność genu *blaTEM* na poziomie 65,2%-szczepy *E. coli* z 2019 r i 55% - izolaty z 2020 r.).

Rycina 10. Prewalencja wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki badanych szczepów *E. coli*, izolowanych od gęsi w 2020 r. [n=20]

Sezon	ZWD	Hodowca	Symbol szczepu	Geny oporności																								
				Betalaktamy			Fluorochinolony						Amfenikole			Tetracykliny				Sulfonamidy			Polimyksyny					
				<i>bla</i> <i>CTX-M</i>	<i>bla</i> <i>SHV</i>	<i>bla</i> <i>TEM</i>	<i>qnr</i> <i>A</i>	<i>qnr</i> <i>B</i>	<i>qnr</i> <i>C</i>	<i>qnr</i> <i>D</i>	<i>qnr</i> <i>S</i>	<i>qep</i> <i>A</i>	<i>aac</i> <i>(6')-Ib-cr</i>	<i>cat</i> <i>1</i>	<i>cat</i> <i>2</i>	<i>cat</i> <i>3</i>	<i>tet A</i>	<i>tet B</i>	<i>tet C</i>	<i>tet D</i>	<i>sul 1</i>	<i>sul 2</i>	<i>sul 3</i>	<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>
I	X	A	B01			■																						
		C	B08			■																						
	Y	B	B04																									
		B	B06																									
		D	B11			■																						
		H	B15																									
		H	B14																									
I	B16			■																								
II	X	A	B02			■																						
		A	B03			■																						
		C	B10																									
		C	B09																									
	Y	B	B05																									
		E	B07																									
		D	B12			■																						
		D	B13																									
		H	B18			■																						
		H	B19																									
B	B20																											
I	B17			■																								

■ detekcja genu
□ brak detekcji genu

Rycina 11. Porównanie udziału procentowego obecności genów oporności u szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi [n=43] w roku 2019 i 2020



4.6 Ocena prevalencji wybranych genów zjadliwości

Kolejnym etapem badań było określenie częstotliwości występowania genów zjadliwości wśród badanych szczepów *E. coli*. W tym celu wybrano 8 genów zjadliwości: *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cva A/B cvi cvaC*. Techniki PCR niezbędne do wykonania powyższych badań zostały omówione w podrozdziale 3.1.3.3. Na podstawie elektroforogramów z produktami PCR o znanej wielkości, utworzono ryciny przedstawiające prevalencję wszystkich genów zjadliwości, które zostały poddane badaniu (rycina 12). Dodatkowo na rycinie 12 uwzględniono dwa sezony pobierania prób do badań oraz rodzaj ZWD, z którego pochodziły pisklęta. Z kolei rycina 13 przedstawia rozkład obecnych genów zjadliwości wśród szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi, w roku 2019 [n=23] i 2020 [n=20].

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że wśród szczepów pochodzących od gęsi w 2019 roku najczęściej stwierdzano obecność genu *iss* (56,5%), z kolei najrzadziej genu *papC*, którego potwierdzono tylko u 1 szczepu (4,35%). Dość często potwierdzano występowanie genu *iucD* (39,1%), *cvaA/B cvi cvaC* (30,4%) oraz *vat* (26,1%). Potwierdzono, że 5 szczepów (21,7%) posiadało gen *irp2* i tyleż samo (21,7%) gen *tsh*. Stosunkowo rzadko pojawiał się gen *ast2* (8,7%). Natomiast 6 szczepów (26,1%) nie posiadało żadnego z poszukiwanych genów zjadliwości, były to szczepy: A01, A04, A12, A15, A03, A09.

W roku 2020 najczęściej występującym genem zjadliwości wśród wyizolowanych szczepów *E. coli* był *iucD* (75%) oraz podobnie jak w roku poprzedzającym gen *iss* (70%). Równie często pojawiającym się genem zjadliwości był gen *irp2* (65%). Potwierdzono, że 6 szczepów posiadało gen *tsh* (30%) i tyleż samo gen *cva A/B cvi cvaC* (30%). Najrzadziej z kolei występował gen *astA*, którego posiadał tylko jeden izolat (5%). Stosunkowo rzadko potwierdzano obecność genów *papC* (15%) i *vat* (10%). Tylko 3 (15%) z badanych szczepów *E. coli* wyizolowanych w 2020 roku nie posiadały żadnego genu zjadliwości, były to szczepy: B09, B07 i B18.



Z analizy danych wynika, że sezon wstawienia ptaków i pochodzenie gąsiąt (ZWD) nie miały wpływu na częstotliwość występowania genów zjadliwości u szczepów *E. coli* izolowanych od gęsi.

Na rycinie 13 porównano procentowy udział genów zjadliwości badanych szczepów *E. coli*, wyizolowanych od gęsi w 2019 oraz 2020 roku. Po przeanalizowaniu danych, można

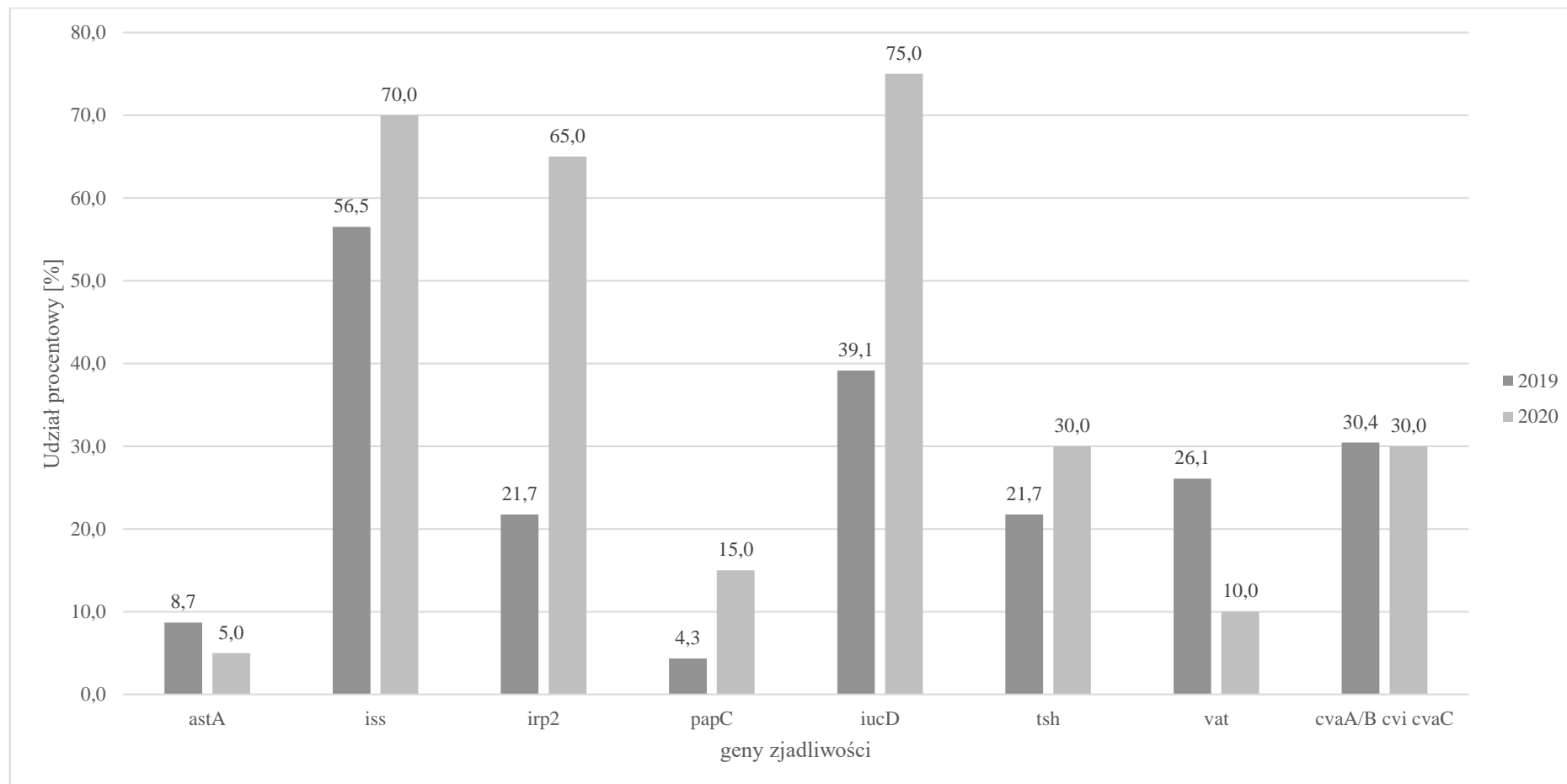
zauważyć wyższą częstotliwość występowania genów *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD* oraz *tsh* w izolatach *E. coli* z roku 2020 w porównaniu z rokiem 2019 (np. częstotliwość występowania genu *iss* wzrosła z 56,5% do 70%, częstotliwość występowania genu *irp2* wzrosła z 21,7 do 65%, częstotliwość występowania genu *iucD* wzrosła z 39,1% do 75%). Z kolei, analizując obecność genów *astA* i *vat* zauważalny jest spadek częstotliwości ich detekcji w roku 2020 w porównaniu z rokiem 2019. Obecność genu *cvaA/B* *cvi* *cvaC* pozostawała na porównywalnym poziomie w latach 2019 i 2020.

Rycina 12. Prewalencja wybranych genów zjadliwości szczepów *E. coli* izolowanych od gęsi [n=23] w roku 2019 oraz 2020 [n=20]

Rok	Sezon	ZWD	Hodowca	Symbol szczepu	Geny zjadliwości									
					<i>astA</i>	<i>iss</i>	<i>irp2</i>	<i>papC</i>	<i>hucD</i>	<i>ish</i>	<i>vat</i>	<i>cvaA/B</i> <i>cvi</i> <i>cvaC</i>		
2019	I	X	A	A01										
			A	A04										
			B	A07										
			B	A06										
			B	A08										
			C	A12										
			E	A17										
			E	A18										
			F	A19										
			F	A21										
	Y	D	A13											
		D	A14											
		G	A23											
	Z	G	A15											
	II	X	A	A03										
A			A02											
A			A05											
B			A09											
C			A11											
C			A10											
E			A16											
F			A20											
Z	G	A22												
2020	I	X	A	B01										
			C	B08										
		Y	B	B04										
			B	B06										
			D	B11										
			H	B15										
			H	B14										
	I	B16												
	II	X	A	B02										
			C	B03										
			A	B10										
			C	B09										
		Y	B	B05										
			E	B07										
			D	B12										
D			B13											
H	B18													
H	B19													
B	B20													
I	B17													

 detekcja genu
 brak detekcji genu

Rycina 13. Porównanie udziału procentowego występowania genów zjadliwości u szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi w roku 2019 [n=23] i 2020 [n=20]



4.7 Ocena produkcji biofilmu przez szczepy *E. coli*

W dalszym etapie badań dokonano oceny zdolności tworzenia biofilmu przez zgromadzone szczepy *E. coli*. Zadanie to realizowano poprzez pomiar intensywności wzrostu biofilmu w podłożu LB, a hodowlę prowadzono w 96-dółkowych płytkach, w czterech powtórzeniach dla danego szczepu. Metodyka dla tego badania została opisana w podrozdziale 3.1.3.4. Intensywność wzrostu biofilmu została przyporządkowana do czterech klas, zgodnie z metodyką Stepanović i wsp. (2004) i poniższym schematem:

Zakres wartości OD	Ocena intensywności tworzenia biofilmu	Ocena intensywności tworzenia biofilmu
$OD \leq OD_c$	Szczep nie tworzący biofilmu	0
$OD_c < OD \leq 2OD_c$	Szczep słabo tworzący biofilm	1
$2OD_c < OD \leq 4OD_c$	Szczep średnio tworzący biofilm	2
$4OD_c < OD$	Szczep mocno tworzący biofilm	3

W tabeli 14 zostały przedstawione wyniki przeprowadzonych eksperymentów hodowli biofilmu z wyizolowanych od gęsi w 2019 i 2020 roku szczepów *E. coli*. Wartości OD znajdujące się w tabeli są uśrednionymi wartościami ze wszystkich powtórzeń eksperymentu.

Z przeprowadzonych badań wynika, że wszystkie badane szczepy produkowały biofilm na podłożu LB w temp. 37°C, choć na różnym poziomie intensywności. Zarówno w roku 2019 jak i 2020 większość izolatów tworzyła biofilm na średnim poziomie, dotyczył on odpowiednio 82,6% i 70% szczepów. Tylko jeden szczep – A13 (4,35%) w roku 2019 i dwa szczepy – B03, B18 (10%) w roku 2020 silnie produkowały biofilm. Słabą produkcją biofilmu cechowały się 3 szczepy (13,04%) w 2019 r. i 4 szczepy (20%) w 2020 r., były to odpowiednio szczepy: A12, A05, A09 oraz B16, B02, B10 i B07.

Analiza zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *E. coli*, nie wskazała jednoznacznie na zróżnicowanie wyników ze względu na pochodzenia piskląt (ZWD), sezonu wstawienia ptaków na fermę (I lub II) lub hodowcę, chociaż dwa szczepy (B03, B18) z 2020 r. produkujące silnie biofilm to izolaty z II sezonu wstawienia gęsi.

Tabela 14. Wartość OD oraz ocena zdolności tworzenia biofilmu szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi [n=43] w roku 2019 oraz 2020

Rok	Sezon	ZWD	Hodowca	Symbol szczepu	Wartość OD	Intensywność tworzenia biofilmu
2019	I	X	A	A01	0,381	2
			A	A04	0,568	2
			B	A07	0,558	2
			B	A06	0,450	2
			B	A08	0,485	2
			C	A12	0,340	1
			E	A17	0,535	2
			E	A18	0,652	2
			F	A19	0,483	2
			F	A21	0,479	2
	Y	D	A13	0,922	3	
		D	A14	0,458	2	
	Z	G	A23	0,614	2	
		G	A15	0,403	2	
	II	X	A	A03	0,423	2
			A	A02	0,530	2
			A	A05	0,314	1
			B	A09	0,324	1
			C	A11	0,461	2
			C	A10	0,349	2
E			A16	0,397	2	
F			A20	0,483	2	
Z	G	A22	0,338	2		
2020	I	X	A	B01	0,475	2
			C	B08	0,545	2
		Y	B	B04	0,338	2
			B	B06	0,338	2
			D	B11	0,375	2
			H	B15	0,394	2
			H	B14	0,362	2
			I	B16	0,345	1
	II	X	A	B02	0,332	1
			A	B03	0,777	3
			C	B10	0,310	1
			C	B09	0,677	2
		Y	B	B05	0,469	2
			E	B07	0,340	1
			D	B12	0,561	2
			D	B13	0,401	2
			H	B18	3,335	3
			H	B19	0,549	2
			B	B20	0,470	2
			I	B17	0,738	2

Analiza wyników zawartych w tabeli 15 i 16 wskazuje, że nie zawsze szczepy MDR charakteryzowały się obecnością licznych genów oporności na antybiotyki/chemioterapeutyki np. szczep A18 wyizolowany w 2019 wykazywał oporności na 5 różnych grup środków przeciwdrobnoustrojowych, a posiadał tylko 1 gen oporności na betalaktamy (*blaTEM*). Podobnie w 2020 r. szczep B10 wykazywał oporność na 5 różnych grup antybiotyków przy czym posiadał tylko 2 geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe: tetracykliny (*tetA*) i sulfonamidy (*sul2*).

Podobnie było w przypadku występowania genów zjadliwości. Szczepy wielolekooporne jak np. A01, A12, A15 z 2019 r. czy B09, B17, B18 z 2020 r. nie posiadały żadnych genów zjadliwości.

Ponadto, większość szczepów tworzyła biofilm na średnim poziomie (2), bez względu na lekooporność. Zdarzało się, że szczepy MDR (np. A05, A09, A12 z 2019 r. czy B02, B10, B16 z 2020 r.) produkowały biofilm na niskim poziomie (1).

4.8 Wyniki badań serologicznych

Krew do badań serologicznych pobierano od gąsiąt w przedziale wiekowym od 10 (hodowca F, sezon II 2019 r.) do 18 dnia życia ptaków (hodowca A, sezon I 2020 r.). Niemniej, w większości stad (14/24=58,33%) krew pobierano w 13-14 dobie życia gąsiąt. Z 3 stad nie pobrano krwi gdyż hodowca nie wyraził na to zgody, były to stada hodowcy G (w obu sezonach 2019 r.) oraz stado hodowcy E w II sezonie 2020 r. Uzyskane wartości mian ELISA (wartość OD) przedstawiono w tabeli 17.

We wszystkich badanych surowicach pobranych od gęsi zarówno w roku 2019 jak i 2020, potwierdzono obecność swoistych przeciwciał anti-GPV. Otrzymane wartości OD w dniu pobierania próbek były już stosunkowo niskie i zróżnicowane w zależności od stada. W 2019 r. na 11 badanych stad, tylko w 8 stadach uzyskano wartości OD surowicy wskazujące na wynik dodatni w odniesieniu do wszystkich badanych surowic ze stada (100%), przy czym najwyższa wartość OD wynosiła 0,387 (hodowca F, Sezon II), zaś najniższa 0,211 (hodowca C, sezon II). Natomiast w pozostałych 3 stadach, wartości OD wskazujące na wynik dodatni w zakresie obecności swoistych przeciwciał anti-GPV uzyskano tylko u 20% gąsiąt (hodowca A, sezon I), 53,34 % (hodowca E, sezon I) oraz 85,8% (hodowca B, sezon I). Pozostałe wartości OD uzyskane dla surowic gąsiąt z ww. stad wskazywały na wynik wątpliwy (odpowiednio: 80%, 46,7%, 14,2%). Z kolei w 2020 r. wszystkie surowice we wszystkich badanych stadach [n=13] uzyskały wynik dodatni, a wartość OD surowicy wahała się od 0,210 (hodowca I, sezon I) do 0,653 (hodowca D, sezon II).

Podkreślić należy, że najniższy przedział wartości OD wynosił 0,155-0,202 i określono go dla surowic pobranych od gęsi w pierwszym sezonie produkcyjnym w 2019 roku (hodowca A). Z kolei najwyższy przedział wartości OD wynosił 0,227-0,653 i odnotowano go w drugim sezonie produkcyjnym 2020 roku (hodowca D).

Generalnie, wyższe poziomy przeciwciał anti-GPV stwierdzano w próbkach surowicy pobranej od gąsiąt w 2020 r., zarówno w I jak i w II sezonie wstawienia gąsiąt. Nie zaobserwowano zależności w wysokości poziomu przeciwciał anti-GPV a pochodzeniem piskląt (ZWD).

Tabela 17. Zakres wartości OD przeciwciał anti-GPV występujących w surowicy gęsi, pobranej w roku 2019 i 2020 r.

Rok	Sezon	ZWD	Hodowca	Wiek stada (dni)	Liczba badanych surowic	Wartość OD (min-max)	% wyników		
							dodatnie	wątpliwe	ujemne
2019	I	X	A	14	15	0,155-0,202	20,0	80,0	0
			B	14	14	0,190-0,280	85,8	14,2	0
			C	14	15	0,222-0,276	100	0	0
			E	11	15	0,170-0,237	53,3	46,7	0
			F	13	14	0,229-0,345	100	0	0
		Y	D	14	13	0,243-0,298	100	0	0
		Z	G	-	-	-	-	-	-
	II	X	A	14	12	0,223-0,276	100	0	0
			B	14	4	0,262-0,356	100	0	0
			C	13	14	0,211-0,304	100	0	0
			E	12	5	0,213-0,256	100	0	0
			F	10	11	0,231-0,387	100	0	0
		Z	G	-	-	-	-	-	-
	2020	I	X	A	18	6	0,222-0,276	100	0
C				14	13	0,286-0,596	100	0	0
E				12	13	0,277-0,376	100	0	0
Y			B	13	10	0,234-0,298	100	0	0
			D	15	15	0,489-0,543	100	0	0
			H	14	13	0,287-0,307	100	0	0
			I	14	13	0,210-0,312	100	0	0
II		X	A	16	10	0,234-0,298	100	0	0
			C	14	13	0,284-0,596	100	0	0
			E	-	-	-	-	-	-
		Y	B	15	10	0,230-0,303	100	0	0
			D	16	7	0,227-0,653	100	0	0
			H	14	5	0,369-0,499	100	0	0
			I	12	7	0,292-0,388	100	0	0

4.9 Wyniki badań w kierunku zakażeń wirusowych

Zgodnie z założeniami projektu, ocenie podlegała częstotliwość występowania zakażeń wirusowych w stadach gęsi, obserwowana w dwuletnim cyklu produkcyjnym (2019-2020). Materiał do badań pochodził łącznie z 27 stad gęsi tuczowych. Ptaki były poddawane badaniu anatomopatologicznemu, podczas którego pobierano wycinki narządów wewnętrznych (wątroba, śledziona, jelita, nerki) i/lub wymazy kałowe, do dalszych badań w kierunku zakażeń wirusowych.

Wyniki badań w kierunku zakażeń wirusowych przedstawiono w tabeli 18, 19 i 20 oraz na rycinach nr 14 i 15, a wcześniej w tabeli zbiorczej 8 i 9.

W roku 2019 przebadano 13 stad gęsi z czego 7 w I sezonie i 6 w II sezonie. Metodą Real-Time PCR potwierdzono występowanie materiału genetycznego parwowirusa gęsi (GPV) we wszystkich próbach (100%) w obu sezonach produkcyjnych (tj. I i II). Metoda Real-Time PCR cechuje się wysoką czułością i możliwością wykrycia niewielkiej ilości materiału genetycznego wirusa, nie zawsze jednak wystarczającej do przeprowadzenia sekwencjonowania. W związku z tym nie przeprowadzono sekwencjonowania materiału genetycznego pochodzącego ze stad hodowcy C i G w I sezonie oraz hodowcy A, B oraz E w drugim sezonie (tabela 19).

Z kolei zakażenie cirkowirusem gęsi (GoCV) potwierdzono w 6 stadach (46,15%), z czego w 4 stadach (57,14%) w I sezonie (hodowca A, B, E – ZWD X oraz hodowca G – ZWD Z) i w 2 stadach w II drugim sezonie (33,33%) (hodowca B i C – ZWD X).

W przypadku polyomawirusa gęsi (GHPV), 10 stad (76,92%) uzyskało wynik pozytywny z czego w I sezonie 6 stad było dodatnich (85,71%) (hodowca A, B, C, E, F – ZWD X oraz hodowca D – ZWD Y) a w drugim 4 stada (66,66%) (hodowca A, C, E i F – ZWD X) uzyskały wynik pozytywny.

Przeanalizowano również występowanie zakażeń mieszanych w stadach gęsi, m.in. GPV+GHPV, które potwierdzono w 10 stadach (76,92%), z czego 6 stad w I sezonie (85,71%) (hodowcy A, B, C, D, F – ZWD X, hodowca D - ZWD Y) oraz 4 stada w II sezonie (66,66%) (hodowca A, C, E i F – ZWD X).

Z kolei w przypadku zakażeń GPV + GoCV wynik dodatni potwierdzono w 6 przypadkach (46,15%), z czego 4 dodatnie stada wstawiono w I sezonie (57,14%) (hodowca A, B i E – ZWD X oraz hodowca G – ZWD Z) a 2 stada (33,33%) (hodowca B i C – ZWD X) wstawiono w II sezonie.

Analizowano również obecność koinfekcji wywołanej trzema wirusami tj.: GPV+GHPV+GoCV, które potwierdzono w 4 stadach (30,77%) w 2019 r. z czego w 3 stadach (42,85%) (hodowca A, B i E – ZWD X) w pierwszym sezonie i w 1 stadzie (16,66%) (hodowca C – ZWD X) w drugim sezonie.

W roku 2020 przebadano w kierunku zakażeń wirusowych 14 stad gęsi z czego 7 w pierwszym sezonie i 7 w drugim sezonie. Zarówno w I jak i w II sezonie, potwierdzono zakażenia GPV we wszystkich badanych próbkach (100%). Uzyskana ilość materiału genetycznego parwowirusa gęsi nie pozwoliła na przeprowadzenie sekwencjonowania GPV od gęsi ze stad hodowcy A, C, D, E, I w I sezonie oraz hodowcy A, B, D, H, I w II sezonie wstawienia piskląt (tabela 20).

W przypadku wystąpienia klinicznej postaci choroby Derzsy'ego i zaburzenia opierania u gęsi, sekwencjonowano dwukrotnie materiał genetyczny wirusów uzyskany z tego samego stada na różnych etapach odchowu, celem weryfikacji tożsamości szczepów. Taka sytuacja miała miejsce w stadzie hodowcy C w II sezonie 2020 r. Obie badane sekwencje wirusa choroby Derzsy'ego (materiał pobrany w 21 i 35 dobie życia ptaków) należały do wariantu klasycznego GPV (OK085812.1, OK085811.1).

Zakażenia GoCV potwierdzono w 1 przypadku (14,28%) (hodowca A – ZWD X) w I sezonie i w 5 przypadkach (71,43%) (hodowca A, C – ZWD X, hodowca D, E, H – ZWD Y) w II sezonie. W sumie w 6 stadach (42,86%) w 2020 r. potwierdzono zakażenie GoCV. Z kolei, sekwencjonowanie materiału genetycznego GoCV przeprowadzono ze stad hodowcy A w I sezonie oraz A, C, D, E oraz H w II sezonie. Analiza wyników wskazuje, że zakażenia cirkowirusem gęsi diagnozowano z podobną częstotliwością zarówno w roku 2019 (46,15%) jak i 2020 r. (42,86%).

W związku z występującymi problemami zdrowotnymi i podwyższoną śmiertelnością w stadzie hodowcy A (II sezon 2020 r.) sekwencjonowano dwukrotnie materiał

genetyczny GoCV pobrany od gęsi w 63 i 98 dobie życia. Wykazano, że należy on do tej samej grupy filogenetycznej. W związku z powyższym zaprzestano dwukrotnego sekwencjonowania materiału genetycznego wirusów z tego samego stada.

Podsumowując zakażenia cirkowirusem gęsi, nieco częściej stwierdzano w 2019 r. niż w 2020 r. (odpowiednio 46,15% i 42,86%), przy czym w 2019 r. zakażenia te dominowały w I sezonie, zaś w 2020 r. w II sezonie.

Również zakażenia mieszane GPV+GoCV oraz GPV+GoCV+GHPV częściej występowały w 2019 r. niż w 2020 r. (tabela 18).

Wynik dodatni w kierunku zakażeń polyomawirusem gęsi (GHPV) potwierdzono w 6 stadach (42,86%), z czego w I sezonie uzyskano wynik pozytywny w 1 stadzie (14,28%) (hodowca B – ZWD Y) a w II sezonie w 5 stadach (71,43%) (hodowca A, C – ZWD X, hodowca B, D, I – ZWD Y).

Wśród zakażeń mieszanych w 2020 r. dominowały zakażenia GPV+GHPV, które potwierdzono w 6 stadach (42,86%), z czego w 1 stadzie (14,28 %) (hodowca B - ZWD Y) w I sezonie i w 5 stadach (A, C – ZWD X, hodowca B, D, I – ZWD Y) w II sezonie (71,43%). Podobnie, zakażenia mieszane GPV+GoCV, potwierdzono także w 6 stadach (42,86%), z czego w 1 stadzie (14,28%) (hodowca A- ZWD X) w I sezonie i w 5 stadach (71,43%) (A, C – ZWD X, hodowca D, E, H – ZWD Y) w II sezonie. Stosunkowo rzadko w 2020 r. potwierdzono zakażenia mieszane GPV+ GHPV+GoCV. Wynik dodatni uzyskały tylko 2 stada (28,57%) (hodowca A i C – ZWD X) w drugim sezonie, co na przestrzeni całego roku 2020 stanowiło 14,28%.

Generalnie, zakażenia polyomawirusem gęsi notowano częściej w 2019 r. niż w 2020 r., odpowiednio: 76,92% i 42,86%. Również zakażenia mieszane GPV+GHPV oraz GPV+GHPV+GoCV częściej wykrywano w stadach gęsi w 2019 r. niż w 2020 r. (odpowiednio: 76,92%-42,86% i 30,77%-14,28%).

Reasumując zakażenia wirusowe (GoCV, GHPV oraz zakażenia mieszane), częściej stwierdzano w 2019 r. niż w 2020 r., przy czym w 2019 r. był to sezon I.

Tabela 18. Wyniki badań w kierunku zakażeń GPV, GoCV, GHPV oraz zakażeń mieszanych uzyskane w próbkach pobranych od gęsi w 2019 i 2020 r.

Rok	Sezon	Liczba stad dodatnich/ liczba stad badanych oraz udział % dodatnich					
		GPV	GoCV	GHPV	GPV+GHPV	GPV+GoCV	GPV+GHPV+GoCV
2019	I	7 / 7 (100)	4 / 7 (57,14)	6 / 7 (85,71)	6 / 7 (85,71)	4 / 7 (57,14)	3 / 7 (42,85)
	II	6 / 6 (100)	2 / 6 (33,33)	4 / 6 (66,66)	4 / 6 (66,66)	2 / 6 (33,33)	1 / 6 (16,66)
	Razem	13 / 13 (100)	6 / 13 (46,15)	10 / 13 (76,92)	10 / 13 (76,92)	6 / 13 (46,15)	4 / 13 (30,77)
2020	I	7 / 7 (100)	1 / 7 (14,28)	1 / 7 (14,28)	1 / 7 (14,28)	1 / 7 (14,28)	0 / 7 (0)
	II	7 / 7 (100)	5 / 7 (71,43)	5 / 7 (71,43)	5 / 7 (71,43)	5 / 7 (71,43)	2 / 7 (28,57)
	Razem	14 / 14 (100)	6 / 14 (42,86)	6 / 14 (42,86)	6 / 14 (42,86)	6 / 14 (42,86)	2 / 14 (14,28)
Łącznie w 2 letnim cyklu obserwacji		27/27 (100)	12/27 (44,44)	16/27 (59,26)	16/27 (59,26)	12/27 (44,44)	6/27 (22,22)

Tabela 19. Wyniki badań w kierunku zakażeń GPV, GoCV, GHPV oraz zakażeń mieszanych uzyskane w próbkach pobranych od gęsi w 2019 r.

Sezon	ZWD	Hodowca	Nr matrycy/tkanki do PCR	Wiek ptaków (dni)	Wyniki badań						Zakażenia mieszane			
					GPV	sekw.	Nr GenBank	GoCV	sekw.	Nr GenBank	GHPV	GPV+GHPV	GPV+GoCV	GPV+GHPV+GoCV
I	X	A	M/18/2019	35	+	+	OK085817.1	-	-		+	+	-	-
			M/23/2019	70	+	-		+	+	OK070807.1	+	+	+	+
	X	B	M/4/2019	56	+	+	OK085816.1	+	-		+	+	+	+
			M/19/2019	105	+	-		-	-		-	-	-	-
	X	C	M/6/2019	56	+	-		-	-		+	+	-	-
			M/8/2019	28	+	-		-	-		+	+	-	-
	Y	D	M/5/2019	21	+	-		-	-		-	-	-	-
			M/20/2019	91	+	+	OK085819.1	-	-		+	+	-	-
	X	E	M/10/2019	63	+	+	OK085813.1	+	+	OK070804.1	+	+	+	+
	X	F	M/7/2019	56	+	-		-	-		-	-	-	-
M/14/2019			98	+	+	OK085823.1	-	-		+	+	-	-	
Z	G	M/13/2019	15	+	-		-	-		-	-	-	-	
		M/3/2019	35	+	-		+	+	OK070801.1	-	-	+	-	
II	X	A	M/9/2019	63	+	-		-	-		+	+	-	-
			M/12/2019	35	+	-		-	-		-	-	-	-
	X	B	M/1/2019	49	+	-		+	+	OK070800.1	-	-	+	-
	X	C	M/15/2019	98	+	-		+	+	OK070806.1	-	-	+	-
			M/22/2019	112	+	+	OK085820.1	+	-		+	+	+	+
			M/25/2019	14	+	-		-	-		+	+	-	-
	X	E	M/2/2019	98	+	-		-	-		-	-	-	-
			M/21/2019	105	+	-		-	-		+	+	-	-
	X	F	M/24/2019	98	+	+	OK085821.1	-	-		+	+	-	-
	Z	G	M/11/2019	77	+	+	OK085815.1	-	-		-	-	-	-

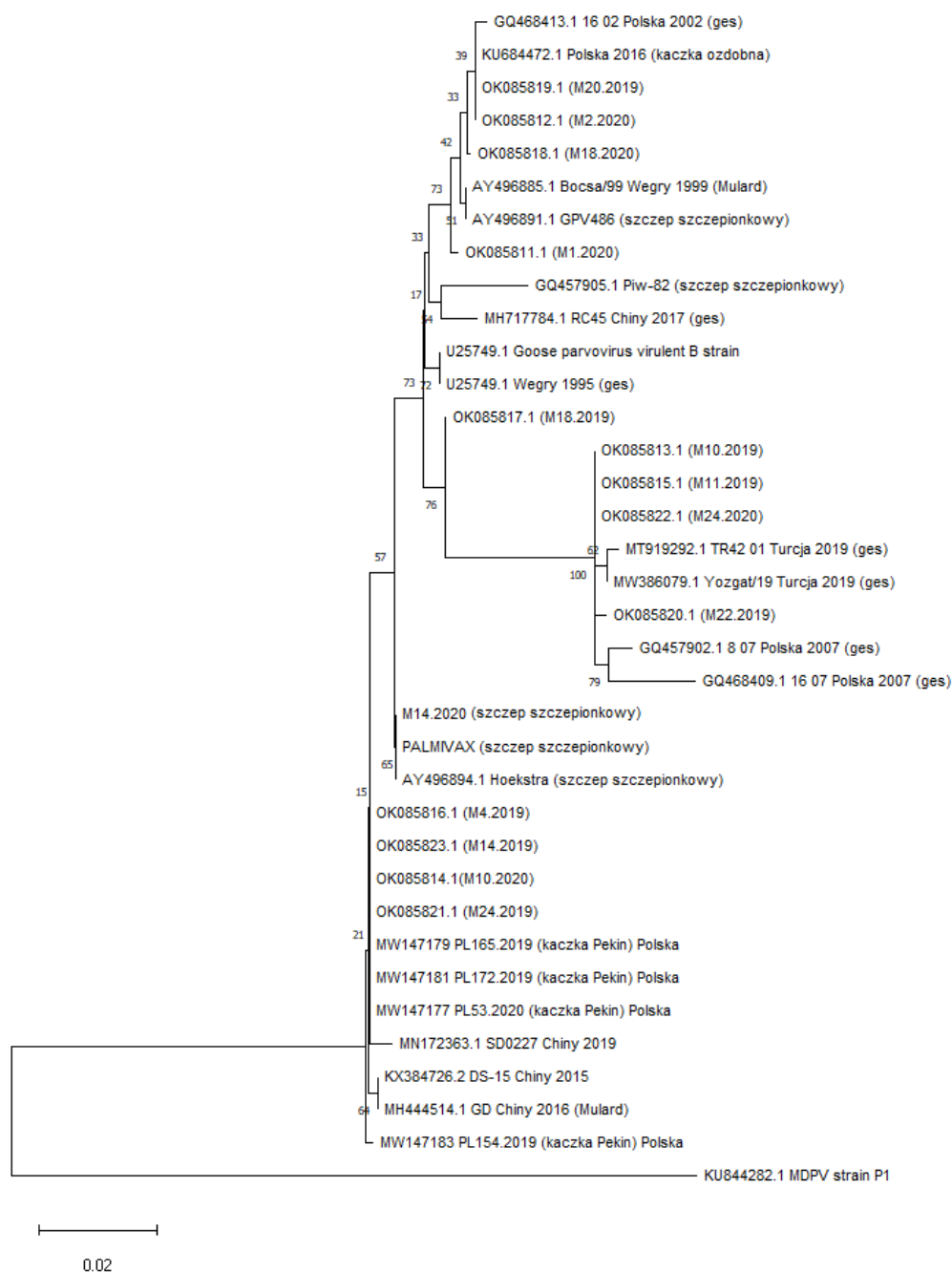
Tabela 20. Wyniki badań w kierunku zakażeń GPV, GoCV, GHPV oraz zakażeń mieszanych uzyskane w próbkach pobranych od gęsi w 2020 r.

Sezon	ZWD	Hodowca	Nr matrycy/tkanki do PCR	Wiek ptaków (dni)	Wyniki badań						Zakażenia mieszane			
					GPV	sekw.	Nr GenBank	GoCV	sekw.	Nr GenBank	GHPV	GPV+GHPV	GPV+GoCV	GPV+GHPV+GoCV
I	X	A	M/4/2020	98	+	-		+	+	OK070808.1	-	-	+	-
	Y	B	M/18/2020	21	+	+	OK085818.1	-	-		-	-	-	-
			M/19/2020	35	+	-		-	-		+	+	-	-
	X	C	M/5/2020	35	+	-		-	-		-	-	-	-
			M/20/2020	105	+	-		-	-		-	-	-	-
	Y	D	M/17/2020	21	+	-		-	-		-	-	-	-
			M/14/2020	84	+	-		-	-		-	-	-	-
	X	E	M/16/2020	35	+	-		-	-		-	-	-	-
Y	H	M/10/2020	28	+	+	OK085814.1	-	-		-	-	-	-	
		M/12/2020	91	+	-		-	-		-	-	-	-	
Y	I	M/3/2020	56	+	-		-	-		-	-	-	-	
II	X	A	M/13/2020	63	+	-		+	+	OK070805.1	+	+	+	+
			M/7/2020	98	+	-		+	+	OK070809.1	-	-	+	-
			M/11/2020	112	+	-		-	-		-	-	-	-
	Y	B	M/15/2020	42	+	-		-	-		+	+	-	-
	X	C	M/2/2020	21	+	+	OK085812.1	-	-		+	+	-	-
			M/1/2020	35	+	+	OK085811.1	+	+	OK070803.1	+	+	+	+
			M/23/2020	126	+	-		-	-		-	-	-	-
	Y	D	M/9/2020	63	+	-		+	+	OK070811.1	-	-	+	-
			M/22/2020	119	+	-		-	-		+	+	-	-
	Y	E	M/24/2020	49	+	+	OK085822.1	+	+	OK070802.1	-	-	+	-
	Y	H	M/8/2020	21	+	-		+	+	OK070810.1	-	-	+	-
Y	I	M/6/2020	28	+	-		-	-		+	+	-	-	

4.9.1 Wyniki analizy filogenetycznej w oparciu o uzyskane sekwencje GPV

Analizę filogenetyczną przeprowadzono w oparciu o fragment genu kodującego białko VP1 i porównano do sekwencji GPV zdeponowanych w bazie GenBank. Otrzymane sekwencje zaklasyfikowano do 2 odrębnych grup filogenetycznych: 9 sekwencji należy do grupy tworzonej przez klasyczny szczep wirusa GPV (cGPV) tj.: OK085819.1, OK085812.1, OK085818.1, OK085811.1, OK085817.1, OK085813.1, OK085815.1, OK085822.1, OK085820.1 zaś pozostałe 4 do grupy szczepu określanego jako novel GPV (nGPV) tj.: OK085816.1, OK085823.1, OK085814.1, OK085821.1. Wyłącznie 1 sekwencja jest zgodna z sekwencją szczepu Hoekstra (M/14/2020) (szczepionkowego). Sekwencje z filogrupy cGPV są podobne do sekwencji izolowanych wcześniej w Polsce i na Węgrzech. W grupie filogenetycznej utworzonej ze szczepu nGPV znajdowały się także sekwencje pochodzące z badanych w Polsce stad kaczek pekin. Sekwencje wirusa nGPV pochodzące ze wspomnianej pracy, tworzą odrębną grupę filogenetyczną wraz ze szczepami pochodzącymi z Chin, zaś homologia między nimi jest na poziomie między 98,57% a 99,28% (rycina 14).

Rycina 14. Drzewo filogenetyczne skonstruowane metodą najbliższego sąsiada (ang. neighbor-joining method) dla pełnych sekwencji genomów badanych parwowirusów pochodzących od gęsi (2019 i 2020 r.) oraz sekwencji referencyjnych pochodzących z bazy GenBank. Ocena istotności statystycznej analizy filogenetycznej przeprowadzono przy użyciu testu typu bootstrap, wykonując 1000 powtórzeń.



4.9.2 Wyniki analizy filogenetycznej w oparciu o uzyskane sekwencje GoCV

Analizę filogenetyczną przeprowadzono w oparciu o cały genom cirkowirusa gęsi liczący 1821 par zasad. Sekwencje porównano z innymi dostępnymi w bazie GenBank genomami cirkowirusa gęsi oraz fragmentami genomu z sekwencji izolowanych w latach wcześniejszych w Polsce. Z analizy własnych wyników badań wynika, że 11 sekwencji (OK070800.1, OK070801.1, OK070802.1, OK070807.1, OK070803.1, OK070804.1, OK070810.1, OK070811.1, OK070805.1, OK070808.1, OK070809.1) wykazywało się wysoką homologią do siebie i do izolowanego wcześniej w Polsce szczepu DG1 z 2014 r. Tylko jedna sekwencja (OK070806.1 - hodowca C, II sezon 2019 r.) była podobna do sekwencji węgierskich i polskich izolowanych na przełomie lat 2013-2016 (rycina 15).

Rycina 15. Drzewo filogenetyczne skonstruowane metodą najbliższego sąsiada (ang. neighbor-joining method) dla pełnych sekwencji genomów badanych cirkowirusów pochodzących od gęsi (2019 i 2020 r.) oraz sekwencji referencyjnych pochodzących z bazy GenBank. Ocenę istotności statystycznej analizy filogenetycznej przeprowadzono przy użyciu testu typu bootstrap, wykonując 1000 powtórzeń.

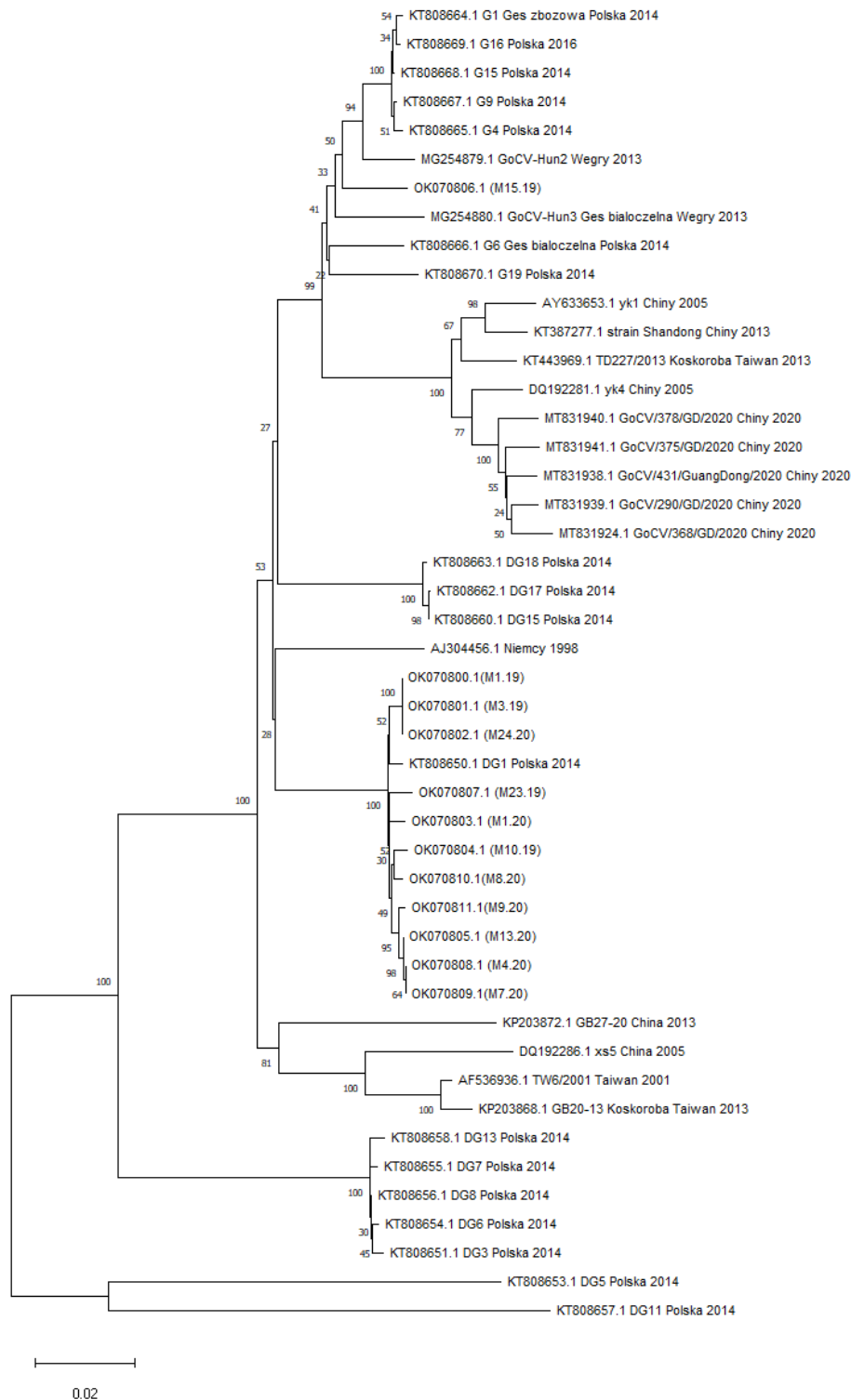


Tabela 21. Podsumowanie stanu zdrowotnego stad gęsi badanych w 2019 i 2020 r.

Rok	Sezon	Hodowca	ZWD	Wielkość stada	Długość tuczu [dni]	Śmiertelność [%]*	Uwagi
2019	I	A	X	6700	112	6	2 krotne wystapienie kolibakteriozy, infekcja <i>Gallibacterium anatis</i> , GoCV + GHPV
		B	X	13000	114	8	kolibakterioza, aspergilloza, GoCV + GHPV
		C	X	4500	98	3	GHPV
		D	Y	6900	99	4	2 krotne wystapienie kolibakteriozy, aspergilloza, GHPV
		E	X	7777	110	6	aspergilloza, kolibakterioza, zaburzenie opierzania u gęsi, GoCV + GHPV
		F	X	8000	112	5	kolibakterioza, GHPV
		G	Z	4500	100	6	kolibakterioza, zaburzenie opierzania u gęsi, GoCV
	II	A	X	7500	114	4	<i>E. coli</i> , aspergilloza, GHPV
		B	X	11300	116	8	aspergilloza, kolibakterioza, GoCV
		C	X	4500	120	10	aspergilloza, 2 krotne wystapienie kolibakteriozy w stadzie, GoCV + kliniczna postać HNEG
		E	X	7500	98	4	<i>E. coli</i> , aspergilloza, GHPV
		F	X	7500	120	5	kolibakterioza, GHPV
		G	Z	4500	116	3	<i>E. coli</i>
	2020	I	A	X	7500	114	4
B			Y	13000	100	7	2 krotne wystapienie kolibakteriozy, GHPV
C			X	3000	120	3	<i>E. coli</i>
D			Y	7500	135	5	aspergilloza, kolibakterioza
E			X	7000	122	3	<i>E. coli</i>
H			Y	3700	118	4	kolibakterioza
I			Y	7200	120	5	kolibakterioza
II		A	X	8000	140	7	aspergilloza, kolibakterioza, zaburzenie opierzania u gęsi, GoCV + GHPV
		B	Y	8000	135	10	kolibakterioza, różyca, infekcja <i>Gallibacterium anatis</i> , GHPV
		C	X	3500	140	11	kolibakterioza, różyca, zaburzenia opierzania u gęsi, GPV + GoCV + GHPV, kliniczna postać ch. Derzsy'ego
		D	Y	7000	139	6	kolibakterioza, GoCV + GHPV
		E	X	4500	123	4	kolibakterioza, GoCV
		H	Y	4000	133	5	2 krotne wystapienie kolibakteriozy, GoCV
		I	Y	7000	125	6	kolibakterioza, salmonelloza, GHPV

*średni wskaźnik śmiertelności dla stada gęsi wynosi do 5%

Tabela 21 przedstawia status zdrowotny stad gęsi stanowiących grupę badawczą, analizowany w 2 letnim cyklu produkcyjnym tj. 2019-2020. Jak wynika z oceny wyników badań najczęściej stwierdzano infekcję *E. coli*, choć nie zawsze oznaczała ona kliniczną postać kolibakteriozy, co miało miejsce w stadach A, E i G (II sezon 2019r.) oraz A, C i E (I sezon 2020 r.).

Przyczyną zwiększonych upadków na wczesnych etapach odchowu była także aspergiloza, stwierdzana częściej u gąsiąt w 2019 r. W przypadku infekcji *Gallibacterium anatis* nie można powiedzieć jednoznacznie czy była bezpośrednią przyczyną wzrostu śmiertelności w stadzie gęsi (hodowca A, I sezon 2019 r. i hodowca B, II sezon 2020 r.), z uwagi na potwierdzenie we wspomnianych stadach dodatkowych czynników wnikających jak *E. rhusiopathiae*, GoCV czy GHPV.

Ponadto, w stadach zainfekowanych włoskowcem różycy (hodowca B i C, II sezon 2020 r.) obserwowano znaczny wzrost upadków wśród ptaków starszych, w wieku powyżej 13 tygodni. Z kolei salmonelloza, nie miała znacznego wpływu na wzrost śmiertelności w stadzie. Wpływała natomiast na pojawienie się problemów lokomotorycznych i różnicowania masy ciała badanych ptaków.

We wszystkich stadach potwierdzono obecność materiału genetycznego parwowirusa gęsi, co nie oznaczało wystąpienia klinicznej postaci choroby Derzsy'ego. Infekcja mogła mieć natomiast wpływ na status zdrowotny badanych stad a także pełnić rolę czynnika immunosupresyjnego (zdjęcie 1).

W przypadku potwierdzenia obecności materiału genetycznego GoCV wśród badanych stad, nie zawsze wynik dodatni wiązał się z zaburzeniami opierzenia u ptaków, choć w 4 przypadkach miało to miejsce (hodowca E i G, sezon I 2019 r. oraz hodowca A i C, sezon II 2020 r.). We wspomnianych stadach potwierdzono także koinfekcję GHPV a także zakażenia bakteryjne (*E. coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*) i grzybicze (zdjęcie 1).

Pomimo wysokiej częstotliwości izolacji materiału genetycznego polyomawirusa gęsi z badanych stad, tylko w jednym zanotowano kliniczną postać HNEG (hodowca C, sezon II 2019 r.). W tym przypadku potwierdzono także koinfekcję GoCV i GPV, a stado 2 krotnie leczono w trakcie tuczu na kolibakteriozę. W tym samym stadzie zdiagnozowano aspergillozę na etapie odchowu gęsi (zdjęcie 2,3,4).

Reasumując, przyczyną gorszych efektów produkcyjnych w badanych stadach gęsi były zakażenia wirusowe wraz z koinfekcją bakteryjną, głównie *E. coli*, rzadziej *E. rhusiopathiae* i *G. anatis* oraz grzybiczymi na wczesnych etapach odchowu.



Zdj. 1. Kliniczna postać choroby Derzsy'ego a także zaburzenia opierzania gęsi w wieku 4 tygodni, w przebiegu koinfekcji GPV+GoCV+GHPV (hodowca C, II sezon 2020 r.) (M. Chmielewska-Władyka).



Zdj. 2. 8-tygodniowa gęś pochodząca ze stada w którym zdiagnozowano HNEG (hodowca C, sezon II 2019 r.). Widoczne objawy porażenia nóg, skrzydeł oraz skręt szyi, wypływ z dzioba (M. Chmielewska-Władyka).



Zdj. 3. Kryształy moczanów zalegające w nerkach w przebiegu HNEG u gęsi wieku 8 tygodni (hodowca C, sezon II 2019 r.) (M. Chmielewska-Władyka).



Zdj.4. Krwotoczne zapalenie jelit w przebiegu HNEG u gęsi w wieku 8 tygodni (hodowca C, sezon II 2019 r.) (M. Chmielewska-Władyka).

5. Omówienie wyników i dyskusja

Polska zalicza się do grona liderów w produkcji drobiarskiej w Europie, w tym drobiu wodnego. Od 2018 r. rynek gęsiny w naszym kraju pozostaje względnie stabilny, a pogłowie gęsi oscyluje w granicach 1 mln sztuk. Główny udział w tych ilościach stanowią gęsi tuczowe, z których to, otrzymywane jest wysokiej jakości mięso a także podroby czy puch i pierze, stanowiące cenny surowiec o właściwościach termicznych.

Stada gęsi objęte badaniami były zlokalizowane w województwie dolnośląskim, wielkopolskim oraz łódzkim. Pisklęta wstawiane na fermy pochodziły z 3 różnych zakładów wylęgu drobiu. Liczebność stad wahała się od 3 do 13 tys. sztuk, przy czym średnio stanowiła około 7 tys. sztuk. Gęsi z grupy badawczej były utrzymywane w systemach półintensywnych, zawsze z dostępem do wolnego wybiegu. Ptaki żywiono gotowymi mieszankami paszowymi lub koncentratem z udziałem zbóż (pszenicy, kukurydzy, soi, owsa). W okresie letnim, część stad miała dostęp do pastwisk lub świeżej zielonki. Średni okres tuczu wynosił 98 dni, choć w roku 2020, kiedy wybuchła pandemia COVID-19, zdarzały się przypadki ubijania gęsi w wieku 140 dni. Masa ubojowa ptaków wahała się w granicach 5,5-6,8 kg, a stada o mniejszej liczebności często uzyskiwały wyższą masę ubojową. Współczynnik zużycia paszy również był zmienny, w zależności od zadawania ptakom zielonki. Średnie zużycie paszy na kg przyrostu masy ciała wynosiło 5,5 kg i można go było obniżyć do około 5 kg poprzez zadawanie ptakom zielonki/siana.

W niniejszej rozprawie doktorskiej, podjęto próbę określenia statusu zdrowotnego stad gęsi tuczowych w Polsce, ze szczególnym uwzględnieniem poziomu przeciwciał matczynych przeciwko parwowirusowi gęsi (anty-GPV). Monitoring stad prowadzono w dwuletnim cyklu obserwacji i dotyczył on 27 stad gęsi tuczowych. Badania prowadzone podczas pracy nad niniejszą rozprawą, dotyczyły głównie zakażeń bakteryjnych oraz wirusowych w stadach gęsi. Dodatkowo omówiono także zakażenia grzybicze, które dość często występują w stadach drobiu wodnego i rzutują w konsekwencji na wartość biologiczną piskląt oraz dalszy odchów. Badania obejmowały również analizę oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki wyizolowanych szczepów *E. coli* oraz zdolność tworzenia biofilmu przez te szczepy. Diagnostyka oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe obejmowała oprócz określenia wartości MIC dla każdego ze

szczepów, także ocenę występowania genów oporności na antybiotyki oraz chemioterapeutyki. Określono również prevalencję występowania genów zjadliwości.

Badania w kierunku zakażeń wirusowych dotyczyły z kolei, oceny zakażeń badanych stad parwowirusem gęsi (GPV), cirkowirusem (GoCV) oraz polyomawirusem gęsi (GHPV). Wyizolowany materiał genetyczny GPV i GoCV poddano sekwencjonowaniu genetycznemu aby określić pokrewieństwo filogenetyczne dla tych wirusów. Ponadto, z uwagi na różnicę w dostępności na rynku w okresie badawczym szczepionek dla gęsi przeciwko chorobie Derzsy'ego, podjęto się analizy obecności i poziomu swoistych przeciwciał przeciwko parwowirusowi u gąsiąt. Uważam, że wyniki powyższej pracy uzupełnią lukę informacyjną dotyczącą aktualnej zdrowotności stad gęsi w Polsce.

W ostatnich latach obserwujemy intensyfikację produkcji drobiarskiej, jej zwiększoną koncentrację oraz wzrost liczby cykli produkcyjnych w danym roku. Wiąże się to z takimi konsekwencjami jak rosnące ryzyko wystąpienia chorób zakaźnych. Analiza przeprowadzonych badań bakteriologicznych wykazała, że najczęściej izolowano od gęsi pałeczkę *E. coli*. Bakterie te stwierdzano w materiale badawczym niezależnie od wieku ptaków (okresu tuczu), przy czym w przypadku ptaków starszych, zdarzało się że izolacja *E. coli* była związana z wystąpieniem kolibakteriozy w stadzie. Nie mniej jednak, należy podkreślić, że w stadach z kliniczną postacią kolibakteriozy diagnozowano także GPV, GoCV lub GHPV a także mieszane infekcje wirusowe, co zdecydowanie przyczyniło się do obniżenia końcowych efektów produkcyjnych. Do dalszych badań zabezpieczono 43 szczepy *E. coli*. Ponadto, z poszczególnych stad wyizolowano także 2 szczepy *E. rhusiopathiae*, 2 szczepy *G. anatis* oraz 1 szczep *S. Typhimurium*.

Istnieje wiele doniesień dotyczących występowania zakażeń pałeczką *E. coli* wśród ludzi, gdzie źródłem zakażenia mogą być zwierzęta a także żywność z nich wytwarzana. Niektóre patotypy *E. coli* mają zdolność zakażenia ludzi i zwierząt, choć należy pamiętać, że jest to bakteria wchodząca w skład naturalnej mikroflory jelitowej. Atypowa enteropatogenna *E. coli* (ang. Atypical EPEC - aEPEC) może zakażać zarówno ludzi jak i zwierzęta, a także nasilać objawy już trwających infekcji. Adorjan i wsp. (2021) zidentyfikowali 7 enteropatogennych szczepów *E. coli* (aEPEC) pochodzących od ptaków (kaczek, gęsi, indyków, kurcząt i gołębi), w tym 2 od gęsi. Izolaty te wykazywały fenotyp wielolekooporny (MDR), który zdaniem autorów może być skutkiem okresowego podawania ptakom środków przeciwdrobnoustrojowych.

Zagadnienie występowania pałeczek *E. coli* u drobiu jest istotne także z punktu narastającej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe co stanowi zagrożenie dla zdrowia publicznego. W związku z tym, ścisłej kontroli poddaje się powstawanie, rozprzestrzenianie się i utrzymywanie w środowisku bakterii opornych na antybiotyki. Pałeczka *E. coli* może pełnić rolę donora, wektora a także biorcy genów oporności na antybiotyki, które mogą być przenoszone ze zwierząt na ludzi poprzez kontakt bezpośredni, żywność a także przez środowisko. Badania Massaccesi i wsp. (2021) wskazują, że również gęsi mogą zanieczyszczać środowisko bakteriami opornymi na antybiotyki, rozsiewając je wraz z kałem. Jednakże ryzyko to może zostać zminimalizowane poprzez przestrzeganie dobrych praktyk hodowlanych, w tym rozważnego stosowania antybiotyków oraz zmniejszenie zagęszczenia ptaków.

Badania własne wykazały, że szczepy bakteryjne izolowane od gęsi, szczególnie *E. coli* charakteryzowały się wysoką opornością i wielolekoopornością (MDR) na antybiotyki i chemioterapeutyki. Panujący obecnie trend w Unii Europejskiej zmierza do ograniczenia ilości stosowanych antybiotyków u zwierząt. Jak wynika z raportu EMA (ang. European Medicines Agency - EMA) całkowita sprzedaż antybiotyków weterynaryjnych w krajach europejskich spadła o ponad 34% w latach 2011-2018. Sprzedaż cefalosporyn III i IV generacji spadła o 24%, polimyksyn o 70%, fluorochinolonów o 4% a pozostałych chinolonów o 74%. Pociuszający jest fakt, że dane spływające z 25 krajów raportujących do EMA, potwierdzają spadek sprzedaży środków przeciwdrobnoustrojowych (mg/PCU – milligrams of active substance sold per population correction unit) na poziomie 43%, również w latach 2011-2020, zwłaszcza w tych krajach gdzie sprzedaż była największa tj. Francja, Niemcy, Holandia, Hiszpania czy Wielka Brytania. Największe ilości sprzedanych środków przeciwdrobnoustrojowych w stosunku do łącznej ilości mg/PCU, w 31 krajach europejskich stanowiły: penicyliny 31,1%, tetracykliny 26,7% i sulfonamidy 9,9%. Ogólnie te trzy grupy obejmowały 67,7% całkowitej sprzedaży w 31 krajach. Analiza wyników badań własnych wykazała, że na wyżej wymienione 3 grupy leków przeciwdrobnoustrojowych było opornych 11 szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi w 2019 r. (47,82%) oraz 9 szczepów *E. coli* wyizolowanych w 2020 r. (45%).

Wyznaczenie wartości MIC a także ocena prevalencji występowania genów zjadliwości oraz oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, pozwoliła na wstępną ocenę zjawiska lekooporności wśród badanych izolatów *E. coli* wyizolowanych od gęsi.

Wysoką oporność względem badanych antybiotyków i chemioterapeutyków odnotował Zhang i wsp. (2021), którzy potwierdzili oporność na przynajmniej 3 grupy środków przeciwdrobnoustrojowych u 80,7% izolatów *E. coli* pozyskanych od zdrowego drobiu wodnego w Chinach, sklasyfikowanych następnie jako szczepy MDR. Najwyższą oporność autorzy zanotowali w przypadku amoksycyliny, sulfametoksazolu, chloramfenikolu oraz doksycyliny, co stanowi odzwierciedlenie najczęściej stosowanych leków w stadach drobiu wodnego w Chinach. Jednak żaden z szczepów MDR nie był odporny na wszystkie 10 testowanych przez Zhang i wsp. (2021) związków przeciwdrobnoustrojowych. Podobne wyniki zanotował zespół Sgariglia i wsp. (2019), gdzie spośród 19 badanych antybiotyków tylko 2 wykazywały pełną skuteczność (100%) wobec szczepów *E. coli* izolowanych od drobiu we Włoszech, w tym od gęsi i były to antybiotyki z grupy cefalosporyn: ceftazydym oraz cefoksytyna. Z kolei największą oporność zanotowano w odniesieniu do penicyliny i kwasu nalidyksowego. Wysoką wrażliwość na leki z grupy cefalosporyn potwierdzili także Dube i Mbanga (2018), gdzie 89% izolatów pobranych od drobiu (w tym gęsi i kaczek) w Zimbabwie, było wrażliwych na ciprofloksacynę. Również wyniki badań Liu i wsp. (2018), wskazują na znaczną oporność pałeczek *E. coli* izolowanych od drobiu wodnego, ponieważ 22 szczepy (34,4%) były odporne na wszystkie badane środki przeciwdrobnoustrojowe. Tylko 19 z 64 szczepów *E. coli* (29,7%) było wrażliwych na florfenikol.

Analiza własnych wyników badań wskazuje na występowanie oporności wśród wyizolowanych szczepów *E. coli* na amoksycylinę na poziomie 78,26% (izolowanych w 2019 r.) i 50% (izolowanych w 2020 r.). Ta wysoka oporność koreluje z wysokim odsetkiem szczepów *E. coli* posiadających gen oporności na betalaktamy, których obecność potwierdzono u 62,5% szczepów badanych w 2019 r. oraz 55% szczepów pozyskanych w 2020 r. Również wysoką oporność na amoksycylinę odnotował zespół Zhang i wsp. (2021), którą potwierdzono wśród 79,7% izolatów *E. coli* uzyskanych z wymazów z kloaki od klinicznie zdrowych gęsi i kaczek w Chinach. Wyniki badań Liu i wsp. (2013) również potwierdzają występowanie genów oporności m. in. na betalaktamy (*bla*CTX-M-55) i fluorochinolony (*oqxAB floR*), z izolatu pochodzącego od gęsi. Ponadto, profil oporności wspomnianego szczepu obejmował kwas nalidyksowy, ciprofloksacynę, cefotaksym, ampicylinę, chloramfenikol, florfenikol, tetracyklinę i ceftiofur.

W przypadku enrofloksacyny, która jest chemioterapeutykiem szeroko stosowanym na fermach drobiu, wykazano, że w 2019 r. 34,78% szczepów *E. coli* było

opornych na ten lek, z kolei w 2020 r. odsetek ten zmniejszył się do 20%. Wśród badanych izolatów *E. coli* nie wykazano obecności genów warunkujących oporność na fluorchinolony. W dostępnym przeglądzie piśmiennictwa brak jest danych odnośnie potwierdzenia występowania genów oporności na fluorochinolony (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*) wśród izolatów *E. coli* pochodzących od gęsi. Potwierdzono natomiast, obecność genów warunkujących oporność na fluorochinolony wśród pałeczek *E. coli* izolowanych u innych gatunków drobiu m.in. brojlerów czy kur niosek (Seo i Lee, 2020).

Natomiast Chen i wsp. (2012) opisali występowanie genów zlokalizowanych na ruchomych elementach genetycznych - plazmidach (ang. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance - PMQR): *qnrA1*, *qnrA3*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB9*, *qnrB10*, *qnrS1*, *qnrS2* u 15% izolatów *E. coli* pochodzących od gęsi.

Z kolei, większość badanych własnych szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi wykazywała wrażliwość na florfenikol. Tylko 3 izolaty (13,04%) w 2019 r. oraz 4 izolaty (20%) pochodzące z 2020 r., wykazywały wzrost na podłożu mimo stężenia antybiotyku przekraczającego 8µg/ml. Jak wynika z badań własnych również prevalencja występowania genów oporności na amfenikole była niewielka. Odsetek szczepów *E. coli* wyizolowanych w 2019 r., który posiadał sekwencje charakterystyczną dla genu *cat1* wynosił 4,43%, *cat2* z kolei 8,69%. W 2020 r. udało się potwierdzić występowanie genu *cat2* tylko u jednego szczepu (5%). Odmienne wyniki zaprezentował Liu i wsp. (2013), którzy potwierdzili występowanie genu *floR* z izolatu *E. coli* pochodzącego od gęsi, wykazującego także oporność na florfenikol. Podobnie Zhang i wsp. (2021) także potwierdzili występowanie genu *floR* wśród 94,5% badanych izolatów, wykazujących oporność na chloramfenikol (65% szczepów opornych).

Ponad połowa badanych szczepów z 2019 r. była oporna na tetracyklinę (56,52%) i oksytetracyklinę (52,17%), a w kolejnym roku 2020, odsetek szczepów opornych wzrósł do 70%. Ponadto, 9 szczepów (39,13%) pochodzących z 2019 r. i 10 szczepów (50%) wyizolowanych w 2020 r., posiadało gen *tetA* warunkujący oporność na tetracykliny. Podobnie Zhang i wsp. (2021) wykazali także wysoką oporność na tetracykliny (63,5% szczepów opornych), oraz wysoką prevalencje występowania genów determinujących oporność na tetracykliny (94,2% w przypadku genu *tetA* oraz 44,4% dla genu *tetB*). W badaniach własnych, w 2020 r. potwierdzono u 2 szczepów (10%) występowanie genu *tetB*. Również wysoki odsetek szczepów *E. coli* opornych na tetracykliny (43%) potwierdziła Sgariglia i wsp. (2019), którzy pobierali próby do badań z różnych systemów

hodowli i gatunku ptaków (brojlerów, kur, gęsi, kogutów, perliczek, kaczek oraz gołębi i indyków).

W rozprawie przeanalizowano także wyniki dotyczące występowania oporności szczepów *E. coli* na sulfonamidy, która kształtowała się na wysokim poziomie zarówno w roku 2019 jak i 2020. Oporność na sulfadimetoksynę stwierdzono u 73,91% szczepów izolowanych w 2019 r. i 75% szczepów izolowanych w 2020 r., z kolei dla sulfadiazyny i trimetoprim opornych było 52,17% w 2019 r. i 35% w 2020 r. Wysokie poziomy oporności na sulfonamidy odnotował Zhang i wsp. (2021), gdzie oporność szczepów *E. coli* osiągnęła poziom 69,8%, natomiast odmiennie prezentują się wyniki Sgariglia i wsp. (2019), którzy stwierdzili tylko 25% szczepów *E. coli* opornych na sulfametoksazol.

W badaniach własnych ponad połowa izolatów wykazywała oporność na sulfatiazol (52,17% w 2019 r. i 60% w 2020 r.). Wśród izolatów *E. coli* pochodzących od gęsi wykryto wszystkie trzy badane geny oporności na sulfonamidy *sul1*, *sul2*, *sul3*, z czego po 3 szczepy (13,04%) posiadały gen *sul2* oraz *sul3* a u dwóch szczepów potwierdzono występowanie genu *sul1* (8,69%). Występowanie genów *sul1* i *sul2* u izolatu *E. coli* pochodzącego od gęsi potwierdziła także Ćwiek i wsp. (2021)

Podkreślić należy stosunkowo niską oporność szczepów *E. coli* na kolistynę, szczególnie izolatów z 2019 r. (4,35%) i wyższą izolatów z 2020 r. (20%). Uzyskane wyniki są niezwykle istotne w kontekście problemu narastania oporności na kolistynę, która określana jest w medycynie człowieka jako antybiotyk ostatniej szansy. Podobne wyniki przedstawiają Zhang i wsp. (2021), którzy wyizolowali tylko 10% szczepów *E. coli* opornych na kolistynę, pochodzących od gęsi w Chinach. Natomiast Massaccesi i wsp. (2021) nie odnotowali oporności na kolistynę wśród badanych szczepów *E. coli* pochodzących od gęsi we Włoszech.

W badaniach własnych, potwierdzono tylko u 1 szczepu obecność genu oporności na polimyksyny (*mcr-1*) u izolatu *E. coli* z 2019 r., natomiast odmienne wyniki prezentują Zhang i wsp. (2018), którzy potwierdzili obecność genu *mcr-1* na poziomie 71,6%, wśród szczepów *E. coli* pozyskanych z wymazów z kloaki oraz nosogardzieli od zdrowych gęsi. Ponadto, badania Zhang i wsp. (2018) potwierdzają występowanie genów *mcr-2* u 5,5% oraz *mcr-3* u 11,9% szczepów *E. coli* izolowanych od tych gęsi. Z kolei, Jarma i wsp. (2021), nie potwierdzili obecności genu *mcr-1* wśród szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi gęgawej (*Anser anser*).

Jednym z elementów badań było wyznaczenie profili oporności, których utworzono 12 w roku 2019 i 10 w roku 2020. Najczęściej występującym profilem wielolekooporności (21,74% szczepów *E. coli*) w 2019 r. był: AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ oraz profile AMOX FFN OXY TET SDM SXT STZ (8,69% szczepów *E. coli*) i AMOX ENRO OXY TET (8,69% szczepów *E. coli*). W roku 2020, najczęściej wyznaczono profil oporności na 5 grup chemioterapeutyków: AMOX ENRO FFN OXY TET SDM SXT STZ (10%) oraz profil AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ (10% szczepów *E. coli*). Z kolei, najczęściej wyznaczanym profilem wielolekooporności w badaniach przeprowadzonych przez zespół Zhang (2021) był profil AML-CTX-CRO-SXT-DO-C (amoksycylina-cefotaksym-ceftriakson-trimetoprim i sulfametoksazol-doksycylina-chloramfenikol), który występował w przypadku 24 izolatów co stanowiło 7,7% szczepów. Podobne wyniki przedstawił zespół Liu (2013), który wyznaczył następujący profil wielolekooporności: AMP-CHL-FFC-TET-CTI (ampicylina, chloramfenikol, florfenikol, tetracyklina, ciprofloksacyna) dla wyizolowanego od gęsi szczepu *E. coli*. Odmienne wyniki przedstawili z kolei Dube i Mbang (2018), którzy z próbek kału zdrowych gęsi, wyizolowali 29 szczepów *E. coli*, które najczęściej prezentowały profil oporności: AMP-CX-BA (4 szczepy) oraz CX-BA (2 szczepy) (ampicylina, kloksacylina, bacytracyna). Z kolei badania Ćwiek i wsp. (2021) wskazują, że izolat pochodzący od gęsi, był oporny na 9 różnych antybiotyków/chemioterapeutyków: ampicylina, kw. nalidyksowy, ciprofloksayna, chloramfenikol, kolistyna, tetracyklina, tigecyklina, sulfametoksazol, trimetoprim. Profil oporności badanego przez Ćwiek i wsp. (2021) szczepu *E. coli* pochodzącego od gęsi, składał się z 6 różnych klas środków przeciwdrobnoustrojowych: AMP NAL CIP CHL CST TET TGC SMX TMP.

Poza określeniem prevalencji genów oporności na antybiotyki, podjęto się także oceny częstości występowania genów wirulencji wśród badanych szczepów *E. coli* wyizolowanych od gęsi. Najczęściej potwierdzano obecność genu *iss* (56,5%) oraz *iucD* (39,1%) u szczepów z 2019 r. Podobne wyniki uzyskano wśród szczepów *E. coli* w kolejnym roku, kiedy najczęściej stwierdzano gen *iucD* (75%), *iss* (70%) oraz *irp2* (65%). Wysoką częstotliwość występowania genów *iucD*, *cva A/B* *cvi* *cvaC*, *irp2* oraz *iss* wśród wszystkich badanych szczepów [n=16] APEC oraz non-APEC izolowanych m.in. od gęsi potwierdziła także Sgariglia i wsp. (2019). Obecność tych genów w przypadku obu grup *E. coli* (APEC i non-APEC) może sugerować, że nie są one związane ze zjadliwością, choć istnieją badania potwierdzające wirulencję genu *iss*, obecnego u szczepów *E. coli*

izolowanych od kurcząt (Ellis i wsp. 1988). Ponadto, Sgariglia i wsp. (2019) wykazali, że geny *irp2* i *iucD*, odpowiedzialne za pozyskiwanie żelaza, mają tendencję do jednoczesnej obecności na danym szczepie *E. coli*. Teza ta, znajduje potwierdzenie także w badaniach własnych, gdzie w 2019 r. stwierdzono jednoczesną obecność genów *irp2* oraz *iucD* na 3 szczepach *E. coli*, a w roku 2020 aż na 12 szczepach *E. coli*. Również wyniki badań Zhang i wsp. (2021) dowodzą wysokiej prewalencji występowania genów *iucD* (99,7%) oraz *iss* (98,4%) wśród szczepów *E. coli* wyizolowanych od zdrowych gęsi. Badania Zhang i wsp. (2021) obejmowały także korelację obecności genów oporności na antybiotyki (ang. ARGs) z występowaniem genów wirulencji (ang. VAGs). W rezultacie autorzy potwierdzili pozytywną korelację pomiędzy obecnością genów oporności na antybiotyki (np. *qnrS*) a genami zjadliwości (np. *iss*). Dokładne znaczenie takiego połączenia nie jest do końca zbadane, wiadomo jednak, że gen *iss* jest na ogół zlokalizowany na koniugacyjnym plazmidzie R, który koduje oporność na tetracyklinę i ampicylinę, z kolei gen *qnrS* warunkuje oporność na fluorochinolony (Johnson i wsp., 2002). W rezultacie potrzebne są dalsze badania służące ocenie ryzyka przenoszenia genów zjadliwości oraz oporności na antybiotyki przez ptactwo wodne, które jest niewątpliwie rezerwuarem wyżej wymienionych genów.

Analiza wyników własnych badań wskazuje, że najrzadziej w roku 2019 diagnozowano geny zjadliwości *papC* (4,35%) oraz *ast2* (8,7%), zaś w roku 2020 gen *astA* (5%), *papC* (15%) i *vat* (10%). Odmienne wyniki zaprezentował zespół Zhang S. (2021), który potwierdził występowanie gen *vat* wśród 92 izolatów *E. coli* (29,58%). Gen *papC*, z kolei, uważany jest za ważny gen wirulencji, który jak wynika z badań Sgariglia i wsp. (2019) występuje wśród szczepów APEC.

Zhang i wsp. (2021) oraz Sgariglia i wsp. (2019) potwierdzili występowanie co najmniej jednego genu wirulencji we wszystkich badanych szczepach *E. coli* pochodzących od gęsi, natomiast analiza wyników własnych wskazuje, że 15% (izolaty z 2019 r.) i 26,1% (izolaty z 2020 r.) nie posiadało żadnego z badanych genów zjadliwości.

System chowu drobiu wodnego znacznie różni się od systemów utrzymania drobiu grzebiącego. Rodzaj konstrukcji linii pojenia oraz ilość zużywanej wody przez ptaki wpływa znacząco na tworzenie się biofilmu. Ponadto, praktykowany dość często „chów na zakładkę”, sprzyja przenoszeniu drobnoustrojów pomiędzy stadami z różnych grup wiekowych. Przemysł drobiarski interesuje się problematyką biofilmu głównie w aspekcie skuteczności podawania środków przeciwdrobnoustrojowych. Powstawanie biofilmu jest również jednym z punktów krytycznych w przemyśle spożywczym, ze

względu na potencjalną możliwość zanieczyszczenia żywności patogenami wywołującymi zatrucia u ludzi. Struktura biofilmu to duże wyzwanie dla produkcji zwierzęcej z uwagi na możliwość formowania się na powierzchniach metalowych oraz plastikowych, które są powszechnie obecne w systemach pojenia czy karmienia zwierząt. Ponadto, biofilm nadaje bakteriom specyficzne właściwości, dzięki którym są bardziej odporne na mycie i dezynfekcję a także utrudnia penetrację środków przeciwdrobnoustrojowych do komórki bakteryjnej (Rodrigues i wsp., 2019).

W badaniach własnych dokonano oceny intensywności tworzenia biofilmu przez pałeczki *E. coli* izolowane od gęsi na wszystkich etapach produkcji. Wykazano, że wszystkie szczepy *E. coli* produkowały biofilm na różnym poziomie intensywności. Najwyższy odsetek szczepów *E. coli* tworzył biofilm na średnim poziomie, odpowiednio 82,6% (2019 r.) i 70% (2020 r.). Otrzymane wyniki są spójne z badaniami Ćwiek i wsp. (2021), którzy także ocenili zdolność tworzenia biofilmu przez szczep *E. coli* na średnim poziomie, w przypadku izolatu pochodzącego od gęsi, zaś na niskim poziomie (58,82%) szczepy *E. coli* pochodzące od brojlerów oraz indyków. Także Skyberg i wsp. (2007), ocenili zdolność tworzenia biofilmu na średnim poziomie przez izolaty AFEC oraz APEC pochodzących od brojlerów oraz indyków (odpowiednio 75,7% i 55,2%). Niewątpliwie, pewne rozbieżności w ocenie mogą wynikać z ograniczeń samej metody badawczej prowadzonej na płytkach mikrotitracyjnych. Warto podkreślić, że pojedyncze kultury bakterii pochodzące od danego gatunku drobnoustrojów mogą inaczej zachowywać się w warunkach *in vitro*, niż różnorodna populacja bakterii występująca w środowisku naturalnym. Badania Skyberg i wsp. (2007), wykazały, że żaden z badanych przez nich szczepów *E. coli* nie tworzył jednocześnie silnie biofilmu na różnych badanych trzech podłożach (tj. 1/20 TSB, BHI oraz M61).

Ostatnie badania Pyzik i wsp. (2022) potwierdziły zdolność bakteriofagów wyizolowanych od kaczek do eradykacji biofilmu tworzonoego przez *E. coli*. Wskazuje to na możliwość wykorzystania bakteriofagów do kontroli tworzenia biofilmu przez patogenne szczepy *E. coli*, niezależnie od gatunku drobiu.

Badania Cepas i wsp. (2020) nie potwierdziły z kolei, związku pomiędzy opornością wielolekową a tworzeniem biofilmu i podobnie jak we wcześniejszych analizach, wspomniani badacze stwierdzili porównywalny poziom tworzenia biofilmu zarówno w izolatach *E. coli* wielolekoopornych jak i nie opornych wielolekowo.

Wśród zakażeń bakteryjnych, potwierdzono także zakażenie włoskowcem różycy (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) w badanych fermach gęsi. Wcześniejsze badania Bobrek i wsp. (2016) przeprowadzone w roku 2015 potwierdzają również występowanie różycy u gęsi. Ptaki badane przez Bobrek i wsp. (2016) pochodziły z 11-tygodniowego stada, które miało dostęp do wybiegów. Podobnie, we własnej grupie badawczej, 2 stada zakażone *E. rhusiopathiae*, korzystały z wybiegów, na których mogły przebywać dziki będące rezerwuarem włoskowca różycy.

Izolowane od gęsi szczepy *E. rhusiopathiae* charakteryzowały wrażliwością na amoksycylinę, amoksiklav, florfenikol i enrofloksacynę podobnie jak izolaty opisane przez Gawła i wsp. (2007).

Ostatnie wyniki badań Dec i wsp. (2021) wskazują, na występowanie różnych serowarów *E. rhusiopathiae* u drobiu wodnego. Zebrany materiał badawczy z lat 2015-2020, stanowiły wymazy z narządów wewnętrznych gęsi (47 sztuk) oraz kaczek (3 sztuki) pobranych podczas badań anatomopatologicznych, z których wyizolowano w sumie 50 szczepów włoskowca różycy. Wykazano, że serotypem najczęściej izolowanym od drobiu wodnego był serotyp 5 (46%) oraz 1b (28%). Natomiast szczepy pochodzące od świń, należą z reguły do serotypu 1a i 2. Ponadto, zespół Dec (2021) potwierdził, że różycyca jest skorelowana z wiekiem ptaków oraz porą roku - jej występowanie notuje się zazwyczaj jesienią u ptaków starszych.

Różycę diagnozowano też sporadycznie w USA, na co wskazują badania Silva i wsp. (2020), którzy na przestrzeni lat 2000-2019 potwierdzili 2 przypadki (5,26%) różycy u gęsi w grupie 38 sztuk ptaków (kaczek, przepiórek, kur niosek i gęsi).

Z uwagi na charakter zoonotyczny włoskowca różycy, może on stanowić zagrożenie dla ludzi. W ostatnim czasie ukazała się praca Meier i wsp. (2021) dotycząca wystąpienia różycy u 58-letniej kobiety, która uległa zakażeniu podczas przeprowadzania badania sekcyjnego gęsi ze stada, w którym zdiagnozowano następnie różycę.

W badaniach własnych wyizolowano także, jeden szczep *S. Typhimurium*, który pochodził ze stada 4-tygodniowych gęsi, liczącego 7000 sztuk. Po przeprowadzonej antybiotykoterapii oraz podaniu preparatów uzupełniających fizjologiczną florę bakteryjną i dezynfekcję bieżącą, nie stwierdzano pałeczek *Salmonella* w próbkach kału pobranych przed ubojem. Natomiast niepokojące są informacje podane ostatnio przez Pasim i wsp. (2021), dotyczące obecności pałeczek *Salmonella* w próbkach kału

pobieranych ze stad gęsi na terenie naszego kraju. Ze 143 próbek kału pobieranych przez powiatowych lekarzy, aż 52 uznano za dodatnie w kierunku obecności pałeczek *Salmonella* (36,36%). Uzyskane szczepy *Salmonella* należały do 13 różnych serowarów, z czego dominującą większość stanowiła *S. Typhimurium* (48,94%), następnie *S. Enteritidis* (15,96%) jednofazowy wariant *S. Typhimurium* (8,51%), *S. Indiana* i *S. Kottbus* (po 6,38%) oraz inne rzadziej spotykane serowary np.: *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Schleissheim*.

Występowanie *S. Typhimurium* w całym łańcuchu produkcyjnym gęsi, obejmującym wylęgarnię, stada towarowe, ubojnię oraz sieć dystrybucji, potwierdził zespół Wang i wsp. (2020). Próby do badań pobierano w latach 2017-2018 z wielkotowarowej fermy gęsi reprodukcyjnych (20 tys. sztuk) oraz gęsi tuczowych (100 tys. sztuk). Wyniki badań innych autorów wskazują również na dużą różnorodność serowarów *Salmonella* izolowanych od gęsi na różnych etapach produkcji, a także inkubacji jaj gęsich. Su i wsp. (2011) donoszą, że z pobieranych przez nich wymazów z błon podskorupowych w wylęgarni drobiu wodnego, najczęściej izolowane były pałeczki *S. Potsdam* oraz *S. Montevideo* należące do serogrupy C1 oraz *S. Albany* należąca do serogrupy C2. Ponadto, podejrzewa się że *S. Potsdam* wyewoluowała genotypy specyficzne dla drobiu wodnego np. 3 i 4 dla gęsi i kaczek oraz 5 dla gęsi. Izolaty *Salmonella* pozyskane na wylęgarni z błon podskorupowych jaj gęsi i kaczek, utworzyły w sumie 5 różnych grup antybiogramów w zależności od: genotypu, gatunku czy miejsca pobrania. Większość izolatów należała do „antybiogramu A”, który oznaczał wrażliwość na wszystkie badane środki przeciwdrobnoustrojowe. Antybiogram dla 7 wykrytych izolatów *S. Potsdam* również należał do grupy A i wskazywał, że 95,33% badanych szczepów było wrażliwych na wszystkie testowane przez zespół Su i wsp. (2011) środki przeciwdrobnoustrojowe.

Różnorodność serowarów *Salmonella* występująca u drobiu wodnego na świecie jest bardzo duża. Wskazują na to badania przeprowadzone na przestrzeni lat 2008-2010 w Iranie, które wykazały, że najczęściej izolowanym serowarem od gęsi i kaczek jest *S. Thompson* (65,4%), zaś pozostałe izolaty jak: *S. Enteritidis* (9.3%), *S. Paratyphi C* (8.4%), *S. Hadar/S. Virginia* (7.5%) oraz *S. Typhimurium* (1.9%) stanowiły znacznie mniejszy odsetek. Wyizolowane szczepy były odporne na tetracyklinę (63,6%), kwas nalidyksowy 40.2%, streptomycynę 29.9% oraz trimetoprim 28%. Ponadto, 32,7% izolatów *Salmonella* spp. były szczepami MDR. (Jamali i wsp., 2014)

Liu i wsp. (2018) potwierdził wrażliwość szczepów *Salmonella spp.* na enrofloksacynę oraz florfenikol. Z kolei, badania Cao i wsp. (2020) wskazują na znaczną, bo aż 71,4% oporność pałeczek *Salmonella* izolowanych z farm gęsi w północnych Chinach. Autor wykazał, że najwięcej szczepów było opornych na amoksyliny, tetracyklinę, trimetoprim/sulfametoksazol, chloramfenikol i florfenikol. Ponadto, Chen i wsp. (2019) potwierdzili, że ponad 85% szczepów *Salmonella* wyizolowanych ze środowiska ubojni, supermarketów oraz środowiska chlewni i kurników było opornych na co najmniej jeden antybiotyk a 50,43% izolatów były to szczepy MDR. Pałeczki *Salmonella* wyizolowane z próbek pobranych w supermarketach i rzeźniach wykazywały oporność na tetracyklinę (73,04%), ampicylinę (66,96%) i doksycylinę (59,13%). Uzyskany w badaniach własnych szczep *S. Typhimurium* był oporny na enrofloksacynę oraz flumechinę i średniowrażliwy na amoksylinę.

Zagrozenie w produkcji drobiarskiej stanowią także bakterie warunkowo chorobotwórcze, których patogenność koreluje ze szczepem bakteryjnym, stanem fizjologicznym gospodarza czy drogą zakażenia. Jednym z przedstawicieli bakterii oportunistycznych jest *Gallibacterium anatis*, diagnozowana u klinicznie zdrowych kurcząt w wymazach z górnych dróg oddechowych, układu rozrodczego oraz końcowego odcinka przewodu pokarmowego. Istnieją doniesienia, że koinfekcja z innymi patogenami m.in. wirusem IBV, *E. coli*, *Avibacterium paragallinarum* oraz *Mycoplasma gallisepticum* może nasilać przebieg choroby u kurcząt powodując zwiększoną zachorowalność oraz śmiertelność (Singh i wsp., 2015).

W badaniach własnych wyizolowano 2 szczepy *G. anatis*, z których jeden był oporny na tylozynę i tylmikozynę a drugi, wielolekooporny tj. oporny na doksycylinę, enrofloksacynę, flumechinę, spektynomycynę, tylmikozynę, trimetoprim/sulfametoksazol. Ponadto, zakażenia *Gallibacterium anatis* diagnozowano w stadach równolegle zakażonych *E. coli* i/lub *E. rhusiopathiae* oraz polyomawirusem. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że Bisgaard i wsp. (2009) wyodrębnili nowy takson *Gallibacterium* u gęsi - *Gallibacterium salpingitidis sub. Nov* (takson 2). Badania tych autorów obejmowały 23 izolaty pochodzące z krajów europejskich, zebrane w ciągu ostatnich 30 lat.

W kraju brakuje badań nad tymi drobnoustrojami. Ostatnie krajowe badania wskazują, że *G. anatis* coraz częściej izoluje się od różnych gatunków drobiu, najczęściej z górnych dróg oddechowych ale też z układu rozrodczego ptaków w okresie nieśności oraz z

końcowego odcinka przewodu pokarmowego (Karwańska i wsp., 2021). Zróżnicowana jest również oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki tych bakterii. Hess i wsp. (2020) wykazali, że 96% badanych szczepów to szczepy MDR odporne na tetracyklinę (89%), tylozynę (95%), enrofloksacynę (58%), kwas nalidyksowy (77%) oraz sulfametoksazol (77%). Również Bojesen i wsp. (2011) potwierdzili aż 92% szczepów opornych na tetracyklinę i aż 97% szczepów opornych na sulfametoksazol, wyizolowanych w latach 2000-2001 od brojlerów w Danii. Równie wysoka była oporność na antybiotyki/chemioterapeutyki szczepów *G. anatis* wyizolowanych w Niemczech od brojlerów, indyków i kuropatw (El-Adway i wsp., 2018). Autorzy potwierdzili oporność na sulfametoksym (93,3%), spektynomycynę (93,9%), tylozynę (86,7%) i oksytetracyklinę (80%).

W badaniach własnych nie wyizolowano od gęsi pałeczek *Pasteurella*, chociaż wyniki badań wielu autorów wskazują na częste występowanie tych drobnoustrojów w stadach drobiu wodnego. Badania przeprowadzone przez Kuczkowskiego i wsp. (2006) dotyczące występowania *P. multocida* w stadach drobiu w Polsce w latach 2001-2003 pozwoliły wyizolować 43 szczepy *Pasteurella* spp. a 36 (83,7%) z nich stanowiło podgatunek *Pasteurella multocida* spp. *multocida* (30 izolatów od gęsi, 6 izolatów od indyków). Co ciekawe, na 975 przebadanych stad kurcząt i kur niosek w latach 2001-2003 pałeczki *Pasteurella* wyizolowano tylko z 2 stad kur niosek (0,2%). Pałeczki *Pasteurella* izoluje się od indyków i innych gatunków ptaków na co wskazują ostatnie wyniki badań Smith i wsp. (2021). Wyniki badań Liu i wsp. (2018), wskazują że wyizolowane od drobiu wodnego szczepy *Pasturella multocida* były wrażliwe na cefazolinę (60%) oraz florfenikol (60%), zaś szczepy wyizolowane przez Kuczkowskiego i wsp. (2006) wrażliwe były na amoksycylinę, amoksycylinę z kwasem klawulonowym, kolistynę i gentamycynę.

Istotnym problemem w produkcji drobiu wodnego są zakażenia grzybicze, które w badaniach własnych zdiagnozowano w ponad połowie stad gąsiąt w 2019 r. (53,84%). Natomiast, w roku 2020 częstotliwość infekcji *Aspergillus fumigatus* w stadach gęsi była zdecydowanie niższa - 21,42%. Badania przeprowadzone na terenie Turcji w latach 2000-2002 przez Beytut i wsp. (2004) potwierdzają znaczną częstotliwość izolacji grzybów z rodzaju *Aspergillus* u gąsiąt, a także pojawienie się postaci układowej związanej z wystąpieniem guzków grzybiczych w obrębie błony surowiczej narządów mięsoszowych jamy brzusznej, bursy Fabrycjusza oraz mięśni długich szyi (*m. longus colli*) łącznie ze

zmianami w płucach i workach powietrznych. Izolację grzybów z gatunku *Aspergillus* od gęsi, opisuje w swoich badaniach także Ziółkowska i wsp., (2014) którzy uzyskali 85 izolatów *A. fumigatus* pochodzących z 8 ferm gęsi hodowanych w Polsce. Materiał do badań stanowiły wymazy z jamy dziobowej pobierane przyżyciowo od zdrowych ptaków oraz pośmiertnie płuca i worki powietrzne od ptaków wykazujących objawy chorobowe. Leczenie zakażeń grzybiczych zarówno u ludzi jak i zwierząt jest problematyczne, stąd wiele preparatów przeciwgrzybiczych jest nieskutecznych, na co wskazują badania Ziółkowskiej i wsp. (2014). Autorzy wykazali, że wszystkie szczepy [n=85] pochodzące od gęsi były odporne na mikonazol, a oporność na pozostałe azole oraz amfoterycynę B wahała się w granicach 90,6-70,6%. Z kolei, badania Nawrot i wsp. (2019) wykazały, że większość badanych szczepów *A. fumigatus* wyizolowanych m.in. od gęsi, było wrażliwych na itrakonazol (59/60 badanych szczepów) a wszystkie wykazały wrażliwość na posakonazol, worykonazol i izawukonazol.

Ważnym zagadnieniem poruszonym w niniejszej rozprawie doktorskiej była ocena obecności i poziomu przeciwciał matczynych anty-GPV, występujących we krwi badanych gęsiąt. Jak wynika z badań we wszystkich surowicach pobranych od gęsi, zarówno w roku 2019 jak i 2020 występowały swoiste przeciwciała matczyne anty-GPV. Fakt zróżnicowania poziomu przeciwciał należy tłumaczyć wiekiem ptaków, od których pobierano krew. Nie były to 1-3 dniowe pisklęta lecz gąsięta w wieku 10-18 dni. Najniższa wartość OD z wszystkich przebadanych stad wynosiła 0,155, zaś najwyższa 0,653. Należy uznać, że gąsięta z badanych stad były dobrze zabezpieczone przeciwciałami matczynymi anty-GPV na pierwszy okres odchowu. Natomiast badania Piekarskiej i wsp. (2021a), wskazują na wyższe zakresy mian przeciwciał anty-GPV, jednak te przeciwciała stwierdzano w surowicach 1-dniowych gąsiąt. Wyżej wymienieni autorzy, w surowicach pobranych w 2018 r. od gęsi, określili najwyższe średnie wartości OD na poziomie 0,552, w roku 2019 - 0,518; w 2020 - 0,513 a w 2021 r. - 0,281. Ponadto, autorzy wykazali, że 91,18% wyników to wyniki dodatnie, 6,44% - wątpliwe oraz tylko 2,38% to wyniki ujemne, co świadczy o skutecznym programie immunoprofilaktyki. Wcześniejsze badania Samorek-Salamonowicz i Kozdrunia (2012) z lat 1998-2011 wskazują na obecność przeciwciał przeciwko GPV we wszystkich badanych stadach ptaków (n=122) do 5 tygodnia życia. Badane gęsi pochodziły ze stad reprodukcyjnych szczepionych dwu- lub trzykrotnie przeciwko chorobie Derzsy'ego, zarówno szczepionką żywą jak i inaktywowaną. Wartości OD w tym przypadku, kształtowały się

w przedziale od 0,150 do 0,220 u ptaków do 3 tygodnia życia, co mogło świadczyć o obecności przeciwciał matczynych.

Zastosowany we własnych badaniach test ELISA do oznaczania swoistych przeciwciał anty-GPV został opracowany i opatentowany przez PIW- PIB w Puławach, a antygen stanowił w tym przypadku oczyszczony wirus GPV (namnożony wcześniej na hodowli fibroblastów zarodka gęsiego, ang. GEF). Do wykrywania swoistych przeciwciał anty-GPV na świecie, oprócz standardowych testów ELISA stosuje się pośredni test ELISA (i – ELISA ang. indirect ELISA), wykorzystujący oczyszczone białko wirusa VP2 jako antygen do wykrywania swoistych przeciwciał w surowicy oraz test SN (ang. Serum Neutralization Test- SN) (Fan i wsp., 2013). W Chinach z kolei, opracowano test ELISA, który pozwala różnicować przeciwciała powstałe w surowicy gąsiąt immunizowanych od tych powstających po zakażeniu (Zhang i wsp., 2020).

Niezwykle istotny element pracy stanowiły badania dotyczące zakażeń wirusowych, skutkujące często wysokimi upadkami, zróżnicowaniem stada czy powikłaniami w postaci trudno leczącej się kolibakteriozy. Nie ulega wątpliwości, że straty spowodowane przez infekcje wirusowe i bakteryjne (w tym *E. coli*), wynikają głównie ze wzrostu śmiertelności, obniżonej masy ubojowej, podwyższenia Europejskiego Wskaźnika Wydajności (EWW), a także wysokich kosztów leczenia. Do najgroźniejszych chorób występujących u gęsi należy choroba Derzsy’ego. Mimo dostępnej immunoprofilaktyki, zarówno w kraju jak i na świecie, rokrocznie notowane są kolejne przypadki wystąpienia tej jednostki chorobowej. Jak wynika z analizy własnych wyników badań, we wszystkich stadach (100%) zarówno w roku 2019 jak i 2020 stwierdzono obecność materiału genetycznego wirusa GPV. Należy jednak podkreślić, że identyfikacja materiału genetycznego GPV w badanym stadzie nie zawsze wiązała się z wystąpieniem klinicznej postaci choroby Dersy’ego. Choć zdarzały się przypadki, utraty upierzenia u ptaków, zwiększonych upadków i charłactwa w stadzie, zwłaszcza jeśli u badanych ptaków potwierdzono koinfekcję cirkowirusem gęsi. Natomiast z badań Czekaj i wsp. (2021) wynika, że na 85 przebadanych stad gęsi tuczowych oraz reprodukcyjnych na przestrzeni lat 2012-2020, prewalencja występowania GPV była znacznie mniejsza – na poziomie 31,8%.

Analiza filogenetyczna materiału genetycznego parwowirusa gęsi, uzyskanego w trakcie badań własnych wykazała, że większość sekwencji należała do wariantu klasycznego GPV. Pozostałe 4 sekwencje, z kolei należały do grupy szczepu określanego jako novel

GPV (nGPV). Występowanie nGPV potwierdzono dość niedawno (emerging virus) - po raz pierwszy wirus został opisany przez Palya i wsp. (2009), którzy badali próbki narządów wewnętrznych (wątroby, śledziony, serca) pobrane w latach 2002-2006 ze stad kaczek mallard.

Potwierdzenie obecności nGPV na badanych fermach gęsi wynikało prawdopodobnie z faktu utrzymywania w tych samych obiektach inwentarskich kaczek pekin, będących rezerwuarem nGPV. Należy podkreślić, że wirus ten jest także czynnikiem etiologicznym syndromu karłowatości i skróconego dzioba kaczek (SBDS). Przypadki zakażenia kaczek pekin nGPV potwierdzono w Chinach w 2015 r. a od 2019 r. nGPV jest wykrywany również w Polsce (Matczuk i wsp. 2020).

Jak wynika z badań Zhang i wsp. (2019), nGPV nie zakaża gęsich fibroblastów, natomiast namnaża się na fibroblastach kaczych. Sugeruje to także odrębny tropizm nGPV w stosunku do klasycznego GPV (cGPV). W literaturze brak jest danych o możliwości zakażenia nGPV gęsi.

Potwierdzono także obecność jednej sekwencji zgodnej z sekwencją szczepu szczepionkowego Hoekstra (M/14/2020), którą wyizolowano na fermie utrzymującej jednocześnie stado kaczek pekin, które zostało wcześniej poddane szczepieniu szczepionką Palmivax zawierającą w swoim składzie wspomniany szczep parwowirusa.

Również badania Samorek-Salamonowicz i Kozdrunia (2012), prowadzone w latach 1998-2011 potwierdziły bliskie pokrewieństwo szczepów GPV (92-100%) oraz ich europejskie pochodzenie. Ponadto, autorzy potwierdzili w 6 badanych stadach gęsi w wieku 5-6 tygodni, mieszane zakażenie GPV i GoCV.

Kolejne badania przeprowadzone przez Woźniakowskiego i wsp. (2009) pozwoliły zakwalifikować polskie szczepy GPV do grupy 1 na podstawie analizy filogenetycznej opartej na sekwencji nukleotydowej produktów PCR regionu VP1, z kolei analiza fragmentu VP2 pozwoliła wyznaczyć 6 grup, z czego polskie szczepy znalazły się w grupie 4 i 6 a różnice między nimi potwierdzono poprzez analizę znanej sekwencji aminokwasów białka VP2. Analiza białka VP3 polskich i zagranicznych szczepów zebranych w bazie danych GenBank pozwoliła wyodrębnić 9 grup filogenetycznych a trzy z nich (1,5 i 9) stanowiły szczepy Polskie.

W związku z licznymi przypadkami choroby Derzsy'ego w 2019 r. w Turcji, Isidan i wsp. (2021) podjęli się analizy obecności materiału genetycznego wirusa zarówno w zależonych jajach gęsi jak i narządach gęsi wykazujących objawy zakażenia wirusem GPV. Autorzy zaprojektowali w tym celu nowy, zdegenerowany zestaw starterów do identyfikacji regionu kodującego białko VP3 wirusa GPV. Analiza uzyskanych sekwencji wykazała, że szczepy tureckie były powiązane klastrami ze szczepami europejskimi i szczepami szczepionkowymi. Jak się okazało geny strukturalne GPV są bardzo stabilne w środowisku i wykazały tylko 0,3% zmienności w ciągu ostatnich 20 lat. Analiza filogenetyczna GPV oparta o fragment A genów VP1-VP2 przeprowadzona przez Isidan i wsp. (2021), wykazała że badane szczepy terenowe były blisko spokrewnione ze szczepami europejskimi (grupa 2), w której zawierały się szczepy szwedzkie, szczepy węgierskie oraz szczepy słabo patogenne i szczepionkowe.

Obecnie coraz częściej diagnozowane są zakażenia kaczek i gęsi nowymi rekombinantami parwowirusów drobiu wodnego. Infekcję gęsi szczepem 20-0910G, będącym rekombinantem parwowirusa kaczki piżmowej (ang. Recombinant MDPV - rMDPV) odnotował zespół Li i wsp. (2021) w 2021 r. Za powstanie nowego wariantu parwowirusa odpowiadają klasyczny wirus kaczki piżmowej (MDPV) oraz klasyczny parwowirus gęsi (GPV), u których doszło do rekombinacji na promotorze P9 oraz częściowo w obrębie regionu VP3. Podczas eksperymentalnego zakażenia gęsi okazało się, że jest on wysoce zjadliwy dla zarodków gęsi a także piskląt, wywołując u nich 100% śmiertelność. Rezerwuarem nowego wariantu są prawdopodobnie dzikie gęsi, które mogą przetransmitować go na dalekie odległości w trakcie migracji. Rekombinacja wirusów to istotny mechanizm ewolucji, dzięki któremu patogeny mogą poszerzyć liczbę gospodarzy i pozwolić wirusowi na uniknięcie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dlatego transpozycja w obrębie regionu VP3, który jest kluczowym białkiem strukturalnym parwowirusów ptactwa wodnego, stanowi poważne zagrożenie epidemiologiczne. Zaistnienie tego procesu jest powodem dla którego rMDPV tak łatwo zakaża gęsi. Powyższe doniesienia ukazały się bardzo niedawno, w związku z czym w badaniach własnych nie podjęto się analizy fragmentu VP3. Nie mniej jednak, podkreślić należy, że najlepszą metodą identyfikacji szczepów wirusów jest sekwencjonowanie całego genomu wirusa, co wiąże się z koniecznością namnażania wirusa na zarodkach gęsi.

Wysoka homologia genomu parwowirusów sprawia, że związek genetyczny pomiędzy chorobą Derzsy'ego, parwowirozą kaczki piżmowej a odkrytym całkiem niedawno

nowym wariantem syndromu karłowatości i skróconego dzioba (novel Goose Parvovirus - nGPV), pozostaje w obrębie zainteresowań wielu ośrodków naukowych. Jak donosi zespół Chen i wsp. (2021), dopasowanie sekwencji parwowirusów na podstawie analizy genu VP pomiędzy nGPV a klasycznym GPV wynosi 90,9-97,5% oraz 80,9-91,5% w przypadku parwowirusa kaczki piżmowej – MDPV. Z kolei, w przypadku badania sekwencji aminokwasów genu VP, homologia pomiędzy nGPV a klasycznym GPV wynosiła 95,1-98,2%, a między nGPV a MDPV 88,0-92,6%, co ma niewątpliwe znaczenie w dalszych badaniach nad opracowaniem szczepionki przeciwko parwowirowi. Badania Wan i wsp. (2018) także potwierdzają wysoki stopień tożsamości nukleotydów genu NS w klastrze MDPV ($\geq 98,1\%$) oraz w klastrze GPV ($\geq 93,9\%$).

Analiza wyników własnych wskazuje, że zakażenia cirkowirusem gęsi są stosunkowo często diagnozowane w stadach tuczowych gęsi w kraju. Aż 46,15% stad w 2019 r. i 42,85% stad w 2020 r. uznano za dodatnie pod kątem występowania GoCV. Wcześniejsze badania Kuczkowskiego i wsp. (2010) przeprowadzone w 2005 r. wykazały, że ponad 60% stad gęsi towarowych powyżej 5 tygodnia życia było zakażonych GoCV. Analiza filogenetyczna tych szczepów GoCV potwierdziła wysokie podobieństwo (84-99%) analizowanych sekwencji nukleotydów genu C1 (kodującego białko kapsydu) z sekwencjami izolatów z Niemiec, Chin i Tajwanu. Z kolei, badania przeprowadzone przez Yao i wsp. (2022) wykazały nieco niższą częstotliwość występowania GoCV (35,5%) w stadach gęsi w Chinach.

Również wykryte w latach 2002-2003, przez Ting i wsp. (2021) szczepy cirkowirusa pochodzące od gęsi, były wysoce stabilne w rejonie Tajwanu, a homologia genomu między nimi wynosiła 97%. Badania własne, również wskazują na wysoką homologię sekwencji wyizolowanych szczepów GoCV względem siebie, a także zdiagnozowanego w roku 2014 w Polsce szczepu DG1 pochodzącego od gęsi domowej (*Anser anser*) (Stenzel i wsp. 2018). Także badania Yao i wsp. (2022) wskazują na wysoką homologię wyizolowanych 37 sekwencji GoCV względem siebie (89,8-99,9%) a także względem szczepów GoCV izolowanych wcześniej w Chinach (89,8-99,7%).

Z kolei analiza filogenetyczna szczepów z Tajwanu przeprowadzona przez Chen i wsp. (2003), wskazuje że tajwańskie izolaty GoCV należą do trzech grup filogenetycznych, gdzie różnice wynosiły 7.0-7.7% pomiędzy wirusami i 0.2-1.0% pomiędzy

poszczególnymi grupami, co po raz kolejny dowodzi bliskiego pokrewieństwa badanych szczepów.

Podkreślić należy, że w krajach azjatyckich, w populacji drobiu wodnego stwierdza się bardzo różne zakażenia mieszane, w tym GoCV łącznie z wirusem grypy ptaków H9 na co wskazują wyniki badań z Chin (Niu i wsp., 2018). Autorzy wspomnianej pracy, zbadali 127 stad gęsi w okresie jednego roku (od 1.12.2014 do 31.12.2015) wskazując, że częstotliwość infekcji wynosiła 40,4% w przypadku grypy ptaków H9 i 42,3 % w przypadku GoCV. Ponadto, Niu i wsp. (2018) wykazali, że częstotliwość tych infekcji zwiększała się wraz z wiekiem ptaków.

Najnowsze badania przeprowadzone przez Chen J. i wsp. (2021a), trwające od grudnia 2019 do sierpnia 2020 r. w Chinach, pozwoliły na uzyskanie 31 kompletnych genomów GoCV uzyskanych ze 164 próbek dodatnich potwierdzonych badaniem PCR. Autorzy wykazali, że ponad połowa badanych próbek była dodatnia w kierunku GoCV, a 31,1% z nich pochodziła z koinfekcji przynajmniej jednym dodatkowym wirusem (np. wirusem Tembusu, paramyksowirusem drobiu wodnego, wirusem grypy ptaków, adenowirusem typu 4 (hypervirulent fowl adenovirus serotype 4 - FAdV-4) a także wirusem pomoru kaczek).

Przesiewowe badania Stenzla i wsp. (2018) dotyczące infekcji GoCV u gęsi dzikich i domowych wykazały że warianty GoCV od dzikich i domowych gęsi występują w różnych grupach genotypowych. Autorzy potwierdzili także rekombinacje pomiędzy „domowymi” a „dzikimi” genotypami cirkowirusów. Wskazuje to na ryzyko zakażenia ptaków domowych patogenami od ptaków dzikich, które przemieszczają się na odległe obszary geograficzne (Stenzel i wsp. 2018). Również Matczuk i wsp. (2015) potwierdzili spokrewnienie cirkowirusa kaczek domowych (DuCV) i dzikich z rodziny kaczkowatych (tj. uhla- *Melanitta fusca*) jednak bez oznak rekombinacji. Ostatnie badania, przeprowadzone przez Kaszab i wsp. (2020), dotyczące występowania GoCV u ptactwa dzikiego na Węgrzech, potwierdziły jego występowanie u 9 różnych gatunków ptaków z rodzaju *Anseriformes*, *Suliformes*, *Pelecaniformes*, *Passeriformes* i *Accipitriformes*. Węgierskie szczepy GoCV (GoCV-Hun1, -Hun2 and -Hun3) analizowane przez Kaszab i wsp. (2020), wykazywały 97,0-99,4% pokrewieństwa ze szczepami referencyjnymi cirkowirusów zgromadzonymi w GenBank, izolowanymi od dzikich ptaków w Polsce.

W badaniach własnych potwierdzono wysoką częstotliwość występowania infekcji polyomawirusem gęsi, zwłaszcza w 2019 r. kiedy to wykazano 76,9% wyników dodatnich. W kolejnym 2020 r. odsetek stad zakażonych był znacznie niższy i wynosił

42,85%. W większości badanych stad zakażonych polyomawirusem nie obserwowano typowych dla HNEG objawów klinicznych oraz zmian patologicznych w trakcie badania sekcyjnego. Natomiast ptaki ze stada z kliniczną postacią HNEG wykazywały biegunkę, zielony wypływ z dzioba oraz skręt szyi poprzedzający śmierć ptaków. W badaniach sekcyjnych padłych gęsi stwierdzano krwotoczne zapalenie błony śluzowej jelit głównie dwunastnicy oraz jelita cienkiego, obrzęk nerek, zaleganie kryształów moczanowych w moczowodach oraz surowiczy płyn w jamie brzusznej.

Gaweł i wsp. (2014) opisali w Polsce przypadek HNEG w stadzie 4 tygodniowych gęsi, w którym śmiertelność wyniosła 32%. Ptaki padały z objawami biegunki, zaburzeniami lokomotorycznymi oraz nerwowymi. W trakcie badań sekcyjnych zaobserwowano surowiczy i krwisty wysięk z nosa, obrzęk płuc z krwotokami, galaretowaty obrzęk tkanki podskórnej w okolicach mięśni piersiowych. Wątroba i nerki były powiększone i przekrwione a w jamie brzusznej zalegał jasny, żółty wysięk. U kilku osobników pojawiło się wodosierdzie, wszystkie ptaki wykazywały objawy krwotocznego zapalenia jelit.

Ostatnie badania Piekarskiej i wsp. (2021) przeprowadzone w latach 2019-2020 w stadach gęsi, kaczek oraz kaczek reprodukcyjnych wskazują na rosnące zagrożenie stad gęsi polyomawirusem. We wspomnianych badaniach z roku 2019 w 2 stadach potwierdzono wystąpienie HNEG, a w roku 2020 infekcja ta dotyczyła już 8 stad gęsi przeznaczonych na tucz. Autorzy przypuszczają, że możliwa jest transmisja pionowa polyomawirusa gęsi, ponieważ wykrywano obecność materiału genetycznego GHPV w jajach oraz zarodkach i u 1 dniowych piskląt gęsich (dane nie publikowane).

Badania krajowe przeprowadzone przez Woźniakowskiego i Tarasiuk (2015) w latach 2008-2014 z użyciem metody LAMP, potwierdziły obecności materiału genetycznego GHPV w 16,7% badanych próbek pochodzących od gęsi i kaczek. Występowanie zakażeń polyomawirusem gęsi opisano także w innych krajach Europy, m.in. we Francji, Niemczech oraz w Belgii (Garmyn i wsp. 2017). Badania przeprowadzone przez Kaszab i wsp. (2020a) w latach 2005-2019 na Węgrzech, wskazały, że 384 (34,6%) z 1111 prób pobranych od gęsi uznano za dodatnie w kierunku GHPV, co pozwoliło na uzyskanie 22 genomów polyomawirusa. Dalsza analiza filogenetyczna tych szczepów wskazuje, że wykryte zmienne sekwencje białka kapsydu u różnych żywicieli są przyczyną dla której, polyomawirusy nie są specyficzne dla danego gatunku. Dlatego też, migrujące ptaki mogą pełnić rolę rezerwuaru wirusa i przenosić go na dalekie odległości.

Detekcja polyomawirusa została także potwierdzona na Tajwanie w roku 2015 przez Tu i wsp. (2021). Z kolei, badania przesiewowe z użyciem surowic 15 tygodniowych gęsi,

przeprowadzone przez Leon i wsp. (2013) wskazują, że 53,3% (16/30) stad było dodatnich w kierunku polyomawirusa gęsi w klasycznym teście PCR. Natomiast, badania przeprowadzone z użyciem testu Real-Time PCR potwierdziły 100% wyników dodatnich w kierunku GHPV. Potwierdzono także występowanie materiału genetycznego polyomawirusa gęsi u kaczek pekin w Chinach (Jiang i Zhang, 2012) a w ostatnim czasie także u innych gatunków kaczek. Stanowi to niewątpliwie zagrożenie infekcją dla gęsi hodowanych w Chinach, gdzie do tej pory nie były notowane przypadki HNEG u gęsi (Wan i wsp. 2018).

Istotnym problemem zdrowotnym w stadach gęsi są koinfekcje parwowirusa gęsi z innymi wirusami np. cirkowirusem, polyomawirusem czy astrowirusem (ang. Goose Astrovirus - GoAstV) (Liu i wsp., 2020). Jak wynika z badań własnych 76,92% stad w 2019 r. i 46,15% stad w 2020 było zainfekowanych jednocześnie GPV oraz GHPV. Równie wysoki był odsetek stad zakażonych GPV+GoCV (odpowiednio 38,46% w 2019 r. i 46,15% w 2020 r.). Zanotowano także wystąpienie triady wirusowej GPV+GHPV+GoCV, którą diagnozowano w 30,77% stad w 2019 r. i w 15,38% stad w roku 2020.

Czekaj i wsp. (2021) także potwierdzili występowanie zakażeń mieszanych GPV+GoCV w 17 stadach (20%) a triadę wirusową GPV+GoCV+GHPV w 8 stadach gęsi (9,4%). Badanie te prowadzone były w latach 2012-2020 na terenie naszego kraju.

Istnieją także doniesienia Liu i wsp. (2020) dotyczące występowania zakażeń mieszanych GPV i GoAatV. Jak wynika z powyższych badań, materiał genetyczny obu wirusów został wykryty we wszystkich badanych tkankach ptaków zakażonych tj. nerce, wątrobie, sercu, śledzionie, płucach, bursie Fabrycjusza, mózgu oraz jelitach cienkich. Materiał do badań pochodził z 12 stad gęsi, w których wystąpiła ciężka postać skazy moczanowej, stąd podejrzenie synergistycznego wpływu koinfekcji GPV i GoAstV na „zaostrenie” procesu chorobowego.

Także Ting i wsp. (2021) opisali koinfekcję parwowirusa i cirkowirusa gęsi, skutkującą utratą upierzenia u gąsiąt. W trakcie doświadczenia pobierano krew łącznie od 92 sztuki gęsi z 40 farm, u których widoczna była utrata piór, oraz 60 sztuk gęsi klinicznie zdrowych (30 gęsi i 30 gąsiąt), które stanowiły kontrolę negatywną. Otrzymane wyniki potwierdziły brak infekcji GHPV oraz NGVE (ang. New Gosling Viral Enteritis - NGVE). Stwierdzono natomiast, że w 94,6% przypadków utraty upierzenia u gąsiąt (ang. Gosling Feather Loss Disease - GFL) diagnozowano infekcję cirkowirusem gęsi oraz

GPV (60,7%). Z kolei, w przypadku utraty upierzenia u starszych ptaków (ang. Goose Broken Feather Disease - GBF) odsetek ten wynosił 83,3% - GoCV i 72% - GPV. Wyniki te wskazują na istotną rolę tych czynników wirusowych w patogenezie utraty piór u gęsi.

Wyniki badań własnych wskazują, że istotnym problemem jest występowanie koinfekcji wirusowych i bakteryjnych w stadach gęsi. Rzadko jeden z tych czynników wyraźnie rzutował na status zdrowotny stada. Zazwyczaj mieszane infekcje wirusowe (GPV+GoCV+GHPV) a także bakteryjne (*E. coli*, *E. rhusiopathiae*, *G. anatis*, *S. Typhimurium*) czy grzybicze, prowadzą do wzrostu śmiertelności w stadzie, zróżnicowania ptaków a tym samym obniżenia wskaźników produkcyjnych.

6. Wnioski

1. Najczęściej stwierdzane zakażenia bakteryjne w stadach gęsi tuczowych były wywoływane przez bakterie: *E. coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* i *Gallibacterium anatis*. W przypadku zakażeń *G. anatis* diagnozowano koinfekcję z *E. coli* i/lub *E. rhusiopathiae* oraz polyomawirusem gęsi (GHPV).
2. Wyizolowane szczepy *E. coli* w znacznym stopniu (69,9%) wykazywały fenotyp wielolekooporny (MDR). Najczęstszym profilem wielolekooporności był AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ.
3. Badane szczepy *E. coli* charakteryzowały się wysoką prevalencją genów oporności na betalaktamy (gen *blaTEM*), tetracykliny (gen *tetA*) oraz izolaty z 2020 r. na sulfonamidy (gen *sul1* i *sul2*). Tylko 1 szczep *E. coli* posiadał gen oporności na kolistynę - *mcr-1*.
4. Najczęściej występującymi genami zjadliwości wśród szczepów *E. coli* były: gen *iss*, gen *jucD*, ponadto wśród szczepów z 2020 r. gen *irp2*. Wszystkie szczepy *E. coli* wyizolowane od gęsi tworzyły biofilm na podłożu LB, najczęściej na średnim poziomie.
5. Obecność swoistych przeciwciał matczynych anti-GPV wykazano w surowicy wszystkich gęsi, przy czym wyższe wartości mian ELISA potwierdzono w surowicach pobranych od gęsi w 2020 r. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy wysokością poziomu przeciwciał anti-GPV a pochodzeniem piskląt (ZWD).
6. We wszystkich badanych stadach potwierdzono obecność materiału genetycznego parwowirusa gęsiego (GPV), co jednak tylko w jednym stadzie łączyło się z zaburzeniem opierzania u gęsi i zmianami patologicznymi wskazującymi na chorobę Derzsy'ego.
7. Zakażenia cirkowirusem gęsi (GoCV) potwierdzono w 44,5% wszystkich badanych stad, natomiast polyomawirusem gęsi (GHPV) w 59,3% stad. Charakterystyczny był rok 2019, kiedy aż 76,9% stad było zainfekowanych polyomawirusem gęsi.
8. Wykazano wysoki odsetek stad gęsi zakażonych równocześnie GPV+ GHPV (59,3% stad dodatnich), GPV+GoCV (44,4%) oraz GPV+GHPV+GoCV (22,2%). Wszystkie zakażenia mieszane stwierdzano częściej w stadach gęsi badanych w 2019 r.
9. Na podstawie analizy filogenetycznej materiału genetycznego GPV otrzymane sekwencje zakwalifikowano w większości do grupy klasycznego szczepu cGPV (69,2%), pozostałe do nGPV (30,1%). Z kolei 91,7% sekwencji GoCV cechowała się

wysoką homologią do siebie i do izolowanego w 2014 r. w Polsce szczepu DG1. Tylko jedna sekwencja była podobna do sekwencji węgierskich i polskich GoCV izolowanych na przełomie lat 2013-2016.

10. W sposób istotny o statusie zdrowotnym gęsi decydowały zakażenia mieszane - tak bakteryjne (*E. coli*, *E. rhusiopathiae*, *G. anatis*) jak też wirusowe (GPV, GoCV, GHPV). Ponadto, zakażenia grzybicze (*A. fumigatus*) obniżały wartość biologiczną wstawianych piskląt.
11. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy pochodzeniem gęsi (ZWD) i okresem wstawiania gęsi na fermę (I i II sezon) a końcowym stanem zdrowotnym gęsi.

7. Streszczenie pracy

Zakażenia bakteryjne i wirusowe w stadach gęsi tuczowych. Badania wybranych stad w 2-letnim cyklu obserwacji.

Intensyfikacja produkcji i stale rosnąca liczebność stad gęsi w kraju sprzyja rozwojowi zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Mimo występowania tego zjawiska, w ostatnich latach w Polsce nie podejmowane były badania monitorujące występowanie chorób zakaźnych w stadach drobiu wodnego. Ponadto, notowane były okresowe niedobory szczepionki stosowanej w immunoprofilaktyce choroby Derzsy'ego u gęsi oraz przypadki wysoce zjadliwej grypy ptaków. Stąd też celem podjętych badań było określenie statusu zdrowotnego gęsi ze stad towarowych przeznaczonych do tuczu w chowie intensywnym.

Badania prowadzone były w dwuletnim cyklu obserwacyjnym tj. 2019 i 2020 roku. Gąsięta wstawiane na ферmy pochodziły z 3 różnych zakładów wylęgu. Program monitorowania stad prowadzony był przez cały okres odchowu oraz tuczu i obejmował 27 stad gęsi o liczebności od 3000 do 13000 sztuk. Ponadto ze względu na immunoprofilaktykę choroby Derzsy'go w stadach rodzicielskich gęsi i wydłużony sezon nieśności w analizie zdrowotności stad uwzględniono 2 okresy wstawień gąsiąt na ферmę: I sezon wylęgowy obejmujący wylęgi w okresie luty-marzec-kwiecień oraz II sezon wylęgowy obejmujący wylęgi w okresie: maj-czerwiec-lipiec.

Z przeprowadzonych badań wynika, że najczęściej stwierdzane zakażenia w stadach gęsi były wywoływane przez bakterie: *E. coli*, *E. rhusiopathiae*, *G. anatis* oraz *S. Typhimurium*, przy czym, zakażenie *G. anatis* stanowiło zazwyczaj koinfekcję z innym drobnoustrojem i/lub wirusem. W niemal połowie badanych stad w 2019 r. potwierdzono także infekcję *Aspergillus fumigatus*. Charakterystyka wyizolowanych szczepów *E. coli* wykazała, że większość izolatów prezentuje fenotyp MDR. Najczęściej diagnozowanym profilem oporności w roku 2019 był: AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ a w roku 2020 był to profil: AMOX ENRO FFN OXY TET SDM SXT STZ. Wyizolowane szczepy *E. coli* charakteryzowały się wysoką prewalencją genów oporności na betalaktamy (gen *blaTEM*) oraz tetracykliny (gen *tetA*). Ponadto, wśród izolatów z 2020 r. stwierdzano często geny oporności na sulfonamidy (gen *sul1* i *sul2*). W przypadku genów zjadliwości, najczęściej diagnozowano w roku 2019 gen *iss*, a w

roku 2020 gen *iucD*. Wszystkie zgromadzone izolaty *E. coli* pochodzące od gęsi tworzyły biofilm na podłożu LB, najczęściej na średnim poziomie. Ponadto analiza poziomu przeciwciał anti-GPV w badanych surowicach pobranych od gęsi w obu latach badawczych, potwierdziła obecność swoistych przeciwciał anti-GPV we wszystkich próbkach. Nie zaobserwowano natomiast zależności pomiędzy wysokością poziomu przeciwciał anti-GPV a pochodzeniem piskląt (ZWD). Z badań wynika, że nie istnieje zależność pomiędzy wartością biologiczną piskląt gęsi a ZWD czy sezonem wstawienia gąsi na fermę.

Badania wirusologiczne wykazały, że we wszystkich badanych stadach potwierdzono obecność materiału genetycznego GPV, w obu latach badawczych. Przeprowadzona analiza filogenetyczna materiału genetycznego GPV wykazała że większość sekwencji należy do grupy szczepu klasycznego GPV. Tylko 4 sekwencje należały do grupy szczepu określanego jako novel GPV a jedna pochodziła z grupy szczepu szczepionkowego. Z kolei, częstotliwość diagnozowania zakażeń GoCV w latach 2019-2020 wynosiła odpowiednio 46,15% i 42,86%. Analiza filogenetyczna materiału genetycznego GoCV wykazała wysoką homologię badanych sekwencji. Odnotowano także wysoki odsetek stad zakażonych polyomawirusem gęsi zarówno w 2019 r. (76,92%) jak i w 2020 r. (42,86%). Niepokoi fakt występowania zakażeń mieszanych (GPV+GoCV+GHPV) w 30,77% stad w 2019 r. i 14,28% stad w 2020 r. Wspomniane infekcje wirusowe i/lub bakteryjne miały negatywny wpływ na końcowy wynik tuczu. Nie zaobserwowano z kolei, zależności pomiędzy statusem zdrowotnym piskląt pochodzących z danego ZWD a częstością stwierdzanych zakażeń wirusowych.

8. Abstract

Bacterial and viral infections in flocks of fattening geese. Research on selected herds in a 2-year observation cycle.

The intensification of production and the constantly growing number of geese flocks in the country favor the development of bacterial and viral infections. Despite the occurrence of this phenomenon, in recent years, no studies have been undertaken in Poland to monitor the occurrence of infectious diseases in waterfowl herds. Moreover, periodic shortages of vaccine used in immunoprophylaxis of Derzsy's disease in geese and cases of highly pathogenic avian influenza have been reported. Hence, the aim of the undertaken research was to determine the health status of geese from commercial herds intended for fattening in intensive farming.

The research was conducted in a two-year observation cycle, i.e. 2019 and 2020. The geese placed on farms came from 3 different hatcheries. The herd monitoring program was carried out throughout the rearing and fattening period and included 27 flocks of geese ranging in size from 3,000 to 13,000 heads. In addition, due to the immunoprophylaxis of Derzsy's disease in the parent stock of geese and the extended laying season, the analysis of the health of the flocks includes 2 periods of insertion of geese on the farm: 1st hatching season including broods in February-March- April and the second hatching season including broods in the period: May-June-July.

The conducted research shows that the most common infections found in goose herds were caused by the bacteria: *E. coli*, *E. rhusiopathiae*, *G. anatis* and *S. Typhimurium*, while the infection with *G. anatis* was usually a co-infection with another microorganism and / or virus. . In 2019, infection with *Aspergillus fumigatus* was also confirmed in almost half of the flocks studied. Characterization of the isolated *E. coli* strains showed that most of the isolates presented the MDR phenotype. The most frequently diagnosed resistance profile in 2019 was: AMOX ENRO OXY TET SDM SXT STZ and in 2020 it was the profile: AMOX ENRO FFN OXY TET SDM SXT STZ. The isolated strains of *E. coli* were characterized by a high prevalence of beta-lactam resistance genes (*blaTEM* gene) and tetracyclines (*tetA* gene). In addition, genes for resistance to sulphonamides (*sul1* and *sul2* genes) were frequently found among the isolates from 2020. In the case of virulence genes, the most common diagnosis was *iss* in 2019 and *iucD* in 2020. All

collected *E. coli* isolates derived from geese formed a biofilm (biofilm) on LB broth, most often at an average level. Moreover, the analysis of the level of anti-GPV antibodies in the tested sera collected from geese in both research years confirmed the presence of specific anti-GPV antibodies in all samples. However, no relationship was observed between the level of anti-GPV antibodies and the origin of the chicks hatcheries. The research shows that there is no relationship between the biological value of goose chicks and hatcheries or the season of geese insertion on the farm.

The viral infection tests showed that the presence of GPV genetic material was confirmed in all herds in both research years. The conducted phylogenetic analysis of GPV genetic material showed that most of the sequences belong to the group of classic GPV strain. Only 4 sequences belonged to the novel GPV strain group and one was from the vaccine strain group. In turn, the frequency of diagnosis of GoCV infections in 2019-2020 was 46.15% and 42.86%, respectively. Phylogenetic analysis of GoCV genetic material showed high homology of the studied sequences. There was also a high percentage of geese infected flocks both in 2019 (76.92%) and in 2020 (42.86%). The presence of mixed infections (GPV + GoCV + GHPV) in 30.77% of herds in 2019 and 14.28% of herds in 2020 is worrying. These viral and / or bacterial infections had a negative impact on the final production result. On the other hand, no correlation was observed between the health status of chicks from a given ZWD and the frequency of viral infection.

9. Piśmiennictwo

- Adorján, A., Thuma, Á., Könyves, L. and Tóth, I. (2021) First isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from geese (*Anser anser domestica*) and first description of atypical EPEC from turkeys and pigeons in Hungary, *BMC Vet Res*, 17. doi: 10.1186/s12917-021-02968-w.
- Arné, P., Thierry, S., Wang, D., Deville, M., Le Loc'h, G., Desoutter, A., Féménia, F., Nieguitsila, A., Huang, W., Chermette, R. and Guillot, J. (2011) *Aspergillus fumigatus* in Poultry, *Int J Microbiol*, doi: 10.1155/2011/746356.
- Bailie, W. E., Bury, R. J., Bicknell, E. J. and Knudtson, W. U. (1970) Case Report: Erysipelothrix Infection in Goslings, *Avian Dis*, 14, doi: 10.2307/1588618.
- Ball, N. W., Smyth, J. A., Weston, J. H., Borghmans, B. J., Palya, V., Glávits, R., Ivanics, É., Dán, Á. and Todd, D. (2004) Diagnosis of goose circovirus infection in Hungarian geese samples using polymerase chain reaction and dot blot hybridization tests, *Avian Pathol*, 33, doi: 10.1080/03079450310001610613.
- Beernaert, L. A., Pasmans, F., Van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F. and Martel, A. (2010) *Aspergillus* infections in birds: a review, *Avian Pathol*, 39, doi: 10.1080/03079457.2010.506210.
- Beytut, E., Ozcan, K., Erginsoy, S. (2004) Immunohistochemical detection of fungal elements in the tissues of goslings with pulmonary and systemic aspergillosis. *Acta Vet Hung.*, 52 doi: 10.1556/AVet.52.2004.1.8.
- Bian G, Ma H, Luo M, Gong F, Li B, Wang G, Mohiuddin M, Liao M, Yuan J. (2019) Identification and genomic analysis of two novel duck-origin GPV-related parvovirus in China. *BMC Vet Res* 15: 88. doi: 10.1186/s12917-019-1833-9.
- Bielińska, H., Kłós, K., Sandecki, R. Hodowla i tucz drobiu wodnego w Polsce Opracowanie zbiorowe pod redakcją Janusza Wojciechowskiego. Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy Zakład Doświadczalny Kołuda Wielka. Minikowo, 2015.
- Bisgaard, M., Korczak, B. M., Busse, H.-J., Kuhnert, P., Bojesen, A. M. and Christensen, H. (2009) Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov., *Int J Syst Evol Microbiol*, 59, doi: 10.1099/ijs.0.005694-0.
- Blackall P.J. and Hofacre Ch. L., Fowl cholera, Diseases of Poultry, Fourteenth Edition. Editor-in-chief David E. Swayne, 2020 s. 831-846.
- Bobrek K, Nowak M, Borkowska J, Bobusia K and Gaweł A (2016) An Outbreak of Erysipelas in Commercial Geese, *Pak Vet J*, 36.
- Bojesen, A. M., Nielsen, S. S. and Bisgaard, M. (2003) Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels, *Avian Pathol*, 32, doi: 10.1080/0307945031000154107.
- Bojesen, A. M., Shivaprasad, H. L. (2007) Genetic diversity of *Gallibacterium* isolates

- from California turkeys. *Avian Pathol.* 36, doi: 10.1080/03079450701332352.
- Bojesen, A. M., Vazquez, M. E., Bager, R. J., Ifrah, D., Gonzalez, C., Aarestrup, F. M. (2011) Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol*, 148, doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.011.
- Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S. (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 72, doi: 10.1128/AEM.03022-05.
- Buzafa, M., Adamski, M. and Janicki, B. (2014) Characteristics of performance traits and the quality of meat and fat in Polish oat geese, *Worlds Poult Sci J*, 70, doi: 10.1017/S0043933914000580.
- Cao, Z. Z., Xu, J. W., Gao, M., Li, X. S., Zhai, Y. J., Yu, K., Wan, M. and Luan, X. H. (2020) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from goose farms in Northeast China, *Iranian J Vet Res*, 21.
- Cepas, V. and Soto, S. M. (2020) Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria, *Antibiotics*, 9, doi: 10.3390/antibiotics9100719.
- Chen CL, Chang PC, Lee MS, Shien JH, Ou SJ, Shieh HK. (2003) Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. *Avian Pathol.* 32, doi: 10.1080/0307945021000071614. PMID: 12745370.
- Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Pan, Z., Gao, S. and Jiao, X. (2012) Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment, *Antimicrob Agents Chemother*, 56, doi: 10.1128/AAC.06191-11.
- Chen, H., Dou, Y., Tang, Y., Zhang, Z., Zheng, X., Niu, X., Yang, J., Yu, X. and Diao, Y. (2015) Isolation and Genomic Characterization of a Duck-Origin GPV-Related Parvovirus from Cherry Valley Ducklings in China, *PLoS One*. Edited by U. Melcher, 10, doi: 10.1371/journal.pone.0140284.
- Chen, T., Jiang, J., Ye, C., Xie, J., Chen, X., Xu, D., Zeng, Z., Peng, Y., Hu, D.-L. and Fang, R. (2019) Genotypic characterization and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from chicken, pork and the environment at abattoirs and supermarkets in Chongqing, China, *BMC Vet Res*, 15, doi: 10.1186/s12917-019-2202-4.
- Chen, Y., Afumba, R., Pang, F., Yuan, R. and Dong, H. (2021) Advances in research on genetic relationships of waterfowl parvoviruses, *J Vet Res*, 65, doi: 10.2478/jvetres-2021-0063.
- Chen, J., Wang, H., Pei, H., Wang, J., Wu, H., Zhong, J., Zhu, W., Chen, D., Wu, S., Tong, J., Zhang, Y. and Zhang, J. (2021a) The Prevalence, Coinfection, and Evolutionary and Molecular Characteristics of Prevalent Goose Circovirus in Guangdong, China, *Avian Dis*, 65. doi: 10.1637/aviandiseases-D-21-00045.
- CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition (2020). VET01S ED5:2020. Clinical and

Laboratory Standards Institute. Available at: <https://clsi.org/>.

CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition (2022). M100-ED32:2022. Clinical and Laboratory Standards Institute. Available at: <https://clsi.org/>.

Conway, A. (2019) World egg production up 18 percent in 2016 from 10 years ago, *Latest FAOSTAT data show China, US, India remain leading egg-producing countries*, 1 July. <https://www.wattagnet.com/articles/38015-world-egg-production-up-18-percent-in-2016-from-10-years-ago>.

Corrand, L., Gelfi, J., Albaric, O., Etievant, M., Pingret, J.-L. and Guerin, J.-L. (2011) Pathological and epidemiological significance of Goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks, *Avian Pathol*, 40, doi: 10.1080/03079457.2011.582481.

Ćwiek, K., Woźniak-Biel, A., Karwańska, M., Siedlecka, M., Lammens, C., Rebelo, A. R., Hendriksen, R. S., Kuczkowski, M., Chmielewska-Władyka, M. and Wieliczko, A. (2021) Phenotypic and genotypic characterization of mcr-1-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10, and ST744 isolated from poultry in Poland, *Braz J Microbiol*, 52, doi: 10.1007/s42770-021-00538-8.

Czekaj, H., Kozdruń, W., Piekarska, K., Styś-Fijoł, N., Nieszporuk, S. and Stolarek, A. *Konf. Nuk.* "Występowanie mieszanych zakażeń wirusowych w stadach gęsi w Polsce", Warszawa, XVI Kongres PTNW, 2021, s. 353.

Dar, M. A., Ahmad, S. M., Bhat, S. A., Ahmed, R., Urwat, U., Mumtaz, P. T., Bhat, S. A., Dar, T. A., Shah, R. A. and Ganai, N. A. (2017) Salmonella *Typhimurium* in poultry: a review, *Worlds Poult Sci J*, 73, doi: 10.1017/S0043933917000204.

Dec M., Nowak, T., Wódz, K., Pietras-Oźga, D., Wilczyński, J. and Urban-Chmiel, R. *Konf. Nauk.* "Serotypy i rodzaje powierzchniowego antygeny spa u szczepów *Erysipelothrix rhusiopathiae* izolowanych od drobiu", Warszawa, XVI Kongres PTNW, 2021, s. 363.

Delpont, M., Guinat, C., Guérin, J.-L., Le leu, E., Vaillancourt, J.-P. and Paul, M. C. (2021) Biosecurity measures in French poultry farms are associated with farm type and location, *Prev Vet Med*, 195, doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105466.

Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J. M. (1999) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), *Vet Res*, 30.

Dominguez, J. E., Redondo, L. M., Figueroa Espinosa, R. A., Cejas, D., Gutkind, G. O., Chacana, P. A., Di Conza, J. A. and Fernández Miyakawa, M. E. (2018) Simultaneous Carriage of mcr-1 and Other Antimicrobial Resistance Determinants in *Escherichia coli* From Poultry, *Front Microbiol*, 9, doi: 10.3389/fmicb.2018.01679.

Dube, N. and Mbanga, J. (2018) Molecular characterization and antibiotic resistance patterns of avian fecal *Escherichia coli* from turkeys, geese, and ducks, *Vet World*, 11, doi: 10.14202/vetworld.2018.859-867.

Dziva, F. and Stevens, M. P. (2008) Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts, *Avian Pathol*

37, doi: 10.1080/03079450802216652.

El-Adawy, H., Bocklisch, H., Neubauer, H., Hafez, H. M. and Hotzel, H. (2018) Identification, differentiation and antibiotic susceptibility of *Gallibacterium* isolates from diseased poultry, *Ir Vet J*, 71, doi: 10.1186/s13620-018-0116-2.

Ellis, M. G., Arp, L. H. and Lamont, S. J. (1988) Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys, *Am J Vet Res*, 49.

Eriksson, H., Jansson, D. S., Johansson, K.-E., Båverud, V., Chirico, J. and Aspán, A. (2009) Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from poultry, pigs, emus, the poultry red mite and other animals, *Vet Microbiol*, 137, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.016.

EUCAST (2022). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 12.0, valid from 2022-01-01. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <https://www.eucast.org/>.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2021) The European Union One Health 2020 Zoonoses Report, *EFSA Journal*, 19. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6971.

European Medicines Agency (2020). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018: trends from 2010 to 2018 : tenth ESVAC report*. <https://data.europa.eu/doi/10.2809/>.

Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H.-C. and Wieler, L. H. (2005) Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction, *Avian Dis*, 49, doi: 10.1637/7293-102604R.

Fan, J.-H., Zuo, Y.-Z., Yang, Z. and Pei, L.-H. (2013) The development of an indirect ELISA for the detection of antibodies to goose parvovirus in blood serum, *Lett Appl Microbiol*, 57, doi: 10.1111/lam.12070.

Femenia, F., Fontaine, J.-J., Lair-Fulleriger, S., Berkova, N., Huet, D., Towanou, N., Rakotovo, F., Granet, O.-I., Le Loc'h, G., Arné, P. and Guillot, J. (2007) Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*, *Avian Pathol*, 36, doi: 10.1080/03079450701332337.

Garmyn, A., Verlinden, M., Bosseler, L., Adriaensen, C. and Martel, A. (2017) Persistent Goose Hemorrhagic Polyomavirus Infection on a Belgian Goose Farm, *Avian Dis*, 61, doi: 10.1637/11604-020317-Case.1.

Gaweł, A. (2008) Różycyca u ptaków, *Magazyn weterynaryjny*, (5), s. 408–410.

Gaweł A., Mazurkiewicz M., Kuszczynski T. *Konf. Nauk. „Różycyca gęsi., Monitoring zagrożeń w produkcji drobiarskiej – aspekty bezpieczeństwa żywności.”*, Wrocław, 2007, s. 223–226.

Gaweł, A., Woźniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E., Kozdruń, W., Bobrek, K., Bobusia, K. and Nowak, M. (2014) Hemorrhagic Nephritis and Enteritis in a Goose Flock in Poland—Disease Course Analysis and Characterization of Etiologic Agent, *Avian Dis*,

58, doi: 10.1637/10845-041014-Reg.1.

Gelfi, J., Pappalardo, M., Claverys, C., Peralta, B. and Guérin, J.-L. (2010) Safety and efficacy of an inactivated Carbopol-adjuvanted goose haemorrhagic polyomavirus vaccine for domestic geese, *Avian Pathol*, 39, doi: 10.1080/03079451003604647.

Glávits, R., Zolnai, A., Szabó, É., Ivanics, É., Zarka, P., Mató, T. and Palya, V. (2005) Comparative pathological studies on domestic geese (*Anser anser domestica*) and Muscovy ducks (*Cairina moschata*) experimentally infected with parvovirus strains of goose and Muscovy duck origin, *Acta Vet Hung*, 53, doi: 10.1556/avet.53.2005.1.8.

Gornowicz, E. i Lewko, L., Instytut Zootechniki. Gęsi - mięso - produkcja - spożycie - tradycja. Broszura upowszechnieniowa nr b-2/2016, Kraków: Instytut Zootechniki - Państwowy Instytut Badawczy.

Grigar, M. K., Cummings, K. J. and Rankin, S. C. (2017) Prevalence of *Salmonella* among waterfowl along the Texas Gulf coast, *Zoonoses Public Health*, 64, doi: 10.1111/zph.12380.

Guabiraba, R. and Schouler, C. (2015) Avian colibacillosis: still many black holes, *FEMS Microbiol Lett*. Edited by A. Klier, 362, doi: 10.1093/femsle/fnv118.

Guerin, J.-L., Gelfi, J., Dubois, L., Vuillaume, A., Boucraut-Baralon, C. and Pingret, J.-L. (2000) A Novel Polyomavirus (Goose Hemorrhagic Polyomavirus) Is the Agent of Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese', *J Virol*, 74, doi: 10.1128/JVI.74.10.4523-4529.2000.

Guo, J., Tian, J., Tan, X., Yu, H., Ding, S., Sun, H. and Yu, X. (2011) Pathological observations of an experimental infection of geese with goose circovirus, *Avian Pathol*, 40, doi: 10.1080/03079457.2010.538371.

Hahne, F., Jensch, S., Hamscher, G., Meißner, J., Kietzmann, M., Kemper, N., Schulz, J. and Mateus-Vargas, R. H. (2022) Innovative Perspectives on Biofilm Interactions in Poultry Drinking Water Systems and Veterinary Antibiotics Used Worldwide, *Antibiotics*, 11, doi: 10.3390/antibiotics11010077.

Hess, C., Grafl, B., Bagheri, S., Kaesbohrer, A., Zloch, A. and Hess, M. (2020) Antimicrobial Resistance Profiling of *Gallibacterium anatis* from Layers Reveals High Number of Multiresistant Strains and Substantial Variability Even Between Isolates from the Same Organ, *Microb Drug Resist*, 26, doi: 10.1089/mdr.2019.0056.

Hussein, N. H., AL-Kadmy, I. M. S., Taha, B. M. and Hussein, J. D. (2021) Mobilized colistin resistance (mcr) genes from 1 to 10: a comprehensive review, *Mol Biol Rep*, 48, doi: 10.1007/s11033-021-06307-y.

Isidan, H., Turan, T., Atasoy, M. O. and Coskun, A. (2021) Molecular analysis of goose parvovirus field strains from a Derzsy's disease outbreak reveals local European-associated variants, *Arch Virol*, 166, doi: 10.1007/s00705-021-05086-y.

Jamali, H., Radmehr, B. and Ismail, S. (2014) Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria*, *Salmonella*, and *Yersinia* species isolates in ducks and geese, *Poultry Sci*, 93, doi: 10.3382/ps.2013-03699.

Janowska, A., Krasnodębska-Depta, A. and Bieszke, R. (1978) A case of erysipelas in geese, *Med. Weter.*, 34, s. 471–472.

Jarma, D., Sánchez, M. I., Green, A. J., Peralta-Sánchez, J. M., Hortas, F., Sánchez-Melsió, A. and Borrego, C. M. (2021) Faecal microbiota and antibiotic resistance genes in migratory waterbirds with contrasting habitat use, *Sci Total Environ*, 783, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146872.

Jensen, H. E. (1994) Systemic bovine aspergillosis and zygomycosis in Denmark with reference to pathogenesis, pathology, and diagnosis, *APMIS. Supplementum*, 42, s. 1–48.

Jeong, J., Lee, J.-Y., Kang, M.-S., Lee, H.-J., Kang, S.-I., Lee, O.-M., Kwon, Y.-K. and Kim, J.-H. (2021) Comparative Characteristics and Zoonotic Potential of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Isolates from Chicken and Duck in South Korea, *Microorganisms*, 9, doi: 10.3390/microorganisms9050946.

Jiang T., Zhang D. (2012) Molecular detection of goose hemorrhagic polyomavirus in Pekin ducks. *China J Vet Med* 2012;48:3–6.

Johnson, T. J., Giddings, C. W., Horne, S. M., Gibbs, P. S., Wooley, R. E., Skyberg, J., Olah, P., Kercher, R., Sherwood, J. S., Foley, S. L. and Nolan, L. K. (2002) Location of Increased Serum Survival Gene and Selected Virulence Traits on a Conjugative R Plasmid in an Avian *Escherichia coli* Isolate, *Avian Dis*, 46, doi: 10.1637/0005-2086(2002)046[0342:LOISSG]2.0.CO;2.

Karwańska, M., Woźniak-Biel, A., Wieliczko, A. *Konf. Nau.*” Znaczenie *Gallibacterium anatis* w patologii drobiu” *Aktualne problemy w patologii drobiu*, Wrocław 2 lipca 2021, s. 22-24.

Kaszab, E., Lengyel, G., Marton, S., Dán, Á., Bányai, K. and Fehér, E. (2020) Occurrence and genetic diversity of CRESS DNA viruses in wild birds: a Hungarian study, *Sci Rep*, 10, doi: 10.1038/s41598-020-63795-x.

Kaszab, E., Marton, S., Dán, Á., Farsang, A., Bálint, Á., Bányai, K. and Fehér, E. (2020a) Molecular epidemiology and phylodynamics of goose haemorrhagic polyomavirus, *Transbound Emerg Dis*, 67, doi: 10.1111/tbed.13608.

Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S. and Rajashekara, G. (2021) Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies, *Pathogens*, 10, doi: 10.3390/pathogens10040467.

Kozdruń, W., Woźniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E. and Czekał, H. (2012) Viral infections in goose flocks in Poland, *Pol J Vet Sci*, 15, doi: 10.2478/v10181-012-0080-9.

Kozdruń, W., Piekarska K., Styś-Fijoł N., Czekał H., Nieszporuk J.S., Stolarek A. *Konf. Nauk.* „Aktualne problemy w patologii drobiu”, 50. Jubileuszowa Konferencja Naukowa, Polanica Zdrój, 2019, s. 59-61.

Kuczkowski M., Król J., Wieliczko A., Gaweł A., Schmidt J., Mazurkiewicz M. (2006) Występowanie Pasterelozy w stadach drobiu oraz charakterystyka wyizolowanych szczepów *Pasteurella* sp. *Med Weter.*, 62, s. 574.

- Kuczkowski M., Piasecki T., Woźniak A., Wieliczko A. (2010) Charakterystyka molekularna krajowych szczepów cirkowirusów izolowanych od gęsi. *Med Weter.*, 66 s. 680-683.
- Kuźmińska-Bajor, M., Woźniak-Biel, A. Wieliczko, A. Bakteriofagi w terapii i zapobieganiu chorób bakteryjnych u drobiu. *Konf. Nauk. „Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem monitorowania zdrowia ptaków”*, Wrocław, 2017, s. 66-72.
- Lacroux, C., Andreoletti, O., Payre, B., Pingret, J., Dissais, A. and Guerin, J. (2004) Pathology of spontaneous and experimental infections by Goose haemorrhagic polyomavirus, *Avian Pathol*, 33, doi: 10.1080/0307945042000220525.
- Lamas A, Miranda JM, Vázquez B, Cepeda A, Franco CM. (2016) Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in *Salmonella enterica* decrease under anaerobic conditions. *Int J Food Microbiol*, 5, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.043.
- Leon, O., Corrand, L., Ngoc Bich, T., Le Minor, O., Lemaire, M. and Guérin, J.-L. (2013) Goose Hemorrhagic Polyomavirus Detection in Geese Using Real-Time PCR Assay, *Avian Dis*, 57, doi: 10.1637/10513-021013-ResNote.1.
- Li, D., Zhang, L., Chen, S., Gu, J., Ding, M. and Li, J. (2019) Detection and Molecular Characterization of Two Genotypes of Goose Parvoviruses Isolated from Growing Period Geese and Cherry Valley Ducks in China, *Avian Dis*, 63, doi: 10.1637/12015-121818-Reg.1.
- Li, K.-P., Hsu, Y.-C., Lin, C.-A., Chang, P.-C., Shien, J.-H., Liu, H.-Y., Yen, H. and Ou, S.-C. (2021) Molecular Characterization and Pathogenicity of the Novel Recombinant Muscovy Duck Parvovirus Isolated from Geese, *Animals*, 11, doi: 10.3390/ani11113211.
- Liu, B.-T., Yang, Q.-E., Li, L., Sun, J., Liao, X.-P., Fang, L.-X., Yang, S.-S., Deng, H. and Liu, Y.-H. (2013) Dissemination and Characterization of Plasmids Carrying *oqxAB-blaCTX-M* Genes in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals, *PLoS ONE*. Edited by A. Cloeckaert, 8, doi: 10.1371/journal.pone.0073947.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H. and Shen, J. (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, *Lancet Infect Dis*, 16, doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Liu, R., Chen, C., Huang, Y., Cheng, L., Lu, R., Fu, G., Shi, S., Chen, H., Wan, C., Fu, Q. and Lin, J. (2018) Microbiological identification and analysis of waterfowl livers collected from backyard farms in southern China, *J Vet Med Sci*, 80, doi: 10.1292/jvms.17-0452.
- Liu, H., Hu, D., Zhu, Y., Xiong, H., Lv, X., Wei, C., Liu, M., Yin, D., He, C., Qi, K. and Wang, G. (2020) Coinfection of parvovirus and astrovirus in gout-affected goslings, *Transbound Emerg Dis*, 67, doi: 10.1111/tbed.13652.

- Mahmud, M., Hasan, J. and Nazir, K. (2017) Internal transcribed spacer based identification of *Aspergillus fumigatus* isolated from poultry feed samples, *Res Agric Livest Fish*, 4, s. 165–171.
- Marek, A., Dudzic, A., Stępień-Pyśniak, D. and Pyzik, E. Mikroflora bakteryjna izolowana z zapłodnionych jaj kurzych, zamaryłych zarodków i od nowo wyklutych piskląt oraz jej znaczenie w patologii drobiu. *Konf. Nauk. „Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem embriopatologii i okresu okołolęgowego”*, Wrocław, 2010 s. 119-130.
- Martelli, F., Gosling, R. J., Callaby, R. and Davies, R. (2017) Observations on *Salmonella* contamination of commercial duck farms before and after cleaning and disinfection, *Avian Pathol*, 46, doi: 10.1080/03079457.2016.1223835.
- Massaccesi, L., Albini, E., Massacci, F. R., Orsini, S., Tofani, S., Blasi, F., Marchi, L., Pezzotti, G. and Magistrali, C. F. (2021) Longitudinal study on antibiotic susceptibility in commensal *E. coli* from geese raised in free-range production systems, *Poultry Sci*, 100, doi: 10.1016/j.psj.2021.101230.
- Matczuk, A. K., Krawiec, M. and Wieliczko, A. (2015) A new duck circovirus sequence, detected in velvet scoter (*Melanitta fusca*) supports great diversity among this species of virus, *Virol J*, 12, doi: 10.1186/s12985-015-0352-y.
- Matczuk, A. K., Chmielewska-Władyka, M., Siedlecka, M., Bednarek, K. J. and Wieliczko, A. (2020) Short Beak and Dwarfism Syndrome in Ducks in Poland Caused by Novel Goose Parvovirus, *Animals*, 10, doi: 10.3390/ani10122397.
- Mató, T., Péntzes, Z., Rueda, P., Vela, C., Kardi, V., Zolnai, A., Misák, F. and Palya, V. (2009) Recombinant subunit vaccine elicits protection against goose haemorrhagic nephritis and enteritis, *Avian Pathol*, 38, doi: 10.1080/03079450902912119.
- Mazaheri, A., Philipp, H. C., Bonsack, H. and Voss, M. (2006) Investigations of the Vertical Transmission of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Laying Hens, *Avian Dis*, 50, doi: 10.1637/7426-082605R.1.
- Meier, S. M., Kottwitz, J., Keller, D. I. and Albini, S. (2021) *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by geese to human transmission, *BMJ Case Rep*, 14, doi: 10.1136/bcr-2020-240073.
- Morgan, M. J., Britt, J. O., Cockrill, J. M. and Eiten, M. L. (1994) *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Infection in an Emu (*Dromaius Novaehollandiae*), *J Vet Diagn Invest*, 6, doi: 10.1177/104063879400600319.
- Mostaan, S., Ghasemzadeh, A., Sardari, S., Shokrgozar, M. A., Nikbakht Brujeni, G., Abolhassani, M., Ehsani, P. and Asadi Karam, M. R. (2020) *Pasteurella multocida* Vaccine Candidates: A Systematic Review, *Avicenna J Med Biotech*, 12, s. 140–147.
- Narasinakuppe Krishnegowda, D., Dhama, K., Kumar Mariappan, A., Munuswamy, P., Iqbal Yattoo, Mohd., Tiwari, R., Karthik, K., Bhatt, P. and Reddy, M. R. (2020) Etiology, epidemiology, pathology, and advances in diagnosis, vaccine development, and treatment of *Gallibacterium anatis* infection in poultry: a review, *Vet Q*, 40, doi: 10.1080/01652176.2020.1712495.

- Nawrot, U., Wieliczko, A., Włodarczyk, K., Kurzyk, E. and Brillowska-Dąbrowska, A. (2019) Low frequency of itraconazole resistance found among *Aspergillus fumigatus* originating from poultry farms in Southwest Poland, *J Mycol Med*, 29, doi: 10.1016/j.mycmed.2018.12.005.
- Niu, X., Wang, H., Wei, L., Zhang, M., Yang, J., Chen, H., Tang, Y. and Diao, Y. (2018) Epidemiological investigation of H9 avian influenza virus, Newcastle disease virus, Tembusu virus, goose parvovirus and goose circovirus infection of geese in China, *Transbound Emerg Dis*, 65, doi: 10.1111/tbed.12755.
- Nururrozi, A., Yanuartono, Y., Widayarni, S., Ramandani, D. and Indarjulianto, S. (2020) Clinical and pathological features of aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus* in broilers, *Vet World*, 13, doi: 10.14202/vetworld.2020.2787-2792.
- Opriessnig, T., Forde, T. and Shimoji, Y. (2020) *Erysipelothrix Spp.*: Past, Present, and Future Directions in Vaccine Research, *Front Vet Sci*, 7, doi: 10.3389/fvets.2020.00174.
- Palya, V., Ivanics, É., Glávits, R., Dán, Á., Mató, T. and Zarka, P. (2004) Epizootic occurrence of haemorrhagic nephritis enteritis virus infection of geese, *Avian Pathol*, 33, doi: 10.1080/0307945042000195740.
- Palya, V., Zolnai, A., Benyeda, Z., Kovács, E., Kardi, V., & Mató, T. (2009). Short beak and dwarfism syndrome of mule duck is caused by a distinct lineage of goose parvovirus. *Avian Pathol*, 238, 175–180, doi: 10.1080/03079450902737839.
- Palya, J.V., D.E. Swayne, M. Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D.L. Suarez, S. De Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T.Y. Prajitno, I. Rubinoff, G. Zavala (eds), (2020) Parvovirus Infections of Waterfowl, *Disease of Poultry*, (14), s. 474–484.
- Papouskova, A., Masarikova, M., Valcek, A., Senk, D., Cejkova, D., Jahodarova, E. and Cizek, A. (2020) Genomic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from diseased chicken in the Czech Republic, *BMC Vet Res*, 16, doi: 10.1186/s12917-020-02407-2.
- Pasim, P., Koza, W., Skrzypiec, E., Wojdat, D., Mikos-Wojewoda, E., Śmiałowska-Węglińska, A., Kwit, R., Skóra, M., Skarżyńska, M., Zając, M. and Wasyl, D. *Konf. Nauk. „Występowanie zakażeń Salmonella spp. w stadach gęsi”, XVI Kongres PTNW, Warszawa 2021, s. 369.*
- Persson, G. and Bojesen, A. M. (2015) Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry, *Vet Res*, 46, doi: 10.1186/s13567-015-0206-z.
- Piekarska, K., Kozdruń, W., Gaweł, A., Bobrek, K., Styś-Fijoł, N., Czekaj, H. and Stolarek, A. *Konf. Nauk. „Analiza klinicznych przypadków zakażenia polyomawirusem (GHPV) w stadach gęsi”, XVI Kongres PTNW, Warszawa 2021, s. 354.*
- Piekarska, K., Kozdruń, W., Styś-Fijoł, N., Czekaj, H. and Stolarek, A. *Konf. Nauk. „Ocena statusu immunologicznego w stadach gęsi immunizowanych przeciwko GPV”, XVI Kongres PTNW, Warszawa 2021a, s.356.*
- Pingret, J.-L., Boucraut-Baralon, C. and Guérin, J.-L. (2008) Goose haemorrhagic

polyomavirus infection in ducks, *Vet Rec*, 162, doi: 10.1136/vr.162.5.164-a.

Pyzik E., Głowniak I., Urban-Chmiel R., Nowaczek A., Stępień-Pyśniak D., Marek A., Dec M., Riuż Gamiz L. *Konf. Nauk. „Ocena efektywności eradykacji i tworzenia biofilmu patogennych szczepów Escherichia coli izolowanych od drobiu z wykorzystaniem bakteriofagów izolowanych ze środowisk utrzymania drobiu.” Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem możliwości zapobiegania szerzeniu się chorób zakaźnych.* 52 Konferencja Drobiarska, Wrocław 2022.

Rebello AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier SA, De Frutos EC, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A, Hendriksen RS (2018) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveill* 23, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>.

Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Lukert, P.D., Steffens, W.L. & Latimer, K.S (1989) Characterisation of a new virus derived from cockatoos with psittacine beak and feather disease, *Virology*, (171), s. 83–88.

Rodrigues, S. V., Laviniki, V., Borges, K. A., Furian, T. Q., Moraes, H. L. S., Nascimento, V. P. and Salle, C. T. P. (2019) Biofilm Formation by Avian Pathogenic *Escherichia coli* is Not Related to In Vivo Pathogenicity, *Curr Microbiol*, 76, doi: 10.1007/s00284-018-1608-8.

Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P. and Varsani, A. (2017) Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus, *Arch Virol*, 162, doi: 10.1007/s00705-017-3247-y.

Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 28 marca 2007 r. w sprawie wprowadzenia „Krajowego programu zwalczania niektórych serotypów Salmonelli w stadach hodowlanych gatunku kura (*Gallus gallus*)” na lata 2007—2009.

Sajid M.A., Khan I.A., Rauf U. (2006) *Aspergillus Fumigatus* In Commercial Poultry Flocks, A Serious Threat To Poultry Industry In Pakistan., *J Anim Pl Sci*, 16(3–4), s. 79–81.

Samorek-Salomonowicz, E. and Kozdruń, W. (2012) Choroba Derzsy’ego nadal aktualnym problemem, *Med. Weter.* 68, s. 647–649.

Samuel, M. D., Shaddock, D. J., Goldberg, D. R., Wilson, M. A., Joly, D. O. and Lehr, M. A. (2003) Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Wetland ecosystems during 1996 to 1999, *J Wild Dis*, 39, doi: 10.7589/0090-3558-39.4.798.

Schettler, C. H (1980) Clinical picture and pathology of haemorrhagic nephritis and enteritis in geese, *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, (8), s. 313–320.

Seo, K. and Lee, Y. (2020) Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants *qnr* and *aac(6’)-Ib-cr* in Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Commercial Layer in Korea, *J Microbiol Biotech*, 30, doi:

10.4014/jmb.2003.03058.

Sgariglia, E., Aconiti Mandolini, N., Napoleoni, M., Medici, L., Fraticelli, R., Conquista, M., Gianfelici, P., Staffolani, M., Fisichella, S., Capuccella, M., Sargenti, M., Perugini, G. (2019) Antibiotic resistance pattern and virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from different breeding systems, *Vet Ital*, 55, doi: 10.12834/VetIt.1617.8701.1.

Shalaby, A. G., Bakry, N. R. and El-Demerdash, A. S. (2021) Virulence attribute estimation of *Pasteurella multocida* isolates in embryonated chicken eggs, *Arch Microbiol*, 203, doi: 10.1007/s00203-021-02579-x.

Shirin Sultana, S. M. Harun-ur-Rashid, Md. Nazrul Islam and Md. Zulfekar Ali (2014) Pathological investigation of avian Aspergillosis in commercial broiler chicken at Chittagong district, *Int J Adv Res Biol Sci*, 1, s. 74–85.

Shoab, M., Dasti, J. I., Shah, M. A. A., Zafir, M. A., Hasan, M. U., Riaz, A., Rehman, S. U. i Khan, M. A. (2017) Salmonellosis in poultry, new prospects of an old disease: a review, *Pak J Sci*, 69, s. 361–368.

Silva, A. P., Cooper, G., Blakey, J., Jerry, C., Shivaprasad, H. L. and Stoute, S. (2020) Retrospective Summary of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Diagnosed in Avian Species in California (2000–19), *Avian Dis*, 64. doi: 10.1637/aviandiseases-D20-00038.

Singh S.V., Singh B.J. , Sinha D.K, Kumar OR V., Vadhana A P., Bhardwaj M., Dubey S. (2015) *Gallibacterium anatis*: An Emerging Pathogen of Poultry Birds and Domiciled Birds, *J Veterinar Sci Technol*, 07, doi: 10.4172/2157-7579.1000324.

Skyberg, J. A., Siek, K. E., Doetkott, C. and Nolan, L. K. (2007) Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny, *J App Microbiol*, 102. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03076.x.

Smith E, Miller E, Aguayo JM, Figueroa CF, Nezworski J, Studniski M, Wileman B, Johnson T. (2021) Genomic diversity and molecular epidemiology of *Pasteurella multocida*. *PLoS One*, 16, e0249138. doi: 10.1371/journal.pone.0249138.

Soike, D., Kohler, B. and Albrecht, K. (1999) A circovirus-like infection in geese related to a runtting syndrome, *Avian Pathol*, 28, doi: 10.1080/03079459994939.

Song, Y., Yu, L., Zhang, Y., Dai, Y., Wang, P., Feng, C., Liu, M., Sun, S., Xie, Z. and Wang, F. (2020) Prevalence and characteristics of multidrug-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolates from broiler chickens in Tai'an, China, *Poultry Sci*, 99, doi: 10.1016/j.psj.2019.10.044.

Stenzel, T., Dziewulska, D., Muhire, B., Hartnady, P., Kraberger, S., Martin, D. and Varsani, A. (2018) Recombinant Goose Circoviruses Circulating in Domesticated and Wild Geese in Poland, *Viruses*, 10, doi: 10.3390/v10030107.

Stenzel, T., Dziewulska, D., Tykałowski, B. and Koncicki, A. (2020) The Clinical Infection with Pigeon Circovirus (PiCV) Leads to Lymphocyte B Apoptosis But Has No Effect on Lymphocyte T Subpopulation, *Pathogens*, 9, doi: 10.3390/pathogens9080632.

Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. (2004) Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 38, doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x.

Styś-Fijoł, N., Kozdruń, W., Czekaj, H. (2016) Preliminary survey of the occurrence of goose haemorrhagic polyomavirus (GHPV) in wild birds in Poland. *J Vet Res*, 60, <https://doi.org/10.1515/jvetres-2016-0019>.

Su, Y.-C., Yu, C.-Y., Lin, J.-L., Lai, J.-M., Chen, S.-W., Tu, P.-C. and Chu, C. (2011) Emergence of *Salmonella enterica* Serovar *Potsdam* as a Major Serovar in Waterfowl Hatcheries and Chicken Eggs, *Avian Dis*, 55, doi: 10.1637/9420-060910-Reg.1.

Takeshi K, Makino S, Ikeda T, Takada N, Nakashiro A, Nakanishi K, Oguma K, Katoh Y, Sunagawa H, Ohyama T. (1999) Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. *J Clin Microbiol.* 37, doi: 10.1128/JCM.37.12.4093-4098.1999.

Tarasiuk, K., Holec-Gąsior, L., Ferra, B. and Rapak, A. (2019) The development of an indirect ELISA for the detection of goose parvovirus antibodies using specific VP3 subunits as the coating antigen, *BMC Vet Res*, 15, doi: 10.1186/s12917-019-2027-1.

Timmermans, M., Wattiau, P., Denis, O. and Boland, C. (2021) Colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-5*, including a case of triple occurrence (*mcr-1*, -3 and -5), in *Escherichia coli* isolates from faeces of healthy pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012–2016, *Intl J Antimicrob Agents*, 57, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106350.

Ting, C.-H., Lin, C.-Y., Huang, Y.-C., Liu, S.-S., Peng, S.-Y., Wang, C.-W. and Wu, H.-Y. (2021) Correlation between goose circovirus and goose parvovirus with gosling feather loss disease and goose broke feather disease in southern Taiwan, *J Vet Sci*, 22, doi: 10.4142/jvs.2021.22.e1.

Torres C. (2020) Evolution and molecular epidemiology of polyomaviruses. *Infect Genet Evol.* 79, doi: 10.1016/j.meegid.2019.104150.

Tu, Y.-C., Li, W.-T., Lee, F., Huang, C.-W., Chang, J.-C., Hsu, W.-C., Hu, S.-C., Chiou, C.-J. and Chen, Y.-P. (2021) Localization of goose haemorrhagic polyomavirus in naturally infected geese using *in situ* hybridization, *Avian Pathol*, 50, doi: 10.1080/03079457.2020.1832199.

Türkyılmaz S, Hazimoglu S, Bozdogan B (2009) Antimicrobial susceptibility and resistance genes in *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* isolated from Turkeys. *Israel J Vet Med* 64:72–77.

Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. Dz.U. 2004 nr 69 poz. 625 z późn. zm.

Utnik-Banaś, K. and Żmija, J. (2018) The geese makret in Poland, *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, XX, doi: DOI: 10.5604/01.3001.0012.1531.

Varga, Z., Volokhov, D. V., Stipkovits, L., Thuma, Á., Sellyei, B. and Magyar, T. (2013)

- Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from geese, *Vet Microbiol*, 163, doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.023.
- Veraldi, S., Girgenti, V. and Gianotti, R. (2009) Erysipeloid, *Clinical and Experimental Dermatology*, 34, doi: 10.1111/j.1365-2230.2009.03292.x.
- Wan, C., Shi, S., Chen, C., Chen, H., Cheng, L., Fu, Q., Fu, G., Liu, R. and Huang, Y. (2018) Development of a PCR assay for detection and differentiation of Muscovy duck and goose parvoviruses based on NS gene characterization, *J Vet Med Sci*, 80, doi: 10.1292/jvms.18-0256.
- Wang, M., Zhang, M., Lu, Y., Kang, X., Meng, C., Zhou, L., Li, A., Li, Z. and Song, H. (2020) Analyses of prevalence and molecular typing of *Salmonella* in the goose production chain, *Poultry Sci*, 99, doi: 10.1016/j.psj.2019.12.008.
- Wattrang, E., Jäderblom, V., Jinnerot, T., Eriksson, H., Bagge, E., Persson, M., Dalgaard, T. S. and Söderlund, R. (2019) Detection and quantification of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in blood from infected chickens - addressing challenges with detection of DNA from infectious agents in host species with nucleated red blood cells, *J Med Microbiol*, 68, doi: 10.1099/jmm.0.001016.
- Wattrang, E., Eriksson, H., Jinnerot, T., Persson, M., Bagge, E., Söderlund, R., Naghizadeh, M. and Dalgaard, T. S. (2020) Immune responses upon experimental *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection of naïve and vaccinated chickens, *Vet Res*, 51, doi: 10.1186/s13567-020-00830-9.
- Woźniakowski, G. (2009) Genetic variance of Derzsy's disease strains isolated in Poland, *J Mol Gent Med*, 03, doi: 10.4172/1747-0862.1000037.
- Woźniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E. and Kozdrun, W. (2012) Quantitative analysis of waterfowl parvoviruses in geese and Muscovy ducks by real-time polymerase chain reaction: correlation between age, clinical symptoms and DNA copy number of waterfowl parvoviruses, *BMC Vet Res*, 8, doi: 10.1186/1746-6148-8-29.
- Woźniakowski, G. and Tarasiuk, K. (2015) Visual detection of goose haemorrhagic polyomavirus in geese and ducks by loop-mediated isothermal amplification, *Avian Pathol*, 44, doi: 10.1080/03079457.2015.1049585.
- Yang, J.-L., Cheng, A.-C., Wang, M.-S., Pan, K.-C., Li, M., Guo, Y.-F., Li, C.-F., Zhu, D.-K. and Chen, X.-Y. (2009) Development of a fluorescent quantitative real-time polymerase chain reaction assay for the detection of Goose parvovirus in vivo, *Virol J*, 6, doi: 10.1186/1743-422X-6-142.
- Yang, K., Yin, D., Xu, L., Liang, Y., Tu, J., Song, X., Shao, Y., Liu, H. and Qi, K. (2020) A TaqMan-based quantitative real-time PCR assay for identification of the goose circovirus, *Mol Cell Probes*, 52, doi: 10.1016/j.mcp.2020.101564.
- Yao, X.-Y., Yang, J.-C., Yuan, S., Zeng, F.-C., Zhang, Y.-Q., Liu, H., Sun, J., Lv, Z.-H., Huang, S.-J. and Zhang, X.-L. (2022) Extensive genetic diversity and recombination events identified in goose circoviruses circulating in partial areas of Guangdong province, Southern China, *Poultry Sci*, 101, doi: 10.1016/j.psj.2022.101767.

Yu, C.-Y., Chou, S.-J., Yeh, C.-M., Chao, M.-R., Huang, K.-C., Chang, Y.-F., Chiou, C.-S., Weill, F.-X., Chiu, C.-H., Chu, C.-H. and Chu, C. (2008) Prevalence and Characterization of Multidrug-Resistant (Type ACSSuT) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains in Isolates from Four Gosling Farms and a Hatchery Farm, *J Clin Microbiol*, 46, doi: 10.1128/JCM.00709-07.

Zhang, J., Chen, L., Wang, J., Yassin, A. K., Butaye, P., Kelly, P., Gong, J., Guo, W., Li, J., Li, M., Yang, F., Feng, Z., Jiang, P., Song, C., Wang, Y., You, J., Yang, Y., Price, S., Qi, K., Kang, Y. and Wang, C. (2018) Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry, *Sci Rep*, 8, doi: 10.1038/s41598-018-22084-4.

Zhang J, Liu P, Wu Y, Wang M, Jia R, Zhu D, Liu M, Yang Q, Wu Y, Zhao X, Zhang S, Liu Y, Zhang L, Yu Y, You Y, Chen S, Cheng A. (2019) Growth characteristics of the novel goose parvovirus SD15 strain in vitro. *BMC Vet Res*. 15, doi: 10.1186/s12917-019-1807-y.

Zhang, S., Yang, J., Wang, Z., Chen, L., Diao, Y. and Tang, Y. (2020) Research Note: Development of an ELISA to distinguish between goose parvovirus infection and vaccine immunization antibodies, *Poultry Sci*, 99, doi: 10.1016/j.psj.2019.12.012.

Zhang, S., Chen, Shuling, Rehman, M. U., Yang, H., Yang, Z., Wang, M., Jia, R., Chen, Shun, Liu, M., Zhu, D., Zhao, X., Wu, Y., Yang, Q., Huan, J., Ou, X., Mao, S., Gao, Q., Sun, D., Tian, B. and Cheng, A. (2021) Distribution and association of antimicrobial resistance and virulence traits in *Escherichia coli* isolates from healthy waterfowls in Hainan, China, *Ecotoxicol Environ Saf*, 220, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112317.

Ziółkowska, G., Tokarzewski, S. and Nowakiewicz, A. (2014) Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland, *Poultry Sci*, 93, doi: 10.3382/ps.2013-03702.

Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka grupy badawczej gęsi.....	33
Tabela 2. Wartości graniczne minimalnego stężenia hamującego (MIC) [$\mu\text{g/ml}$] wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków wobec pałeczek Enterobacteriaceae opracowano na podstawie wytycznych EUCAST oraz CLSI (M100 oraz VET01S ED5:2020).....	38
Tabela 3. Wybrane geny oporności na chemioterapeutyki wg. Song, 2019; Domniguez, 2018; Türkyilmaz 2009; Rebelo, 2018	41
Tabela 4. Nazwy starterów, ich sekwencje, wielkość produktów oraz temperatury przyłączania starterów użytych do amplifikacji wybranych genów oporności na chemioterapeutyki.....	41
Tabela 5. Geny zjadliwości, sekwencje starterów i wielkość produktów PCR.....	46
Tabela 6. Izolaty bakteryjne i grzybicze uzyskane w latach 2019/2020 z materiału pobranego od gęsi	60
Tabela 7. Wyniki wrażliwości szczepów <i>E. rhusiopathiae</i> , <i>G. anatis</i> oraz <i>S. Typhimurium</i> na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki.....	61
Tabela 8. Wyniki badań bakteriologicznych, mikologicznych oraz w kierunku zakażeń wirusowych, stad gęsi przebadanych w 2019 roku w I i II sezonie.....	63
Tabela 9. Wyniki badań bakteriologicznych, mikologicznych oraz w kierunku zakażeń wirusowych, stad gęsi przebadanych w 2020 roku w I i II sezonie.....	64
Tabela 10. Wyznaczone wartości minimalnych stężeń hamujących [$\mu\text{g/ml}$] wzrost szczepów <i>E. coli</i> wyizolowanych od gęsi [n=23] w 2019 r., dla wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków	71
Tabela 11. Wyznaczone wartości minimalnych stężeń hamujących [$\mu\text{g/ml}$] wzrost szczepów <i>E. coli</i> wyizolowanych od gęsi [n=20] w 2020 r., dla wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków	72
Tabela 12. Profile wielolekooporności pałeczek <i>E. coli</i> wyizolowanych od gęsi w 2019 roku	75
Tabela 13. Profile wielolekooporności pałeczek <i>E. coli</i> wyizolowanych w 2020 roku .	75
Tabela 14. Wartość OD oraz ocena zdolności tworzenia biofilmu szczepów <i>E. coli</i> wyizolowanych od gęsi [n=43] w roku 2019 oraz 2020.....	87
Tabela 15. Zbiorcze zestawienie prewalencji występowania genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, genów zjadliwości a także profili oporności i zdolność tworzenia biofilmu u szczepów <i>E. coli</i> wyizolowanych w 2019 r. od gęsi.....	88
Tabela 16. Zbiorcze zestawienie prewalencji występowania genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, genów zjadliwości a także profili oporności i zdolność tworzenia biofilmu u szczepów <i>E. coli</i> wyizolowanych w 2020 r. od gęsi.....	89
Tabela 17. Zakres wartości OD przeciwciał anti-GPV występujących w surowicy gęsi, pobranej w roku 2019 i 2020 r.....	92
Tabela 18. Wyniki badań w kierunku zakażeń GPV, GoCV, GHPV oraz zakażeń mieszanych uzyskane w próbkach pobranych od gęsi w 2019 i 2020 r.	96
Tabela 19. Wyniki badań w kierunku zakażeń GPV, GoCV, GHPV oraz zakażeń mieszanych uzyskane w próbkach pobranych od gęsi w 2019 r.	97
Tabela 20. Wyniki badań w kierunku zakażeń GPV, GoCV, GHPV oraz zakażeń mieszanych uzyskane w próbkach pobranych od gęsi w 2020 r.	98
Tabela 21. Podsumowanie stanu zdrowotnego gęsi badanych w 2019 i 2020 r.....	103

11. Spis rycin

Rycina 1. Pogłowie gęsi w Polsce w 2020 r. z podziałem na województwa. Źródło: opracowanie Biura Analiz i Strategii KOWR na podstawie danych GUS	7
Rycina 2. Kierunki eksportu mięsa gęsiego z Polski w 2020 r. Źródło: opracowanie Biura Analiz i Strategii KOWR na podstawie danych Ministerstwa Finansów	8
Rycina 3. Schematyczne przedstawienie procedury pobierania próbek do badań	34
Rycina 4. Schemat rozmieszczenia szeregu rozcieńczeń antybiotyków i chemioterapeutyków na płytce Thermo Scientific™ Sensititre™ Avian AVIAN1F AST Plate. Fotografia pochodzi z instrukcji-Sensititre Plate Guide, Sensititre™ Avian AVIAN1F AST Plate.	37
Rycina 5. Rozkład stężeń kolistyny na pasku MIC stripy/stripped plate	39
Rycina 6. Płytki MIC stripy/stripped plate z hodowlą bakteryjną po inkubacji, gotowa do odczytu	40
Rycina 7. Procentowy rozkład szczepów <i>E. coli</i> izolowanych od gęsi w 2019 r. [n=23], wrażliwych, średniowrażliwych i opornych na działanie wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków	73
Rycina 8. Procentowy rozkład szczepów <i>E. coli</i> izolowanych od gęsi w 2020 r. [n=20], wrażliwych, średniowrażliwych i opornych na działanie wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków	74
Rycina 9. Prewalencja wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki badanych szczepów <i>E. coli</i> , izolowanych od gęsi w 2019 r. [n=23].....	79
Rycina 10. Prewalencja wybranych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki badanych szczepów <i>E. coli</i> , izolowanych od gęsi w 2020 r. [n=20].....	80
Rycina 11. Porównanie udziału procentowego obecności genów oporności u szczepów <i>E. coli</i> wyizolowanych od gęsi [n=43] w roku 2019 i 2020	81
Rycina 12. Prewalencja wybranych genów zjadliwości szczepów <i>E. coli</i> izolowanych od gęsi [n=23] w roku 2019 oraz 2020 [n=20].....	84
Rycina 13. Porównanie udziału procentowego występowania genów zjadliwości u szczepów <i>E. coli</i> wyizolowanych od gęsi w roku 2019 [n=23] i 2020 [n=20]	85
Rycina 14. Drzewo filogenetyczne skonstruowane metodą najbliższego sąsiada (ang. neighbor-joining method) dla pełnych sekwencji genomów badanych parwovirusów pochodzących od gęsi (2019 i 2020 r.) oraz sekwencji referencyjnych pochodzących z bazy GenBank. Ocenę istotności statystycznej analizy filogenetycznej przeprowadzono przy użyciu testu typu bootstrap, wykonując 1000 powtórzeń.	100
Rycina 15. Drzewo filogenetyczne skonstruowane metodą najbliższego sąsiada (ang. neighbor-joining method) dla pełnych sekwencji genomów badanych cirkowirusów pochodzących od gęsi (2019 i 2020 r.) oraz sekwencji referencyjnych pochodzących z bazy GenBank. Ocenę istotności statystycznej analizy filogenetycznej przeprowadzono przy użyciu testu typu bootstrap, wykonując 1000 powtórzeń.....	102

