



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Joanna Turniak

Epidemiologia zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w stadach kur w Polsce w latach 2010 – 2019

Epidemiology of avian hepatitis E virus (aHEV) infection
in chicken flocks in Poland in 2010 – 2019

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem promotora:

Prof. dr. hab. Piotra Szeleszczuka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej

Promotor pomocniczy: dr hab. Beata Dolka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej

Warszawa, rok 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 12.08.2025

Czytelny podpis promotora RODR SZELESIUK

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 12.08.2025

Czytelny podpis autora rozprawy Joanna Turak

Podziękowania

Pragnę podziękować serdecznie wszystkim osobom, które przyczyniły się do zrealizowania moich badań oraz napisania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Przede wszystkim pragnę podziękować mojemu Promotorowi Prof. dr hab. Piotrowi Szeleszczukowi, za opiekę merytoryczną oraz za wprowadzenie mnie w świat seroepidemiologii drobiu.

Serdeczne podziękowania składam mojej Promotor pomocniczej dr hab. Beacie Dolce za bezcenne wskazówki i ogromne zaangażowanie, dzięki któremu niniejsza praca doktorska powstała. Zwłaszcza na ostatnim etapie, za żmudne i wielogodzinne poprawianie mojego stylu zawsze jak tylko była taka potrzeba.

Dziękuję również wszystkim współpracownikom z Zakładu Chorób Ptaków oraz z zaprzyjaźnionych jednostek, którzy na różnych etapach badań i pracy pomagali mi i podpowiadali, gdy tylko była taka potrzeba.

Chciałabym także wyrazić wdzięczność wszystkim lekarzom weterynarii z terenu, którzy mi zaufali i dostarczali materiał do badań.

Dziękuję mojemu mężowi oraz bliskim za wspieranie mnie podczas tej długiej drogi.

SPIS TREŚCI

Streszczenie	11
Wykaz stosowanych skrótów i ich znaczenie.....	15
I. WSTĘP	18
1. Rys historyczny zakażeń aHEV	18
2. Taksonomia wirusa zapalenia wątroby typu E u ptaków	21
3. Budowa wirusa zapalenia wątroby typu E	28
3.1. Otwarta ramka odczytu 1 (ORF 1).....	29
3.2. Otwarta ramka odczytu 2 (ORF 2).....	29
3.3. Otwarta ramka odczytu 3 (ORF 3).....	30
4. Epidemiologia zakażeń aHEV	30
5. Patogeneza aHEV	32
6. Diagnostyka molekularna zakażeń aHEV	33
7. Objawy kliniczne w przebiegu zapalenia wątroby typu E u kur.....	34
8. Zmiany anatomopatologiczne w przebiegu zapalenia wątroby typu E u kur	35
9. Zmiany histopatologiczne w przebiegu zapalenia wątroby typu E u kur.....	37
10. Diagnostyka serologiczna zapalenia wątroby typu E u kur	37
11. Leczenie zapalenia wątroby typu E u kur.....	38
12. Profilaktyka zapalenia wątroby typu E u kur	38
II. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	40
III. MATERIAŁ I METODY	41
1. Materiał.....	41
1.1. Materiał do badań serologicznych	41
1.1.1. Materiał do badań serologicznych ze stad rodzicielskich kur linii mięsnej, nieśnej oraz stad niosek towarowych w Polsce z lat 2010 – 2018	41
1.1.2. Materiał do oceny specyficznej serokonwersji w ognisku BLS	42

1.1.3.	Materiał do monitoringowych badań serologicznych stad kurcząt rzeźnych w Polsce w latach 2010, 2014 oraz 2019	42
1.2.	Materiał do badań metodami RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR	43
1.2.1.	Materiał do badań molekularnych – tkanki i żółć.....	44
1.2.2.	Materiał do badań molekularnych – zarodki.....	44
1.2.3.	Materiał do badań molekularnych – wymazy	45
2.	Metody.....	45
2.1.	Badania serologiczne	45
2.2.	PCR.....	48
2.3.	RT-PCR dla genu kodującego helikazę (fragment ORF1) oraz genu kodującego białko kapsydu (ORF2)	49
2.4.	Real-Time RT-PCR (jakościowe) dla genu kodującego białko kapsydu (ORF2)	51
2.5.	Kontrola pozytywna w reakcji RT-PCR i Real-Time RT-PCR.....	54
3.	Analiza statystyczna	54
IV.	WYNIKI.....	57
1.	Wyniki monitoringu serologicznego przeprowadzanego w latach 2010 – 2019.....	57
1.1.	Wyniki badań serologicznych w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków w wybranych stadach rodzicielskich kur linii mięsnej, nieśnej oraz stad niosek towarowych w Polsce w latach 2010 – 2018	57
1.2.	Zestawienie okresowych wyników badań ELISA w kierunku oceny specyficznej serokonwersji w ognisku BLS	60
1.3.	Wyniki badań ELISA w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków w wybranych stadach kurcząt rzeźnych w Polsce w latach 2010, 2014 oraz 2019	61
1.4.	Zestawienie wyników badań ELISA w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków w wybranych stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnych i pochodzących od nich stad broilerów w 2014 roku.....	65
2.	Wyniki badań molekularnych przeprowadzonych w celu wykrycia obecności materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E u kur.....	66

2.1.	Wyniki badań molekularnych dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w tkankach oraz żółci w wybranych stadach rodzicielskich kurcząt rzeźnych i stadach niosek towarowych w Polsce w latach 2011 – 2019.....	66
2.2.	Wyniki badań molekularnych w kierunku genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w zarodkach kurzych zakażonych materiałem tkankowym z roku 2013.	76
2.3.	Wyniki badań molekularnych przeprowadzonych w celu wykrycia genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w wymazach pochodzących z ogniska BLS	77
2.4.	Zgodność metod RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu – dla całości materiału badanego	78
2.5.	Zgodność metod RT-PCR w celu wykrycia genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu – dla całości materiału badanego.....	79
2.6.	Wyniki badań molekularnych w zależności od użytego materiału badawczego	79
2.7.	Analiza filogenetyczna	81
3.	Korelacja między wynikami badań serologicznych i molekularnych	85
V.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	89
VI.	WNIOSKI.....	105
VII.	ZAŁĄCZNIK	106
VIII.	PIŚMIENNICTWO	147
IX.	SPIS TABEL I RYCIN.....	160

Streszczenie

Epidemiologia zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w stadach kur w Polsce w latach 2010 – 2019

Zapalenie wątroby typu E u kur, znane również jako choroba dużej wątroby i śledziony (Big Liver and Spleen Disease – BLS) wywołuje wirus zapalenia wątroby typu E ptaków (avian Hepatitis E Virus – aHEV), wirus RNA z rodzaju *Avihepevirus* (gatunek: *Avihepevirus magniiecur*). Chorobę rozpoznano po raz pierwszy w Australii w 1980 roku. W Europie pierwsze przypadki odnotowano w 2004, a w Polsce w 2011 roku, chociaż obserwacje terenowe wskazywały, że choroba występowała w naszym kraju wcześniej.

Celem pracy było określenie występowania zakażenia aHEV w wybranych stadach drobiu gatunku kura (*Gallus gallus domesticus*) w Polsce w latach 2010 – 2019 za pomocą badań serologicznych i molekularnych, określenie zależności między występowaniem zakażenia a wiekiem ptaków oraz wpływu zakażenia na wartość europejskiego wskaźnika wydajności (EWW) w stadach brojlerów kurzych. Zbadano również przydatność różnych tkanek do diagnostyki BLS a także obecność dwóch różnych genów aHEV w badanych próbkach oraz przeprowadzono ich szczegółową analizę.

Badaniu metodą ELISA poddano 5 272 surowic od wybranych stad reprodukcyjnych kur linii mięsnych, linii nieśnych kur jak również od niosek jaj konsumpcyjnych oraz 2 112 surowic kurcząt brojlerów. Określono seroprewalencję aHEV w różnych typach produkcyjnych zarówno pod względem liczby dodatnich stad, jak i dodatnich osobników w stadach. Badaniom za pomocą technik molekularnych (RT-PCR oraz Real Time RT-PCR) poddano RNA izolowane z wymazów, tkanek (wątroba, śledziona, ściana pęcherzyka żółciowego) i żółci pochodzących z 48 stad reprodukcyjnych kur linii mięsnych i niosek jaj konsumpcyjnych.

Badania serologiczne i molekularne wykazały powszechne występowanie zakażenia aHEV w badanych stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnych, linii nieśnych kur jak również u niosek jaj konsumpcyjnych w Polsce w latach 2010 – 2019. Wyniki badań serologicznych były dodatnie w 96,96% stad, natomiast w 60,42% stad, stwierdzono obecność materiału genetycznego wirusa. Dodatnie wyniki badania serologicznego stwierdzono także w 54,35% stad jednodniowych piskląt brojlerów. Materiał genetyczny aHEV stwierdzano częściej w stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnych (62,22%) niż w stadach niosek jaj konsumpcyjnych (33,33%). Wirusa aHEV częściej wykrywano w pęcherzyku żółciowym niż w wątrobie, śledzionie i żółci, co wskazuje na wysoką

przydatność tej próbki do diagnostyki molekularnej. Obecność materiału genetycznego wirusa także w wymazach z tchawicy wskazuje na możliwą transmisję zakażenia drogą oddechową. Stwierdzono bardzo dobrą zgodność między RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu aHEV. Analiza filogenetyczna potwierdziła różnorodność w obrębie wykrywanych genotypów aHEV w Polsce w latach 2011 – 2019. Analiza genu kodującego helikazę wykazała przynależność szczepów aHEV do czterech genotypów (genotyp 1, 2, 3 oraz tzw. domniemany nowy genotyp), zaś genu kodującego kapsyd do dwóch genotypów (genotyp 2 i 3).

Słowa kluczowe: choroba dużej wątroby i śledziony (BLS), aHEV, helikaza, kapsyd, ELISA

Abstract

Epidemiology of avian hepatitis E virus (aHEV) infection in chicken flocks in Poland in 2010 – 2019

Hepatitis E in chickens, also known as Big Liver and Spleen Disease (BLS), is caused by avian Hepatitis E Virus (aHEV), an RNA virus of the *Avihepevirus* genus (species: *Avihepevirus magniiecur*). The disease was first recognized in Australia in 1980. The first cases were reported in Europe in 2004 and in Poland in 2011, although field observations indicated that the disease had occurred in Poland earlier.

The aim of this study was to determine the prevalence of aHEV infection in selected chicken (*Gallus gallus domesticus*) flocks in Poland between 2010 and 2019 using serological and molecular tests, to determine the relationship between infection prevalence and bird age, and to determine the impact of infection on the European Efficiency Index in broiler chicken flocks. The usefulness of various tissues for BLS diagnosis was also examined, as well as the presence of two different aHEV genes in the tested samples.

ELISA testing was performed on 5,272 sera from selected broiler breeder, layer breeder and commercial layer flocks and 2,112 sera from broiler chickens flocks. The seroprevalence of aHEV in various production types was determined, both in terms of the number of positive flocks and positive individuals within flocks. RNA extracted from swabs, tissue samples (liver, spleen, gallbladder wall), and bile from 48 broiler breeder and commercial layer flocks was tested using molecular techniques (RT-PCR and Real Time RT-PCR).

Serological and molecular studies demonstrated the widespread occurrence of aHEV infection in studied broiler breeder, layer breeder and commercial layer flocks in Poland between 2010 and 2019. Serological test results were positive in 96.96% of flocks, while the presence of virus genetic material was detected in 60.42% of flocks. Positive serological test results were also found in 54.35% of flocks of day-old commercial broilers. The genetic material of the aHEV was detected more frequently in broiler breeder flocks (62.22%) than in commercial layers flocks (33.33%). aHEV was detected more frequently in the gallbladder than in the liver, spleen, and bile, indicating the high usefulness of this sample for molecular diagnostics. The presence of virus genetic material in tracheal swabs also indicates possible respiratory transmission. A very good agreement was found between RT-PCR and real-time RT-PCR for the gene encoding the aHEV capsid protein.

Phylogenetic analysis confirmed the diversity of aHEV genotypes detected in Poland between 2011 and 2019. Analysis of the helicase gene showed that the aHEV strains belonged to four genotypes (genotypes 1, 2, 3, and the so-called putative new genotype), while the capsid gene belonged to two genotypes (genotypes 2 and 3).

Key words: big liver and spleen diseases (BLS), aHEV, helicase, capsid, ELISA

Wykaz stosowanych skrótów i ich znaczenie

Skrót	Nazwa angielska	Nazwa polska
AaHEV	Australia avian Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ptaków izolaty z Australii
aavUSAaHEV	'apparently avirulent' USA avian Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ptaków izolaty "najwyraźniej niejadliwe" z USA
AGID	Agar Gel Immunodiffusion	immunodyfuzja w żelu agarozowym
aHEV	avian Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ptaków
AL	Avian Leucosis	białaczka ptaków
ANOVA	analysis of variance	analiza wariancji
BB	Broiler Breeders	stado rodzicielskie brojlerów kurzych, stado hodowlane (reprodukcyjne) brojlerów kurzych, stada reprodukcji mięsnej
BLS	Big Liver and Spleen disease	choroba dużej wątroby i śledziony
BLSV	Big Liver and Spleen disease Virus	wirus wywołujący chorobę dużej wątroby i śledziony
bp (pz)	Base pair	para zasad
CB	Commercial Broilers	stado brojlerów kurzych
CI	Confidence Interval	przedział ufności
CL	Commercial Layers	nioski jaj konsumpcyjnych, stada niosek towarowych
Ct	Cycle treshold	cykl progowy zdefiniowany jako cykl, przy którym sygnał fluorescencji osiąga pewną wartość progową
CV (%CV)	Coefficient of Variation	współczynnik zmienności
DNA	Deoxyribonucleic acid	kwas dezoksyrybonukleinowy
di	days of incubation	dzień inkubacji
dpi	days post-infection	dni po zakażeniu
EaHEV	European avian Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ptaków izolaty z Europy
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	test immunoenzymatyczny
EWV	European Efficiency Index	Europejski Współczynnik Wydajności
FDS	primary feather drop syndrome	zespół utraty lotek pierwszego rzędu

FHF	fulminant hepatic failure	niewydolność wątroby o przebiegu piorunującym
FLHS	Fatty Liver Haemorrhagic Syndrome	zespół krwotocznego stłuszczenia wątroby
FTA	Flinders Technology Associates filter paper	karta FTA
Gmean (GMT)	Geometric Mean Titer	średnie miano geometryczne
HEV	Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E
hHEV	human Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ludzi
HRHS	Hepatic Rupture Hemorrhage Syndrome	zespół krwotoczny z pęknięciem wątroby
HSD	Honestly Significant Difference	metoda HSD Tukeya
HSS	Hepatitis-Splenomegaly Syndrome	syndrom zapalenia wątroby i powiększenia śledziony
HUaHEV	Hungary avian Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ptaków izolaty z Węgrzech
ICTV	International Committee of Taxonomy of Viruses	Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów
IgY	Immunoglobulin Y	Immunoglobulina klasy Y
kb (kpz)	Kilo base pair	kilo (tysiąc) par zasad
LB	Layer Breeders	stada rodzicielskie niosek, stada reprodukcji nieśnej
Max (Tmax)	Maximum Titer	miano maksymalne
Min (Tmin)	Minimal Titer	miano minimalne
N	Numer of samples	liczba próbek
NEG (%NEG)	Numer of negative sera (percengate od negative sera)	liczba surowic negatywnych (% surowic negatywnych)
NTC	No Template Control	kontrola reakcji bez matrycy
ORF	Open Reading Frame	otwarta ramka odczytu
p, wartość p	p-value, probability value	prawdopodobieństwo testowe
PCR	Polymerase Chain Reaction	reakcja łańcuchowa polimerazy
POS (%POS)	Numer of positive sera (percengate od positive sera)	liczba surowic pozytywnych (% surowic pozytywnych)
pUSAaHEV	'prototype' USA avian Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ptaków izolaty "prototypowe" z USA
Real-Time PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction	łańcuchowa reakcja polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym
Real-Time RT-PCR	Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym

RNA	Ribonucleic acid	kwasy rybonukleinowe
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją
SD	Standard Deviation	odchylenie standardowe
SE	Standard Error	błąd standardowy
sHEV	swine Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E świń
SPF	Specific Pathogen-Free	zwierzęta wolne od specyficznych patogenów występujących u danego gatunku
SR	Seroconversion Rate	współczynnik serokonwersji
ssRNA	Single stranded RNA	wirusy RNA z pojedynczą nicią
T _m	melting temperature	temperatura topnienia
TWaHEV	Taiwan avian Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ptaków izolaty z Tajwanu
USAaHEV	USA avian Hepatitis E Virus	wirus zapalenia wątroby typu E ptaków izolaty z USA
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia
WS (SI)	Seroconversion Index	współczynnik serokonwersji

I. WSTĘP

Odkąd ponad 40 lat temu po raz pierwszy zaobserwowano wirusowy zespół dużej wątroby i śledziony (Big Liver and Spleen Syndrome – BLS) w stadach rodzicielskich brojlerów kurzych [23] jest on wciąż mało poznany i rzadko rozpoznawany w praktyce, gdyż nie charakteryzuje się jednolitym i specyficznym obrazem klinicznym. Ponadto, brak dostępnych szczepionek oraz nierzadko lekceważenie znaczenia problemu, powodują, że nie jest on skutecznie rozwiązywany.

1. Rys historyczny zakażeń aHEV

Zespół dużej wątroby i śledziony rozpoznano w Australii w 1980 roku i od tego czasu uważano go za przyczynę największych strat ekonomicznych w stadach rodzicielskich brojlerów i niosek jaj konsumpcyjnych. Charakteryzuje się on spadkiem produkcji nieśnej, niewielkim wzrostem śmiertelności, a także powiększeniem wątroby i śledziony [23,57]. Zakażenie potwierdzono w teście serologicznym AGID, stosując jako antygen homogenizaty wątroby i śledziony chorych ptaków. Następne doniesienia pochodzą z Wielkiej Brytanii i Stanów Zjednoczonych, gdzie również kontakt kur z wirusem potwierdzono metodami serologicznymi, w tym po raz pierwszy testem ELISA w roku 1993 [6,23,58,87]. Dodatkowo w USA zakażenie wirusem BLS było wiązane z zespołem utraty lotek pierwszego rzędu (FDS – primary feather drop syndrome). Poza spadkiem produkcji nieśnej i utratą lotek stwierdzano opóźnione dojrzewanie płciowe ptaków [6,42]. Pierwsze informacje o diagnostyce molekularnej tej choroby pochodzą z Australii z 1999 roku, gdzie opracowano RT-PCR z zastosowaniem zdegenerowanych starterów dla genu kodującego specyficzną helikazę [57].

Od 1991 pojawiały się w piśmiennictwie naukowym doniesienia na temat zbliżonego do BLS syndromu zapalenia wątroby i powiększenia śledziony (HSS – hepatitis-splenomegaly syndrome), który rozpoznano w zachodniej Kanadzie. W 1997 potwierdzono, że zespół ten występuje też w USA i we wschodniej Kanadzie [25,27]. Od samego początku podejrzewano, iż BLS i HSS są ze sobą w jakiś sposób powiązane. HSS charakteryzował się zwiększoną śmiertelnością w stadach rodzicielskich w wieku od 30 do 72 tygodni, dochodziło do regresji jajnika, powiększenia wątroby i śledziony, a także pojawiał się krwisty płyn w brzusznej części jamy ciała. Chorobę diagnozowano zarówno w stadach rodzicielskich brojlerów, jak i u niosek towarowych. Według niektórych doniesień nie notowano przypadków HSS po 1994 roku, dlatego też etiologia tego syndromu jest mało

poznana, chociaż z powodu zapalenia naczyń i odkładania się złogów amyloidu podejrzewano mechanizm immunologiczny [85]. U drobiu z zespołem HSS wykrywano wirus zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV), ale równie często wirus był wykrywany w stadach gdzie nie stwierdzano HSS [2,85].

W 2004 roku w USA udowodniono, że HSS występuje enzootycznie także w formie subklinicznej [80]. Następne przypadki zakażeń aHEV miały miejsce w Ontario, w Kanadzie jesienią 2003 roku [2].

W 2004 roku odnotowano pierwsze przypadki BLS w Europie, po raz pierwszy we Włoszech [42]. Rok później w 2005 wystąpił kolejny przypadek na Węgrzech [54]. Następnie w 2008 roku w Hiszpanii potwierdzono obecność przeciwciał przeciwko aHEV w surowicach ptaków pochodzących ze stad rodzicielskich brojlerów kurzych oraz niosek towarowych [59]. W 2009 roku po raz pierwszy wykryto materiał genetyczny wirusa w Rosji [30]. Pierwszy przypadek aHEV w Finlandii zdiagnozowano w styczniu 2013 roku [60], W Azji po raz pierwszy aHEV wykryto w 2009 roku w Chinach, gdzie sekwencja genomu wirusa była w 98,3% identyczna z sekwencją genotypu 3 aHEV – EaHEV [110],[110], natomiast w 2013 roku badania w Tajwanie wykazały, że 95% z 61 badanych stad rodzicielskich brojlerów kurzych oraz niosek towarowych miało przeciwciała przeciwko BLS w ELISA [26]. W 2019 roku opisano nowe szczepy aHEV pochodzące z Pakistanu, których nie można było przyporządkować do wcześniej opisanych genotypów tego wirusa [29].

W Polsce pierwszy opis przypadku klinicznego w przebiegu BLS przedstawił Szeleszczuk w 2011 roku w doniesieniu ustnym na I-wszym Kongresie Praktyki Weterynaryjnej w Łodzi [84], ale w terenie syndrom ten był obserwowany już kilka lat wcześniej, przynajmniej od 2007 roku przez praktykujących lekarzy weterynarii [7,8,89,90]. W doniesieniu Szeleszczuka choroba wystąpiła na jednym z czterech stad rodzicielskich brojlerów kurzych na fermie w województwie mazowieckim w 2010 roku. W stadzie odnotowano spadek nieśności oraz wzrost śmiertelności wraz z charakterystycznymi dla aHEV zmianami sekcyjnymi. Za pomocą ELISA potwierdzono występowanie przeciwciał przeciwko BLS (w wieku 48 tygodni – 43,48% surowic pozytywnych oraz CV 109% i po 7 tygodniach – 60,87% surowic pozytywnych i CV 99%) [84].

W 2013 roku Bartczak przedstawił w doniesieniu ustnym przypadek zapalenia wątroby typu E w Polsce z 2007 roku, który następnie opisano w 2014. Chorobę zdiagnozowano w dwóch z sześciu stad rodzicielskich brojlerów kurzych na jednej fermie

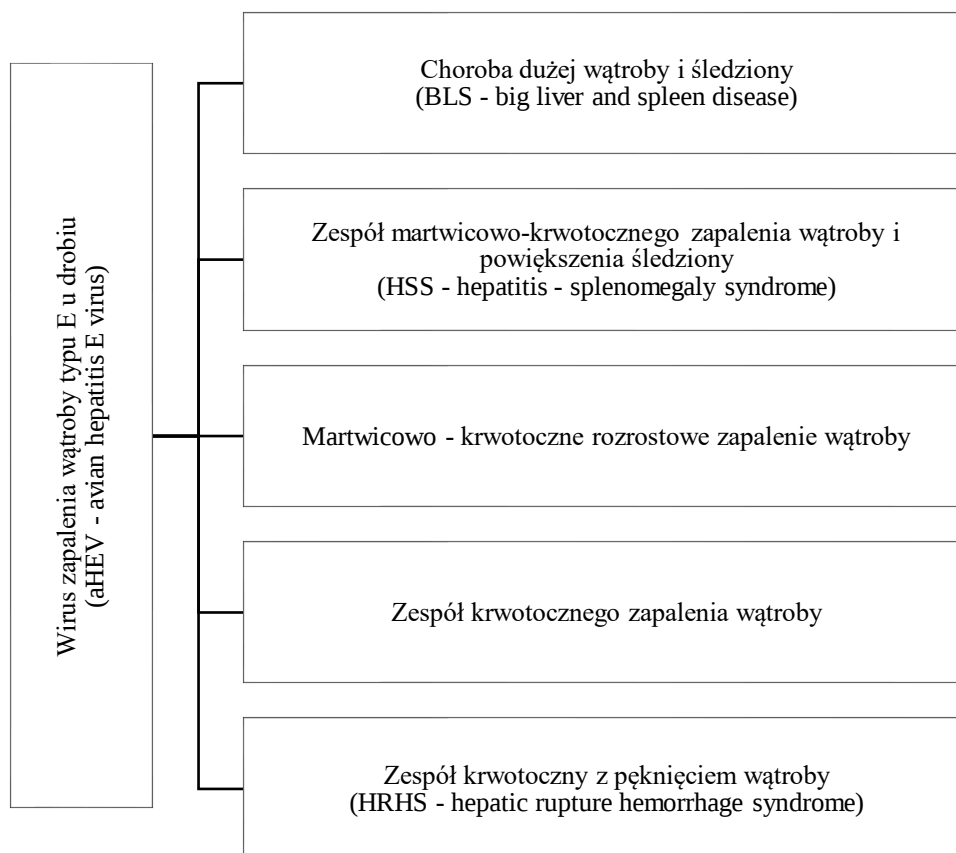
Wstęp

w województwie wielkopolskim [7,8]. U 44 tygodniowych ptaków odnotowano wzmożone upadki (0,5% tygodniowo, maksymalnie osiągając 2%) oraz spadek nieśności (ok. 2,5%). Klinicznie zaobserwowano jedynie osowiałość, bladość grzebienia i dzwonków. W obrazie sekcyjnym stwierdzono dobrą kondycję, bladość skóry i powłok brzusznych, obecność w jamie ciała płynu podbarwionego krwią (często prześwitującego przez powłoki brzuszne). Wątroba była powiększona, krucha, z ogniskami martwicy, wybroczynami, czasem ze skrzepami krwi pod torebką jako konsekwencja pęknięcia narządu. U części ptaków zaobserwowano także znaczne powiększenie śledziony z widocznymi ogniskami martwicy oraz zmianami w strukturze narządu. Wykonano badanie histopatologiczne które wykluczyło chorobę Mareka oraz białaczkę, a także wysłano materiał na kartach FTA (odcisk miąższu wątroby, śledziony oraz żółć) do laboratorium na Uniwersytecie w Wiedniu, gdzie za pomocą badań RT-PCR potwierdzono zakażenie aHEV. Ferma była pod stałą kontrolą weterynaryjną i w kolejnych latach (2008 – 2012) upadki były w normie, sporadycznie stwierdzano pojedyncze sztuki ze zmianami sekcyjnymi charakterystycznymi dla zakażenia aHEV (wyniki RT-PCR były ujemne). W roku 2012 doszło do kolejnego epizodu z klinicznym zakażeniem aHEV na tej fermie, wówczas u ptaków w wieku ok. 50 tygodni odnotowano wzrost upadków (0,3 – 0,5% tygodniowo), spadek nieśności, a obraz sekcyjny padłych kur był charakterystyczny dla BLS. W tym czasie na tej fermie, ale w innym obiekcie były również utrzymywane ptaki 30 tygodniowe, u których zaobserwowano jedynie nieznaczny wzrost upadków. W badaniach RT-PCR wykonanych na Uniwersytecie w Wiedniu potwierdzono w obu przypadkach zakażenia aHEV. Wykonano również badania białka jaj w których również stwierdzono obecność przeciwciał anty-aHEV (stada w wieku 57 tygodni – 55% próbek pozytywnych i CV 80%; stada w wieku 33 tygodni – 83% próbek pozytywnych i CV 95%). Następnie infekcja przybrała ponownie formę podkliniczną, co można było potwierdzić zmniejszonym odsetkiem wyników pozytywnych w ELISA (badano surowice jeszcze dwukrotnie po 8 i 11 miesiącach od wystąpienia objawów klinicznych w 2012 roku) [7,8].

Kolejne przypadki, od 2015 roku w Polsce, opisali Matczuk i wsp., którzy potwierdzili powszechne występowanie zakażeń aHEV w kraju (56,14% stad rodzicielskich kurcząt rzeźnych i stadach niosek towarowych seropozytywnych w latach 2015 – 2017) [43].

W zależności od kraju, w którym opisywano chorobę wywoływaną przez ptasi wirus zapalenia wątroby typu E, była ona bardzo różnie nazywana na przestrzeni lat. Najczęściej stosowane nazwy to: choroba dużej wątroby i śledziony, zespół martwicowo-krwotocznego zapalenia wątroby i powiększenia śledziony [2], martwicowo-krwotoczne rozrostowe

zapalenie wątroby, zespół krwotocznego zapalenia wątroby oraz zespół krwotoczny z pęknięciem wątroby (**Ryc. 1**) [2,12,27,57,67,74].



Ryc. 1. Synonimy używane na określenie infekcji wirusem aHEV (rycina własna) na podstawie piśmiennictwa [2,12,27,57,67].

2. Taksonomia wirusa zapalenia wątroby typu E u ptaków

Czynnikiem etiologicznym BLS jest wirus zapalenia wątroby typu E (aHEV) należący do rodziny *Hepeviridae*, podrodziny *Orthohepevirinae*, rodzaju *Avihepevirus* (dawniej *Orthohepevirus*), gatunku *Avihepevirus magniiecur* (dawniej *Orthohepevirus B*).

Początkowo wirus zapalenia wątroby typu E (HEV – hepatitis E virus) został zakwalifikowany do rodziny *Caliciviridae*, lecz gdy okazało się, że brak jest wielu wspólnych cech pomiędzy HEV, a caliciwirusami taksonomię zmieniono [9].

Następnie pojawiła się propozycja by stworzyć nową jednostkę taksonomiczną o nazwie: *Hearviridae* (hepatitis E and related viruses), w której skład wchodził wirus zapalenia wątroby typu E oraz wirusy podobne do HEV (HEV-like) [25]. Ostatecznie od roku 2004 roku HEV jest zaliczany do rodziny: *Hepeviridae* [28,62].

Pojawiające się w miarę upływu czasu nowe dane powodowały, że taksonomia rodziny *Hepeviridae* była kilkakrotnie zmieniana. Początkowo zaproponowano zlikwidowanie rodzaju *Hepevirus* i na jego miejsce stworzenie dwóch oddzielnych rodzajów: *Orthohepevirus* i *Avihepevirus* [45,50]. Izolowane nowe szczepy wirusa spowodowały konieczność kolejnej zmiany w nazewnictwie, stąd w 2014 roku wprowadzono nową klasyfikację, według której rodzinę *Hepeviridae* podzielono na dwa rodzaje: *Orthohepevirus* i *Piscihepevirus*. Wirus zapalenia wątroby typu E ptaków umieszczono w rodzaju *Orthohepevirus* i gatunku *Orthohepevirus B* [70]. Na bieżąco pojawiające się nowe dane wskazywały, że podział taksonomiczny tych zarazków będzie nadal ulegał zmianom. Między innymi w roku 2015 i 2016 odkryto nowe jeszcze nieprzypisane do żadnej grupy szczepy wirusa występujące u dzikich ptaków. Szczep wirusa występujący u czapli nadobnej (*Egretta garzetta*) był najbardziej zbliżony budową do szczepów ptasich występujących głównie u drobiu, zaś szczepy występujące u ptaków drapieżnych takich, jak pustułka zwyczajna (*Falco tinnunculus*) czy kobczyk zwyczajny (*Falco vespertinus*) były bardziej zbliżone budową do gatunku *Orthohepevirus C* (występujących u szczura i fretki), co może mieć związek z dietą tych ptaków (żywią się różnego rodzaju nornicami, ryjówkami oraz myszami) oraz do *Orthohepevirus A* genotypu 4 (występującego u człowieka i świni) [65,66]. Szczep wykryty u sępów himalajskich (*Gyps himalayensis*) zamieszkujących ogród zoologiczny w Pekinie był natomiast najbardziej zbliżony do *Orthohepevirus A* genotypu 3, który występuje u człowieka, świni, ale także takich gatunków jak królik, jeleń czy mangusta, w tym przypadku było podejrzenie zakażenia międzygatunkowego, ale nie potwierdzono namnażania się wirusa w organizmie ptaków [35].

Pod koniec 2022 roku z powodu wielu nowych doniesień oraz coraz większej bazy pełnych genomów, a także fragmentów wirusów pochodzących z różnych rejonów świata oraz od różnych gatunków zwierząt, ICTV zmieniło taksonomię po raz kolejny (**Tab. 1**). Nadal pozostawiono rodzinę *Hepeviridae*, która dzieli się na dwie podrodziny: *Orthohepevirinae* oraz *Parahepevirinae*. Aktualnie wirus zapalenia wątroby typu E ptaków należy do podrodziny *Orthohepevirinae*, rodzaju *Avihepevirus*. Obecna klasyfikacja w obrębie rodzaju *Avihepevirus* wyróżnia dwa gatunki wirusa *Avihepevirus egretti* występujący u czapli nadobnej oraz *Avihepevirus magniiecur* występujący u kur. Wykryto wiele szczepów ptasich pochodzących od różnych gatunków, które nie zostały dotychczas zakwalifikowane do konkretnego gatunku wirusa [62,63]. Jednym z takich przykładów jest izolat zarazka występujący u wróbla (*Passer domesticus*), którego cały genom został

określony w 2018, z analizy jego struktury wynikało, że patogen ten powinien stanowić oddzielny szczep. Izolat wykazywał jednak większe podobieństwo do szczepów kurzych (ORF1 71-78%, ORF2 80%), niż do szczepu pochodzącego od czapli nadobnej (ORF1 55%, ORF2 68 %) [101].

Tab. 1. Taksonomia rodziny *Hepeviridae* (według Smith i wsp., (2014)[70], z uwzględnieniem genotypów aHEV zaproponowanych przez Billic i wsp., (2009)[10] i zmodyfikowanych w najnowszym ICTV[63] przez Purdy i wsp. (2022)[62] oraz nowo odkrytych jeszcze nieprzypisanych gatunków przez Lin i wsp. (2014)[37], Li i wsp. (2015)[35], Reuter i wsp. (2016)[65,66], Zhang i wsp. (2017)[104], Yang i wsp. (2018)[101], a także Wang i wsp. (2021)[94]).

Rodzina	Podrodzina	Rodzaj	Gatunek (aktualny)	Dominujący gatunek gospodarza	Genotyp	Gatunek (poprzedni)
<i>Hepeviridae</i>	<i>Orthohepevirinae</i>	<i>Avihepevirus</i>	<i>Avihepevirus egretti</i> (LEHEV)	Czapla nadobna (<i>Egretta garzetta</i>)	Nieklasyfikowane	Nieprzypisany
			<i>Avihepevirus magniiecur</i> (aHEV)	Kura (wykryty także u: drożdź śpiewak (<i>Turdus philomelos</i>), pójdzka zwyczajna (<i>Athene noctua</i>), gołąb miejski (<i>Columba livia domestica f. urbana</i>), myszółów zwyczajny (<i>Buteo buteo</i>))	1 genotyp (Australijski – AaHEV)	<i>Orthohepevirus B</i>
					2 genotyp (USA – USAaHEV) • pUSAaHEV • aavUSAaHEV	
					3 genotyp (Europejski – EaHEV / Węgierski – HUaHEV)	
					4 genotyp (Tajwański – TWaHEV)	
					5 genotyp (?)	
				Wróbel (<i>Passer domesticus</i>)	Nieklasyfikowane	
				Dzikie ptaki	Nieklasyfikowane	
				Sęp himalański (<i>Gyps himalayensis</i>)	Nieklasyfikowane	
				Pustułka zwyczajna (<i>Falco tinnunculus</i>)	Nieklasyfikowane	
				Kobczyk zwyczajny (<i>Falco vespertinus</i>)	Nieklasyfikowane	
		<i>Chirohepevirus</i>	<i>Chirohepevirus desmodi</i> (DBaHEV)	Wampir (nietoperz)	Nieklasyfikowane	Nieprzypisany
			<i>Chirohepevirus eptesici</i> (BaHEV)	Mroczek, nocek (nietoperze)	Nieklasyfikowane	<i>Orthohepevirus D</i>
			<i>Chirohepevirus rhinolophi</i> (HBaHEV)	Podkowcowate (nietoperze)	Nieklasyfikowane	Nieprzypisany

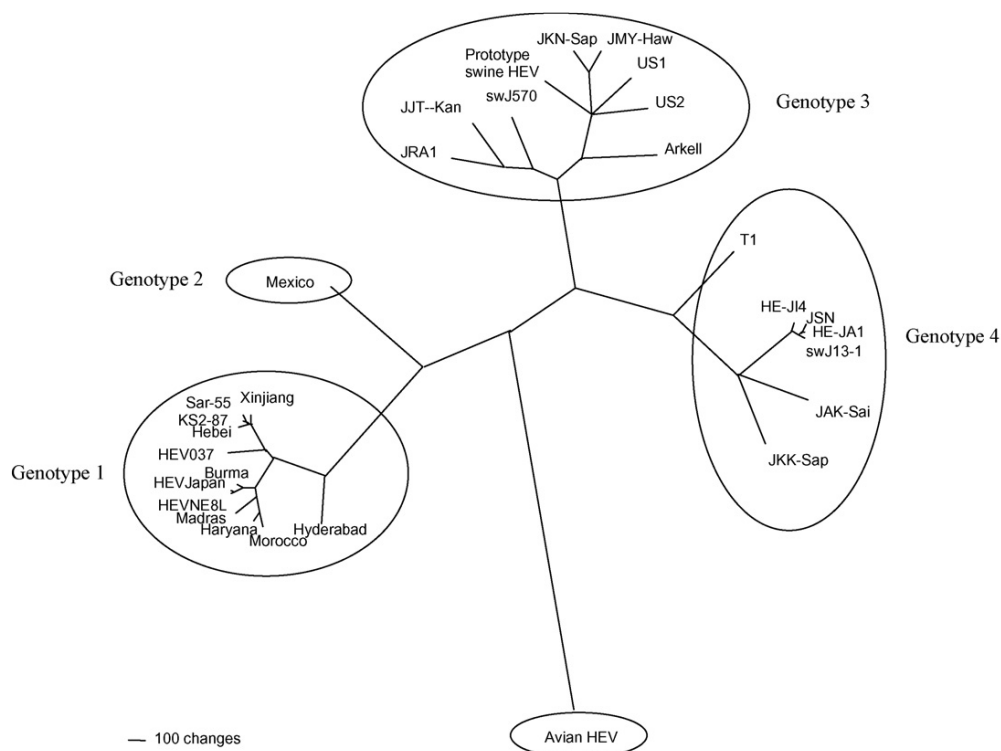
Wstęp

		<i>Paslahepevirus</i>	<i>Paslahepevirus alci</i> (MHEV)	Łoś euroazjatycki	Nieklasyfikowane	Nieprzypisany
			<i>Paslahepevirus balayani</i> (HEV)	Człowiek	HEV – 1	<i>Orthohepevirus A</i>
				Człowiek	HEV – 2	
				Człowiek, świnia, królik, jeleń, mangusta, dzik, małpa, zając	HEV – 3	
				Człowiek, świnia, dzik, małpa	HEV – 4	
				Dzik	HEV – 5	
				Dzik	HEV – 6	
				Wielbłąd	HEV – 7	
				Wielbłąd	HEV – 8	
		<i>Rocahepevirus</i>	<i>Rocahepevirus eothonomi</i> (VHEV)	Wilk	Nieklasyfikowane	Nieprzypisany
			<i>Rocahepevirus ratti</i> (RHEV)	Szczur, ryjówkowate	HEV – C1	<i>Orthohepevirus C</i>
			<i>Rocahepevirus ratti</i> (FrHEV)	Fretka, norki	HEV – C2	
				Lis, dzikie gryzonie	Nieklasyfikowane	
	<i>Parahepevirinae</i>	<i>Piscihepevirus</i>	<i>Piscihepevirus heenan</i> (CTV)	Pstrąg, łosoś		<i>Piscihepevirus A</i>

Przyjmuje się, że pierwszy podejrzewany kliniczny przypadek zapalenia wątroby typu E u człowieka miał miejsce już w 1794 roku w Niemczech [31], ale dopiero w 1991 roku czynnik etiologiczny wywołujący tą chorobę został określony, jako HEV [2]. Do czasu zaobserwowania pierwszych przypadków choroby u świń (1997) zakładano, że jest to choroba przenoszona jedynie między ludźmi. U ludzi do zakażenia dochodzi drogą pokarmową (poprzez kontakt z zanieczyszczoną kałem wodą), najczęściej chorują osoby w wieku 15-30 lat, u których dochodzi do ostrego samoograniczającego się zapalenia wątroby. Oddzielną grupą są kobiety w ciąży u których odnotowano śmiertelność sięgającą 26,9% (najczęściej w trzecim trymestrze ciąży) [31]. U kobiet może dojść do żółtaczki i niewydolności wątroby o przebiegu piorunującym (FHF – fulminant hepatic failure), co historycznie skutkowało wieloma zgonami [86].

Od 2010 roku głównie dzięki nowym metodom diagnostycznym odkryto więcej zarasków podobnych do wirusa zapalenia wątroby typu E u: szczurów, królików, frotek, norek, lisów, nietoperzy, myszy oraz u ryb łososiowatych [31].

Do tej pory, w zależności od źródła, postulowano występowanie czterech albo pięciu genotypów wirusa zapalenia wątroby typu E. Według Huang i wsp. (2004) całą grupę HEV podzielono na pięć genotypów, z czego grupa genotypu 5 obejmuje izolaty wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) [28]. Inni autorzy stwierdzali występowanie tylko czterech głównych genotypów wliczając genotypy człowieka i świni [2]. Genotyp 1 i 2 były ściśle przyporządkowane do wirusów człowieka, zaś 3 i 4 to genotypy wirusów patogennych dla ludzi, ale także dla świń i innych zwierząt [45,46,59]. Meng w 2010 wyodrębnił oddzielnie szczepy pochodzące od kur wirusa zapalenia wątroby typu E, lecz nie przyporządkował ich konkretnie do genotypu 5 [45] (**Ryc. 2**). Stosunkowo łatwa możliwość transmisji międzygatunkowych HEV skłoniła Meng'a (2013) do postulowania o niewyróżnianie genotypów gatunkowo specyficznych, zwłaszcza w odniesieniu do wirusów izolowanych od ptaków, przy klasyfikowaniu tych zarazków [47]. Obecnie w obrębie rodzaju *Paslahepevirus* (wcześniej rodzaj *Orthohepevirus*, gatunek *Orthohepevirus A*) wyróżnia się 8 genotypów, poza pierwszymi czterema, które opisano wcześniej, w kolejnych latach wyizolowano nowe cztery genotypy 5 i 6 od dzików oraz 7 i 8 od wielbłądów [94,97], zaś genotypy wirusów izolowanych od ptaków zostały zgrupowane w odrębnym rodzaju *Avihepevirus* (wcześniej rodzaj *Orthohepevirus*, gatunek *Orthohepevirus B*) [70].



Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne hepewirusów. Źródło: Meng, 2010 [46].

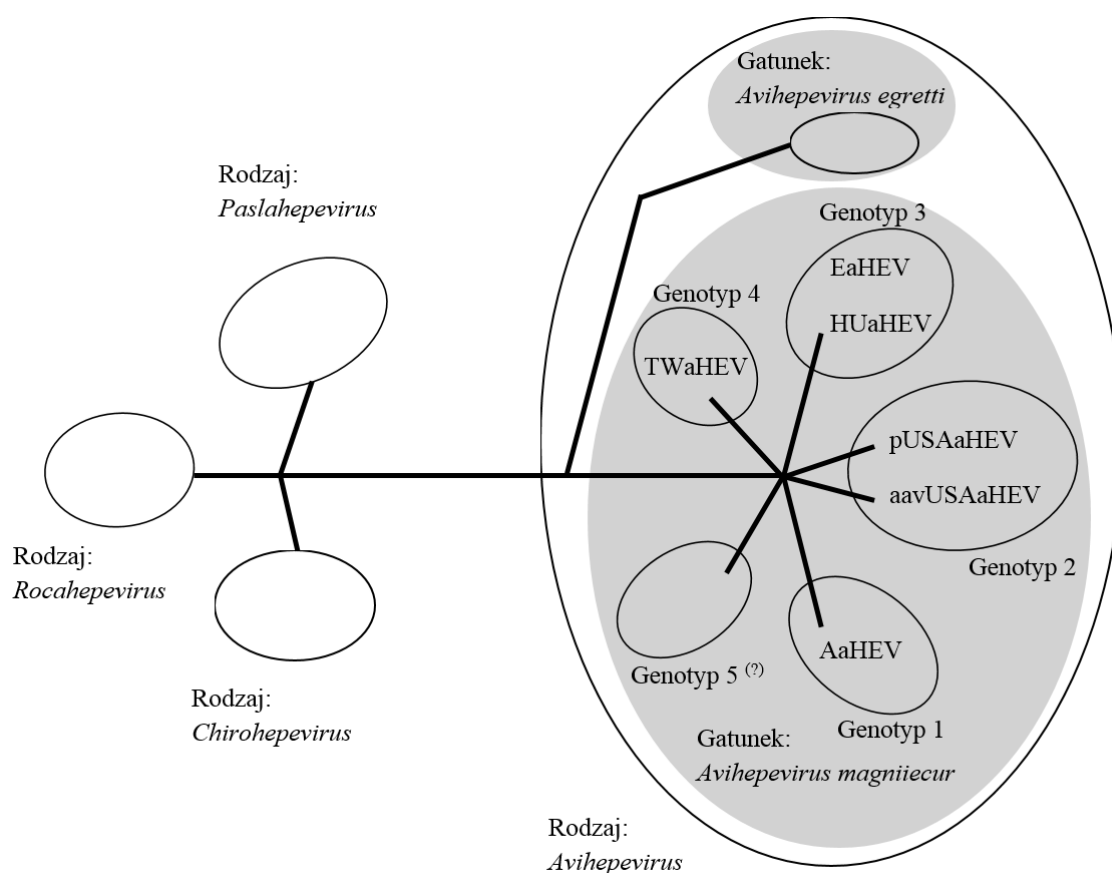
W 2009 roku został przedstawiony podział aHEV (aktualnie w wykazie wybranych gatunków *Hepeviridae* ICTV użyty jest akronim: AHEV [63]) na trzy różne grupy genotypowe: genotyp 1 (australijski – AaHEV); genotyp 2 (USA – USAaHEV) oraz genotyp 3 (europejski – EaHEV lub węgierski – HUaHEV) i genotyp 4 (tajwański – TWaHEV) [53]. Dodatkowo genotyp 2 podzielony jest jeszcze na dwie podgrupy: pUSAaHEV i aavUSAaHEV. Stwierdzono, że genotyp 2 – USAaHEV jest najbardziej zbliżony budową do HEV, a dokładniej do grup wcześniej określanych jako: hHEV (ludzki wirus zapalenia wątroby typu E) i sHEV (świński wirus zapalenia wątroby typu E) [10,73]. Kolejne publikacje wskazywały, że grupa aHEV, może być jednak bardziej rozbudowana – sugerowane jest istnienie genotypu 5.

Aktualnie do genotypu 1 australijskiego zaliczane są także izolaty pochodzące z Południowej Korei [33], do genotypu 2 USA zaliczane są również izolaty pochodzące z Południowej Korei, Hiszpanii [53] oraz z Polski [43,69,96], do genotypu 3 europejskiego (wykryto 1 izolat z Polski [69]) zaliczane są także izolaty pochodzące z Chin, do genotypu 4 zaliczane są izolaty pochodzące z Węgier, Taiwanu, Chin i Polski [4,5,18,26,44,69]. Sugerowany genotyp 5 miałyby utworzyć izolaty z Wielkiej Brytanii [41] (**Ryc. 3**).

Taksonomię aHEV dodatkowo komplikują obserwacje wskazujące na różnice w budowie izolatów pochodzących z Rosji i Kazachstanu, które ze względów geograficznych podejrzewano o przynależność do genotypu 3 – europejskiego. Okazało się, że nie pasują one budową do żadnego z genotypów opisanych w tamtym czasie (genotypy 1-3), jeden (aHEV16211; GenBank: JQ814690) z czterech pozyskanych izolatów był zbliżony budową do części izolatów pochodzących z Chin (China-09-B3, China-09-Z56, China-09-G57; GenBank: GQ398040 – GQ398042) oraz Ameryki (NY449, CA697A; GenBank: AY870828, AY870822, AF531907), zaś pozostałe trzy izolaty (aHEV18196, aHEV16050, aHEV16279; GenBank: JQ814688, JQ814691, JQ814692) stworzyły oddzielną grupę [30,73]. Kolejną oddzielną grupę tworzą dwa izolaty pochodzące z Chin. Jeden pochodzący od kury jedwabistej z północnej części Chin (GenBank: MN562265)[38], drugi zaś od kurcząt z wschodniej części Chin (GenBank: OM037109)[44].

Od 2016 roku na fermach w Chinach zaobserwowano zespół krwotoczny z pęknięciem wątroby (HRHS – hepatic rupture hemorrhage syndrome), który został wywołany przez nowy izolat aHEV (VaHEV-MG976720; GenBank: MG976720)[76], wykazujący dużą odmienność od 11 szczepów reprezentujących genotypy 1-4, co sugerowało, że może należeć do odrębnego genotypu [74,76].

Coraz częściej podaje się w wątpliwość sensowność dzielenia genotypów *Avihepevirus magniiecur* ze względu na położenie geograficzne, chociażby izolaty pochodzące z Korei, Chin oraz Taiwanu badane w 2016 roku przez Moon i wsp. [53] całkowicie się od siebie różnią, mimo bliskości geograficznej. Z drugiej zaś strony niektóre doniesienia podają w wątpliwość stosowność podziału wewnątrz rodzaju *Avihepevirus*, gdyż wyróżnione genotypy nie są aż tak znacznie od siebie oddalone pod względem struktury genomu. Zdaniem Smith i wsp. [70] zasadność podziału zostanie potwierdzona w przypadku dysponowania większą liczbą pełnych genomów aHEV. Aktualnie podział został dokonany na dwa gatunki: *Avihepevirus magniiecur*, który zawiera wszystkie genotypy wyżej opisane oraz *Avihepevirus egretti*, wykryty u czapli nadobnej. Można przypuszczać, że izolat pochodzący od wróbla również będzie przynależał do oddzielnego gatunku [44,62,63,94].



Ryc. 3. Podział izolatów aHEV (rycina własna) na podstawie danych piśmiennictwa [5,10,26,29,41,44,62,63,66].

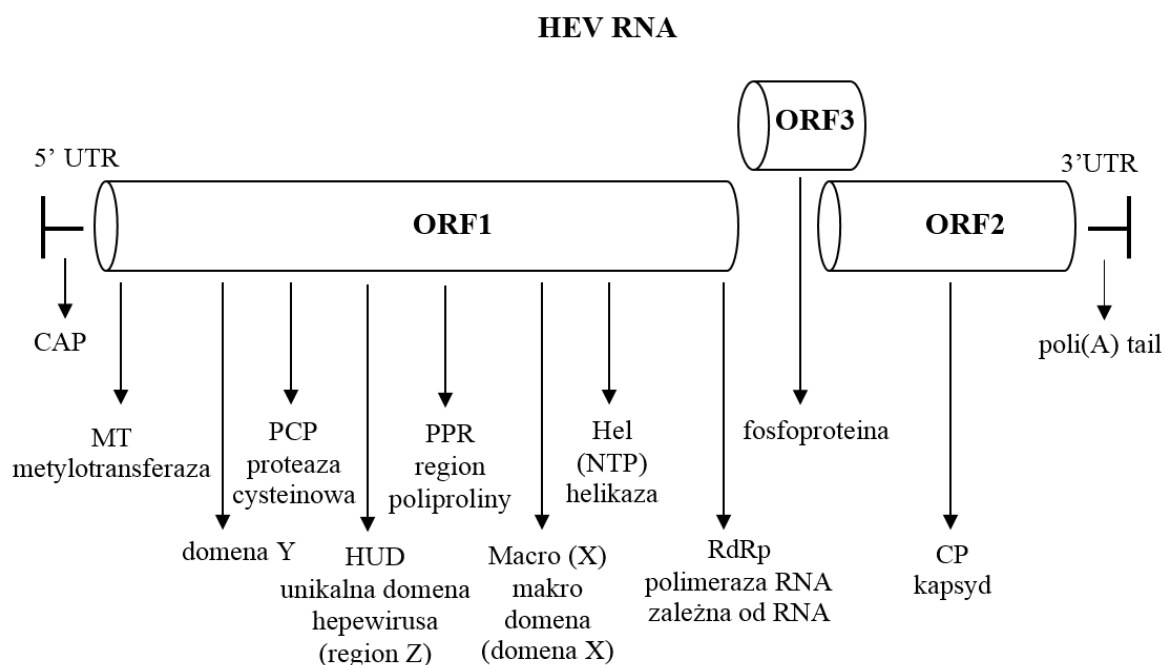
EaHEV – europejski wirus zapalenia wątroby typu E ptaków, HUaHEV – węgierski wirus zapalenia wątroby typu E ptaków, TWaHEV – tajwański wirus zapalenia wątroby typu E ptaków, pUSAaHEV – prototypowy wirus zapalenia wątroby typu E ptaków z USA, aavUSAaHEV – niejadliwy wirus zapalenia wątroby typu E ptaków z USA, AaHEV – australijski wirus zapalenia wątroby typu E ptaków.

W świetle aktualnie dostępnych danych nie ulega wątpliwości, że wirus zapalenia wątroby typu E ptaków i wirus wywołujący chorobę dużej wątroby i śledziony (BLSV) są różnymi szczepami tego samego zarazka [59].

3. Budowa wirusa zapalenia wątroby typu E

Wirus zapalenia wątroby typu E jest jednonicowym RNA wirusem wielkości 27/28 – 34/35 nm [3,31] o dodatniej polarności (+)ssRNA, genom zbudowany jest z 6,4 do 7,3 tysiąca par zasad [10,44,62]. Według danych piśmiennictwa największy genom wirusa zapalenia wątroby typu E został wykryty u świni – 7,3 kpz (GenBank: EF570133), natomiast najmniejszy u nietoperzy – 6,6 kpz (GenBank: KJ562187)[44]. Ptasie szczepy zbudowane są z około 6,6 kpz, zarówno *Avihepevirus egretti* występujący u czapli nadobnej (GenBank: KX589065)[66], jaki i *Avihepevirus magniiecur* występujący u kur.

Genom wirusa zapalenia wątroby typu E zawiera krótki niekodujący koniec 5' (27 – 35 nukleotydów), następnie znajdują się trzy częściowo nakładające się na siebie otwarte ramki odczytu (ORF – Open Reading Frame) – ORF1, ORF3 i ORF2. Niekodujący koniec 3' (65 – 74 nukleotydów) zakończony jest końcem poli(A) o długości 150 – 200 nukleotydów (Ryc. 4) [91].



Ryc. 4. Schemat budowy genomu wirusa zapalenia wątroby typu E – HEV (hepatitis E virus) [32,62,63].

Struktura genomu HEV jest porównywalna zarówno u zwierząt jak i u ludzi. Analiza sekwencji genomu aHEV ujawniła 50 – 60% podobieństwa sekwencji nukleotydów z ludzkimi i świńskimi HEV [14].

Brak otoczki białkowej (podobnie, jak w przypadku wirusa zapalenia wątroby typu A) umożliwia transmisję zakażenia drogą pokarmową.

3.1. Otwarta ramka odczytu 1 (ORF 1)

ORF1 rozpoczyna się na końcu 5' zaraz za krótkim niekodującym regionem składającym się z 27 do 35 nukleotydów. Ten fragment genu zawiera około 4600 nukleotydów [od 4592 w genomie EF206691 [14] – do 4598 w genomie AM943646 [10] oraz GU954430 [110]] i koduje niestrukturalne białko (poliproteinę) o długości około 1693 aminokwasów. Poliproteina ORF1 bierze udział w replikacji cząstek wirusowych i zmianach strukturalnych białek. Od końca N do C występują następujące proteiny: metylotransferaza (MT lub MeT), domena Y o nieznannej roli (podobna do wirusa różyczki oraz wirusa nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka), proteaza cysteinowa podobna do papainy (PCP – znaleziona w alphawirusach i wirusie różyczki), region Z (HUD – unikalna domena dla *Paslahepevirus balayani* – HEV, kiedyś *Orthohepevirus A*), region bogaty w poliprolinę (PPR, nazywany także regionem hyperzmiennym – HVR), makro domena X o nieznannej roli (podobna do wirusa różyczki, wirusa nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka, alphawirusów oraz niektórych koronawirusów), NTP – wiążąca sekwencja związana z aktywnością helikazy (wspomaga rozwijanie RNA wymagane do replikacji i transkrypcji) i polimeraza RNA zależna od RNA (RdRp). Potwierdzono, że *Avihepevirus magniiecur* nie posiada w swojej budowie zarówno proteazy cysteinowej, jak i regionu Z, podobnie, jak inne gatunki w obrębie *Hepeviridae*, poza *Paslahepevirus balayani* [3,32,62,63,91].

3.2. Otwarta ramka odczytu 2 (ORF 2)

Fragment ORF2 według sekwencji dostępnych w GenBank (AY535004, EF206691, AM943646, AM943647 oraz GU954430) składa się z 1820 nukleotydów poprzedzających końcową sekwencję poli(A) – około 65 nukleotydów, łańcucha rybonukleinowego na końcu 3'. Ten gen koduje głównie, jeśli nie jedynie, białko kapsydu. Jest to glikoproteina o wielkości około 71 – 88 kDa (660 aminokwasów, komponenta sacharydowa leży na N końcu) z potencjalnym regionem sygnałowym (z dużą koncentracją argininy i lizyny) dla retikulum endoplazmatycznego. Białko to jest syntetyzowane, jako prekursor, który następnie poprzez sekwencję sygnałową przekształcany jest w białko dojrzałe i ulega

glikozylacji z trzech możliwych stron. Potwierdzono, że obecność dodatkowych sacharydów jest częstsza w białkach powierzchniowych kapsydu wirusów otoczkowych niż u wirusów bezotoczkowych [91]. Wiedza na temat immunogenności białek ORF2 jest bardzo istotna ze względu na produkcję szczepionek, ponieważ pierwszą szczepionkę dla ludzi opracowano wykorzystując przeciwciała neutralizujące HEV skierowane przeciwko białkom kapsydu [32,62,63,98].

3.3. Otwarta ramka odczytu 3 (ORF 3)

Ostatnia i najmniejsza otwarta ramka odczytu, ORF3 jest tworzona przez 263 nukleotydy (GenBank: AY535004, EF2091, AM943646, AM943647 oraz GU954430), znajduje się za ORF1 i pokrywa się 210 nukleotydami (GenBank: AY535004, EF206691, AM943646, AM943647 oraz GU954430) z ORF2. Dokładnie nie wiadomo czy białko kodowane przez ORF3 jest częścią wirionu, czy jest białkiem niestrukturalnym. Białko to nie ulega glikozylacji, tylko fosforylacji [91]. Aktywacja kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (Erk – extracellular signal-regulated kinase) sprzyja przeżywalności oraz proliferacji zainfekowanych komórek, poza tym ORF3 tłumi także niespecyficzną odpowiedź gospodarza poprzez osłabienie odpowiedzi ostrej fazy oraz wzrost sekrecji immunosupresyjnych czynników takich, jak alfa-1-mikroglobulina [3,32,62,63,100].

Wielkość poszczególnych otwartych ramek odczytu (ORF) oraz ich położenie nieco różnią się w zależności od gatunku gospodarza od którego izolat pochodzi. **Rycina 4** przedstawia ogólny schemat genomu podrodziny *Orthohepewirinae* z uwzględnieniem znanych wielkości dla rodzaju *Avihepewirus*. Jest interesujące, że w genomie wirusów wyisobnionych od niektórych gatunków ssaków występuje dodatkowa ramka odczytu ORF4. Aktualnie można potwierdzić jej istnienie u patogenów pochodzących od szczurów i fretek, a izolaty te należą do rodzaju *Rocahepewirus* [31,63]. Wykryto również dodatkową (domniemaną) ramkę odczytu w genotypie 1 HEV występującym u ludzi [94].

4. Epidemiologia zakażeń aHEV

W stadzie do naturalnego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków dochodzi drogą *per os* przez spożycie zanieczyszczonej odchodami paszy lub ściółki. Drogą eksperymentalną udało się wywołać zakażenie u drobiu drogą dożylną oraz dziobowo-nosową [11]. Najczęściej do zakażenia dochodzi drogą poziomą, chociaż w piśmiennictwie można znaleźć prace wskazujące także na drogą pionową. Jak do tej pory stwierdzono występowanie wirusa w białku jaj od kur eksperymentalnie zakażonych lecz zwykle

u piskląt pochodzących od takich kur nie stwierdzono występowania wirusa [22]. Udało się jednak uzyskać wyniki pozytywne (RT-PCR) u kurcząt, pochodzących od młodych niosek stada rodzicielskiego (w wieku około 25 tygodni), które nie wytworzyły jeszcze przeciwciał, co może wskazywać, że o ile droga pionowa nie jest standardowa, to jednakże przy zachowaniu odpowiednich warunków może dojść do takiej transmisji [90].

Stwierdzono także, że może dochodzić do transmisji międzygatunkowej wirusa aHEV. Udowodniono, że szczepy genotypu HEV – 3 i HEV – 4 pochodzące od świń mogą zakażać ludzi, a także szczepy genotypu HEV – 3 i HEV – 4 izolowane od ludzi mogą zakażać świnię. W przypadku aHEV, do tej pory nie stwierdzono ryzyka transmisji wirusa z drobiu na człowieka, ale istnieją już zakażenia międzygatunkowe, gdyż od kur mogą zakażać się indyki [81,94]. Rozszerzony zasięg gospodarzy HEV i jego zdolność do infekcji międzygatunkowych (**Tab. 2**) wzmacnia niepokój, jeśli chodzi o ryzyko zoonotycznych infekcji. Kolejnym niepokojącym aspektem jest stały brak dostępnych szczepionek przeciwko aHEV, choć wielkim postępem jest pierwsza szczepionka dla ludzi przeciwko HEV (genotypowi HEV – 4), zarejestrowana w Chinach od 2011 roku [45,46,48,98].

Tab. 2. Zasięg gospodarzy i infekcje międzygatunkowe wirusem zapalenia wątroby typu E (HEV) w warunkach naturalnych i eksperymentalnych na podstawie piśmiennictwa [31,34,39,46,68].

Genotypy HEV	Naturalny gospodarz	Skuteczna transmisja infekcji u gospodarza eksperymentalnego	Niepewne wyniki	Brak powodzenia infekcji
HEV – 1	Ludzie, konie	Małpy, szczury*, owce	Szczury*	Świnie
HEV – 2	Ludzie	Małpy	-	Świnie, szczury
HEV – 3	Ludzie, świnię, króliki, jelenie, mangusty	Małpy, świnię, króliki	Szczury	-
HEV – 4	Ludzie, świnię	Małpy, świnię, myszokoczki, myszy	Króliki, szczury	-
HEV – 7	Wielbłądy	Ludzie	-	-
HEV – C1	Szczury	-	-	Małpy, świnię
aHEV	Kury	Indyki, kury, kaczki, gęsi, króliki	-	Małpy, świnię

*Szczury – wg Meng’a (2010) [46] powodzenie infekcji u gospodarza eksperymentalnego, zaś wg zespołu badawczego John’e’a (2014) [31] wyniki były niepewne.

Ponadto w Chinach wykryto przeciwciała przeciwko aHEV u ptaków z rzędu wróblowych (*Passeriformes*) takich jak: czyżyk zwyczajny (*Carduelis spinus*), skowronek orientalny (*Alauda gulgula*), grubodziób chiński (*Coccothraustes migratorius*) oraz u papugowych (*Psittaciformes*): papużek falistych (*Melopsittacus undulatus*), nierozłączek

(*Agapornis* sp.), aleksandrett większych (*Psittacula eupatria*) oraz nimf (*Nymphicus hollandicus*) [16,106]. W 2017 roku w północnych Chinach wykryto również specyficzne przeciwciała przeciwko aHEV w populacji wspólnie utrzymywanych kur, kaczek, gęsi i królików. Następnie w próbkach pobranych od tych zwierząt wykonano badania molekularne mające na celu wykrycie ORF1 i ORF2, które potwierdziło zakażenie *Avihepevirus magniiecur* [39].

Wykryto także izolaty wirusa HEV (występującego u ssaków) u koronnika szarego (żuraw koroniasty) (*Balearica regulorum*) oraz kiśca srebrzystego (bażanta srebrzystego) (*Lophura nycthemera*) w ośrodku rehabilitacyjnym dzikich zwierząt we wschodnich Chinach, co może sugerować, że także inne gatunki ptaków, nawet dziko żyjące mogą być zagrożone i mogą stać się potencjalnym rezerwuarem wirusa [103].

5. Patogeneza aHEV

Replikacja wirusa zapalenia wątroby typu E u drobiu rozpoczyna się w przewodzie pokarmowym i rozprzestrzenia się do wątroby. Podstawowymi komórkami docelowymi dla HEV są hepatocyty. Pozytywna nić RNA wirusa w cytoplazmie komórek wątrobowych ulega translacji w niestrukturalne białko wymagane do replikacji zarazka [11,91].

Mechanizm patogenyzy zakażenia aHEV u drobiu jest słabo poznany. W piśmiennictwie przyjmuje się, że pierwszym miejscem w którym wirus ulega replikacji po zakażeniu *per os* jest przewód pokarmowy (wykrywany od 5 dpi), skąd następnie drogą krwi (wiremia) dociera do narządu docelowego – wątroby (wykrywany od 16 dpi). Ponadto wtórnym miejscem replikacji wirusa są migdałki jelit ślepych (wykrywany od 35 dpi) [13,52]. Po replikacji wirusa w wątrobie następuje jego uwolnienie z hepatocytów do pęcherzyka żółciowego, a następnie do kału [51,52]. Billam i wsp. [13] wykazali, że replikacja aHEV zachodzi zarówno w wątrobie jak i tkankach pozawątrobowych. Obecność wirusa wykryto bowiem w: wątrobie, dwunastnicy, jelicie czczym, biodrowym, ślepym oraz prostnicy (opisanej w pracy jako „colorectum”), w migdałkach jelit ślepych, grasicy, śledzionie, a także w płucach, sercu, nerkach i trzustce.

Szczepki aHEV nie replikują się w hodowlach komórkowych. Ogólnie brak jest aktualnie efektywnej hodowli komórkowej dla HEV izolowanych od zwierząt. Ze względu na trudności w namnażaniu wirusa w hodowlach do tej pory nie opracowano komercyjnie dostępnych szczepionek przeciwko zakażeniom aHEV [91,99,100].

6. Diagnostyka molekularna zakażeń aHEV

Do wykrywania materiału genetycznego wirusa stosuje się techniki biologii molekularnej, np. RT-PCR. RNA aHEV było wykrywane w próbkach żółci i fragmentach wątroby, co potwierdzało, iż wirus namnaża się w tym narządzie [11].

RT-PCR jest najlepszą metodą rozpoznawania zakażeń szczepem aHEV, ale nie wiadomo, jak bardzo specyficzny jest to test w wykrywaniu zakażeń kur w różnych strefach geograficznych [27,80]. Chociaż Marek i wsp. w swojej pracy przedstawili parę starterów, która pozwoliła na amplifikację aHEV zarówno w przypadkach zakażeń pochodzących z Europy jak i z Australii [41].

W publikacjach dostępna jest duża różnorodność sekwencji nukleotydowych starterów wykorzystywanych do diagnostyki molekularnej zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków, co wynika z dużej różnorodności genotypów, jak i zmienności tego wirusa. Do wykrycia infekcji aHEV obok klasycznej metody RT-PCR, stosuje się nested RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR. W **Tab. 3** zestawiono startery wykorzystywane w diagnostyce aHEV ułożone w porządku chronologicznym. Startery numer 1, 2, 3 i 8 wykorzystywane są w diagnostyce molekularnej za pomocą metody RT-PCR, startery 4,5,6 i 7 za pomocą nested RT-PCR zaś 9 i 10 za pomocą Real-Time RT-PCR, z tym, że startery zaprojektowane przez Troxler i wsp. [88] wykorzystują sondę molekularną, zaś startery zespołu Zhao (2015) [109] wykorzystują barwnik SYBR Green. Startery te można także zróżnicować ze względu na to jaki fragment genomu wykrywają: startery numer 2, 3 i 4 wykrywają helikazę, która znajduje się w obrębie ORF1, startery numer 6 i 7 wykrywają inny fragment genomu, także w obrębie ORF1, startery numer 5 i 8 wykrywają geny kapsydu, czyli ORF2, zaś 9 i 10 wykrywają ORF3. Od wielu lat były projektowane startery w oparciu o różne genotypy, które występowały na danym obszarze. Startery, które pozwalały na wykrycie szczepów z Australii to para numer 1, zaś startery 8 i 9 były opracowane do wykrycia wirusów pochodzących zarówno z Australii, jak i Europy. W Stanach Zjednoczonych stosowano startery numer: 2,3,4,5,6 i 7, natomiast startery 10 znalazły zastosowanie do diagnostyki zakażeń szczepami chińskimi.

Tab. 3. Zestawienie wybranych sekwencji starterów stosowanych w celu wykrycia materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków.

Nr	Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' – 3')	Źródło
1.	BHE-fwd	GCG GCG ATG TGG TTA TGC TA	Payne i wsp., 1999 [57]
	BHE-rev	CGG CGA GCT GCA TCT CAA TA	
2.	B1	GCT AGG CGA CCC GCA CCA GAT	

Wstęp

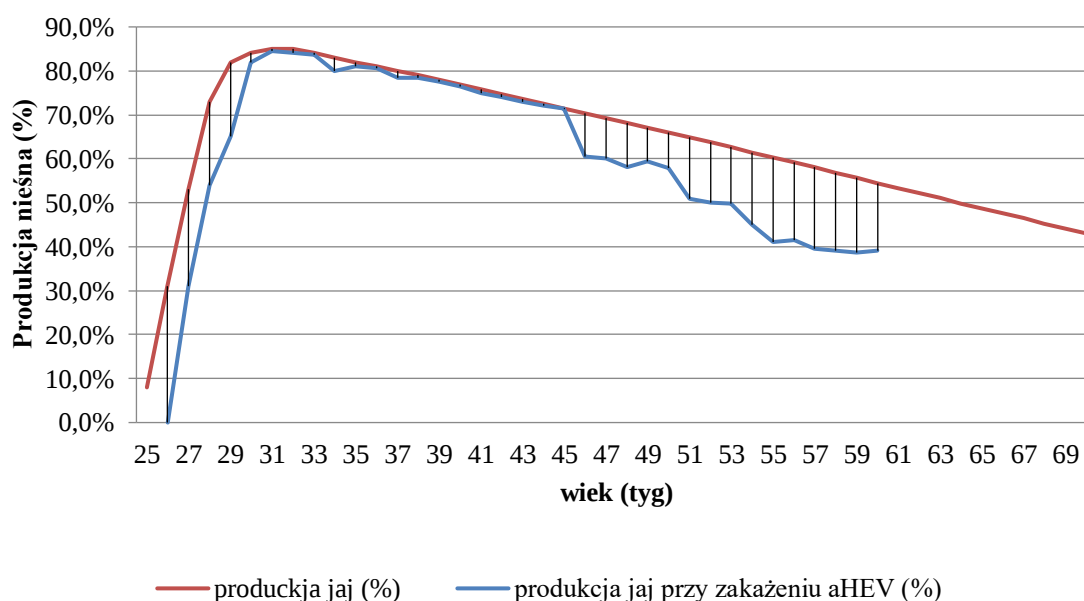
	B2	GGT TAG CGC AAC AAT AGC ATG	Huang i wsp., 2002 [27]
3.	Helicase F	TGG CGC ACC(T) GTT(A) TCC(T) CAC CG	Huang i wsp., 2002 [27]
	Helicase R	CCT CA(G)T GGA CCG TA(T)A TCG ACC C	
4.	AHEV F-1/SD	TGT TAT T(C)AC ACC CAC CAA G(A)AC GT(C)T G	Sun i wsp., 2004 [80]
	Helic R	CCT CA(G)T GGA CCG TA(T)A TCG ACC C	
	AHEV F-2/SD	GCC ACG GCT G(A)TT ACA CCC(T) CAC(T) GT	
	Helic R-2	GAC CCA(G) GGA(G) TTC GAC TGC TT	
5.	AHEV ORF2/F-1/SD	TCG CCT(C) GGT AAT(C) ACA(T) AAT GC	Sun i wsp., 2004 [80]
	AHEV ORF2/R-1/SD	GCG TTC(G) CCG(C) ACA GGT(C) CGG CC	
	AHEV ORF2/F-2/SD	ACA(T) AAT GCT(C) AGG GTC ACC CG	
	AHEV ORF2/R-2/SD	ATG TAC TGA(G) CCA(G) CTG(C) GCC GC	
6.	N1	TTA CCA TTG ACT TTG AAC GGC G	Billam i wsp., 2005 [11]
	N2	CCG GGC TGA TGG TCT CGA TTA G	
	N3	GCT TGT GCA TTG ACG ATT TCC C	
	N4	CAA TAG GTT ACC CAC GAT GAC G	
7.	P1	ACA ACA TCC ACC CCT ACA AG	Billam i wsp., 2005 [11]
	P2	ACA GTT TCA CCT CAG GCT CG	
	P3	AGA ACA ATG GTT GGC GGT CC	
	P4	GAG GGC AAG CCA CCT AAA AC	
8.	Forw1_C-BLSV	GGT ATG GTT GAT TTT GCC ATA AAG	Bilic i wsp., 2009 [10]
	Rev1_C-BLSV	GCT GCN CGN ARC AGT GTC GA	
9.	BLSV-HEVf	AAT GTG CTG CGG GGT GTC AA	Troxler i wsp., 2011 [88]
	BLSV-HEVr	CAT CTG GTA CCG TGC GAG TA	
	Probe ORF3-HEV	FAM-CTC CCA AAC GCT CCC AGC CGG A-BHQ1	
	Probe HEV-3	FAM-CTC CCA AAC GCY CYC AGC CGG A-BHQ1	
10.	F1	CGT GAC AAC TCA GCC CAG TG	Zhao i wsp., 2015 [109]
	R1	GCG GTG ACA ACG TCG GTA	
	F2	ATG TAT CTT AGT TGC CAG TTC TGG	
	R2	CTA CAT CTG GTA CCG TG	

7. Objawy kliniczne w przebiegu zapalenia wątroby typu E u kur

Choroba w postaci klinicznej pojawia się u kur powyżej 24 tygodnia życia, chociaż wrażliwe są ptaki w każdym wieku [20]. Okres inkubacji, od zakażenia do siewstwa wirusa z kałem wynosi od 1 do 3 tygodni po zakażeniu *per os* [11]. Zachorowalność i upadki spowodowane przez aHEV są relatywnie niskie, lecz zakażenia subkliniczne są dość powszechne w terenie [52]. Objawy zależą także od wieku, intensywności zakażenia oraz prawdopodobnie od genotypu wirusa [18].

U ptaków z HSS często nie obserwuje się żadnych specyficznych objawów poprzedzających upadki. W niektórych ogniskach choroby można odnotować spadek produkcji nieśnej do 20% [67,95]. Zespół HSS charakteryzuje się zwiększoną śmiertelnością w okresie od 30 do 72 tygodnia życia, ze szczytem upadków w okresie między 40 a 50 tygodniem życia. W połowie okresu nieśności upadki wzrastają o 0,3%, czasem o 1,0% tygodniowo [52,95].

W przebiegu BLS zdarza się także spadek nieśności do 20% w stadach rodzicielskich broilerów kurzych (przykład z własnego opisu przypadku w Polsce – **Ryc. 5**), a w niektórych stadach niosek jaj konsumpcyjnych nawet do 45% [18], spowodowanym regresją jajnika oraz wzrost śmiertelności do 1% tygodniowo przez okres 3 – 4 tygodni. Ponadto można zaobserwować błądź grzebienia, dzwonków, depresję, anoreksję i zabrudzoną okolicę kloaki [20,23,95]. Jaja są małe z cienką i słabo pigmentowaną skorupą, chociaż ich budowa wewnętrzna i wylęgowość pozostają w normie [52,96,100].



Ryc. 5. Ukształtowanie się nieśności w stadach zdrowych oraz zakażonych wirusem aHEV
źródło: Nerc i wsp. 2013 [55].

U drobiu z HRHS obserwuje się błądź grzebienia i dzwonków, pobrudzoną okolicę kloaki z ubytkami piór oraz wzrost śmiertelności (skumulowana śmiertelność 15%), a także opóźnienie i spadek produkcji nieśnej o 20%. Odnotowano również zmniejszoną wylęgowość jaj (nawet o 18%) pochodzących z zakażonych stad [74,76].

8. Zmiany anatomopatologiczne w przebiegu zapalenia wątroby typu E u kur

Podczas sekcji ptaków najczęściej stwierdza się powiększenie wątroby i śledziony (nawet u 20% ptaków), poza tym zanik jajnika i krwisty płyn w jamie ciała. Padają ptaki w dobrej kondycji, widoczna jest błądź grzebienia i dzwonków [31,52,95]. Wątroba zwykle jest znacznie powiększona (hepatomegalia), często krucha, marmurkowata z drobnymi czerwonymi, żółtymi lub brązowymi pasmami. Mogą być także widoczne

Wstęp

wybroczyny. Może dochodzić do pęknięcia wątroby, wówczas widoczne są skrzepy krwi pod jej torebką [11,18,52,74,95,96]. Obecność skrzepów krwi w żołądku, jak i wybroczyn w wątrobie może świadczyć o krwotocznym stłuszczeniu wątroby (HFLS – Hemorrhagic Fatty Liver Syndrome), co się stwierdza najczęściej u kur typu nieśnego. W przypadku HSS nie zawsze stwierdza się zwyrodnienie tłuszczowe wątroby [52]. Śledziona u zakażonych ptaków może być powiększona (splenomegalia), czasami z białymi ogniskami martwicy [52,95]. Zazwyczaj dochodzi także do zaniku jajnika, co skutkuje spadkiem produkcji nieśnej, lecz nie jest to zmiana zawsze występująca [31,52,95]. Czasami podczas sekcji można stwierdzić błądność mięśni piersiowych [18].

Tab. 4. Zestawienie najczęstszych objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych w różnych zespołach chorobowych wywoływanych przez aHEV [23,27,49,74,75,78,85,95].

Nazwa zespołu chorobowego	Objawy kliniczne	Zmiany anatomopatologiczne
BLS (big liver and spleen disease) Choroba dużej wątroby i śledziony	• błądność grzebienia, • anoreksja, • senność, • „pastowate” odchody, które powodują zabrudzenie piór wokół kloaki, • zwiększona śmiertelność (tygodniowe upadki wynoszą od 0,1 do 1%), • nagły i duży spadek produkcji nieśnej trwający przez 3-4 tygodnie z późniejszym powrotem do normy. Nieśność spada o 5-20%, • objawy pojawiają się wcześniej (już w 24 tygodniu życia) lub późno (powyżej 58 tygodnia życia)	• powiększenie wątroby i śledziony, • wątroba plamista, • w wątrobie i śledzionie dochodzi do wylewów krwi oraz martwicy, • nacieki zapalne w przestrzeniach okołozylnych w wątrobie, • zanik jajnika, • zapalenie otrzewnej z obecnością kul żółtkowych w jamie ciała, • wybroczyny w błonie śluzowej dwunastnicy, • obrzęk nerek, • rzadko występujący obrzęk płuc
HSS (hepatitis – splenomegaly syndrome) Zespół martwicowo-krwotocznego zapalenia wątroby i powiększenia śledziony	• zaczerwienienie brzucha, • w stadach rodzicielskich brojlerów kurzych w wieku od 30 do 72 tygodnia życia obserwuje się zwiększony współczynnik śmiertelności o 1% (przy czym upadki trwają kilka tygodni, najczęściej w środkowym okresie produkcji), • częściej występuje u kur między 40 a 50 tygodniem życia	• zanik jajnika, • krwisty płyn w jamie ciała, • powiększenie wątroby i śledziony, • zwyrodnienie amyloidowe lub tłuszczowe wątroby oraz podtorebkowe wylewy krwi

HRHS (hepatic rupture hemorrhage syndrome) Zespół krwotoczny z pęknięciem wątroby	• osowiałość, • bladość grzebienia, • zwiększona śmiertelność ok. 15% w całym cyklu produkcyjnym z pikami upadków w pierwszych 5 tygodniach oraz między 17-20 i 27-40 tygodniem, • zmniejszona produkcja nieśna o 20% wraz z opóźnionym szczytem nieśności	• krwisty płyn w jamie ciała, • krew w jamie ciała, • wybroczyny w wątrobie, • powiększenie śledziony
---	---	--

9. Zmiany histopatologiczne w przebiegu zapalenia wątroby typu E u kur

W badaniu histopatologicznym można zaobserwować złogi amyloidu w wątrobie, zapalenie naczyń oraz martwicę, poza tym krwotoczne zapalenie wątroby [18,31]. Badanie to jest bardzo istotne w diagnostyce różnicowej gdyż może wykluczyć zespół krwotocznego stłuszczenia wątroby (FLHS – fatty liver haemorrhagic syndrome), przy którym w obrazie mikroskopowym nie stwierdza się masywnej martwicy hepatocytów, ale występuje zwyrodnienie tłuszczowe tych komórek [18]. Badanie histopatologiczne jest także pomocne w diagnostyce różnicowej aHEV z białaczką ptaków (AL – avian leucosis) ze względu na widoczne na sekcji powiększenie wątroby i śledziony [52].

Do tej pory nie odnotowano mikroskopowych zmian swoistych, jak na przykład ciałek wtrętowych przy zakażeniu wirusem aHEV. Według Billam i wsp. najbardziej charakterystyczną zmianą histopatologiczną w wątrobie jest limfocytarne zapalenie odgałęzień żyły wrotnej w przestrzeni wrotno-żółciowej (lymphocytic portal phlebitis) oraz limfocytarne zapalenie okołożylne (lymphocytic periphlebitis) [12].

10. Diagnostyka serologiczna zapalenia wątroby typu E u kur

W celu stwierdzenia obecności przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu E stosuje się test immunodyfuzji w żelu agarozowym (AGID – Agar Gel Immunodiffusion Assay). Powszechniej stosowaną i bardziej czułą metodą jest ELISA [20,87].

Zakażenie młodych lub niedojrzałych płciowo kur nie prowadzi do czynnego wytworzenia wykrywalnych przeciwciał w surowicy, gdyż powstają one dopiero po osiągnięciu przez ptaki dojrzałości płciowej [20]. U młodych ptaków można wykryć przeciwciała matczyne, ponieważ te powinny utrzymywać się do około 3 tygodnia życia [27].

Do naturalnego zakażenia stada kur wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków może dochodzić w wieku około 12 tygodni [80], dlatego też wiremia i siewstwo wirusa stwierdza się najczęściej u ptaków starszych niż 20 tygodniowe [41,59]. Zastosowanie tylko diagnostyki serologicznej nie jest wiarygodne w wykrywaniu ostrych zakażeń aHEV, gdyż wiremia i siewstwo wirusa z kałem następuje znacznie wcześniej niż pojawienie się IgY. To właśnie tłumaczy dlaczego seronegatywne ptaki mogą być jednak zakażone. Pojawienie się przeciwciał IgY ma miejsce od 1 do 4 tygodni po zakażeniu [52].

Według Billam i wsp. (2005) wiremia ma miejsce 3 – 10 dni po zakażeniu dożylnym, zaś do siewstwa dochodzi 1 – 20 dni po zakażeniu. Natomiast w przypadku zakażenia drogą *per os* i donosową wirus stwierdzany jest w surowicy najwcześniej 20 dnia p.i., a w kale od 10 dnia po zakażeniu [11].

Trzeba także pamiętać, że za pomocą badań serologicznych (ELISA i Western Blot) nie można różnicować HEV pochodzących od ptaków, ludzi i świń, gdyż dochodzi do reakcji krzyżowych pomiędzy białkami ich kapsydów kodowanymi przez ORF2 [21,24].

W Chinach w 2022 przeprowadzono badania z wykorzystaniem kompetencyjnego testu ELISA, w którym zastosowano przeciwciała przeciwko białku Ca268 znakowane nanocząsteczkami peroksydazy chrzanowej. Wykazano, że taki test jest szybszy i bardziej specyficzny niż tradycyjne pośrednie testy ELISA oraz Western Blot [15].

11. Leczenie zapalenia wątroby typu E u kur

Obecnie nie ma opracowanego skutecznego leczenia BLS w stadach kur [52]. W Chinach w 2023 roku udowodniono, że podanie interferonu (IFN) znacząco obniża replikację wirusa u zakażonych eksperymentalnie zarodków kurzych. Co więcej, wykorzystując lokalnie krążący szczep wirusa wyprodukowano surowicę zawierającą przeciwciała skierowane przeciwko ORF2 i ORF3. Podanie surowicy anty-ORF3 zahamowało siewstwo wirusa z kałem, natomiast surowica anty-ORF2 zahamowała replikację wirusa w śledzionie i wątrobie [100].

12. Profilaktyka zapalenia wątroby typu E u kur

W zapobieganiu BLS zaleca się przestrzeganie zasad bioasekuracji i zapobieganie immunosupresji. Potwierdzono, że wirus może szerzyć się drogą pionową, przez co długo utrzymuje się w kurnikach [20,96]. Stosowanie odkażania wody pitnej teoretycznie może zmniejszyć poziom transmisji [1].

Wstęp

Jak wspomniano wcześniej, ze względu na trudności w namnażaniu wirusa, dotychczas nie opracowano szczepionek przeciwko BLS [20]. Szczepy ptasie HEV nie replikują się bowiem w hodowlach komórkowych [52].

W ostatnich latach w Chinach coraz częściej podejmowane są próby zaprojektowania szczepionki. Yan i wsp. w 2022 opracowali podjednostkową szczepionkę w oparciu o białko ORF3 wirusa i wykazali, że skutecznie redukuje siewstwo zarazka z kałem [99].

II. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Mimo upływu kilkudziesięciu lat od odkrycia czynnika etiologicznego BLS, choroba nadal powszechnie występuje i stanowi przyczynę znaczących strat ekonomicznych w stadach kur na świecie. Zwalczanie choroby jest trudne ze względu na brak szczepień oraz możliwości terapii. Pojawienie się pierwszych ognisk BLS w stadach kur w Polsce spowodowało, że pojawiła się potrzeba dokładniejszego rozpoznania problemu, przede wszystkim opracowania schematów diagnostycznych i oceny zagrożeń epidemiologicznych. W czasie rozpoczynania prezentowanych badań nie było żadnych danych na temat zakażeń aHEV w naszym kraju i mimo, że w kilku ośrodkach, zwłaszcza w Zespole Chorób Ptaków UP we Wrocławiu kilka lat później, podjęto bardzo wartościowe molekularne przeglądy epidemiologiczne, wciąż brakuje szczegółowych i szerokich badań na temat tej choroby.

W związku z tym podjęto niniejsze badania, których celem było:

1. Ocena seroprewalencji zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w wybranych krajowych stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnej, nieśnej, niosek jaj konsumpcyjnych (w latach 2010 – 2018) i jednodniowych brojlerów kurzych (w latach 2010, 2014 oraz 2019) oraz analiza zależności między seroprewalencją a efektywnością produkcji (EWW) w badanych stadach brojlerów kurzych z uwzględnieniem podziału na regiony w Polsce.
2. Epidemiologia molekularna zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w wybranych stadach rodzicielskich kurcząt rzeźnych oraz stadach niosek towarowych w Polsce w latach 2011 – 2019.
3. Porównawcza ocena przydatności różnych rodzajów próbek oraz różnych technik w diagnostyce molekularnej BLS.
4. Charakterystyka zmienności genetycznej krajowych izolatów wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) uzyskanych w latach 2011 – 2019.

III. MATERIAŁ I METODY

1. Materiał

1.1. Materiał do badań serologicznych

W latach 2010 – 2019 przeprowadzono badania serologiczne (testem ELISA wykrywającym przeciwciała skierowane przeciwko aHEV) w celu oceny częstości występowania zakaźnego zapalenia wątroby typu E ptaków w wybranych stadach kur w Polsce. Materiał do badań pobierano zgodnie z zasadami monitoringu serologicznego chorób wirusowych [82]. Standardowo pobierano próbki krwi od 23 losowo wybranych ptaków z każdego ze stad. Krew pobierano w objętości około 1 ml do probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Od ptaków jednodniowych krew pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej (*vena jugularis externa*), zaś od ptaków starszych z żyły łokciowej powierzchownej (*vena ulnaris superficialis*). Po dostarczeniu do laboratorium, próbki krwi wirowano przy 450×g (1700 obr./min.) przez 15 minut przy użyciu wirówki MPW-65R (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska) celem uzyskania surowicy, którą przechowywano w temperaturze –20°C do czasu wykonania analiz.

1.1.1. Materiał do badań serologicznych ze stad rodzicielskich kur linii mięsnej, nieśnej oraz stad niosek towarowych w Polsce z lat 2010 – 2018

W latach 2010 – 2018 przeprowadzono badania serologiczne mające na celu ocenę częstości występowania zapalenia wątroby typu E ptaków z wybranych stad rodzicielskich kurcząt brojlerów (BB), ale także stad rodzicielskich kur niosek (LB) oraz stad niosek towarowych (CL).

Do badań pobrano próbki krwi od łącznie 230 stad kur w różnym wieku, w tym od 222 stad BB (96,52%), 2 stad LB (0,87%) oraz 6 stad CL (2,61%), co dało w sumie 5 272 surowic z różnych obszarów Polski. Szczegółowy wykaz przebadanych stad przedstawiono w **Tab. 5**.

Tab. 5. Zestawienie zbiorcze z liczby stad BB, LB i CL, wieku ptaków oraz liczby zbadanych surowic metodą ELISA w latach 2010 – 2018.

Lp.	Rok	Typ produkcyjny	Wiek ptaków (tyg.)	Liczba stad n (%)	Liczba surowic n (%)
1	2010	BB	48 – 95	15 (6,52%)	344 (6,53%)
		LB	50 – 76	2 (0,87%)	46 (0,87%)

Materiał i metody

		CL	60 – 66	3 (1,30%)	68 (1,29%)
2	2011	BB	22 – 99	33 (14,35%)	778 (14,76%)
3	2012	BB	23 – 54	20 (8,70%)	458 (8,69%)
4	2013	BB	25 – 59	20 (8,70%)	460 (8,73%)
5	2014	BB	22 – 50	18 (7,83%)	413 (7,83%)
6	2015	BB	28 – 76	15 (6,52%)	346 (6,56%)
		CL	35 – 37	2 (0,87%)	46 (0,87%)
7	2016	BB	23 – 77	29 (12,61%)	636 (12,06%)
8	2017	BB	22 – 61	38 (16,52%)	874 (16,58%)
		CL	41	1 (0,43%)	23 (0,44%)
9	2018	BB	10 – 56	34 (14,78%)	780 (14,80%)
Suma:		BB	10 – 99	222 (96,52%)	5 089 (96,53%)
		LB	50 – 76	2 (0,87%)	46 (0,87%)
		CL	35 – 66	6 (2,61%)	137 (2,60%)
		BB, LB, CL	10 – 99	230	5 272

1.1.2. Materiał do oceny specyficznej serokonwersji w ognisku BLS

W roku 2011 w zdiagnozowanym (na podstawie obrazu klinicznego i historii fermy) ognisku BLS w dwóch kurnikach (K1 i K2) na jednej fermie pobierano próbki krwi od ptaków pięciokrotnie w odstępach od 5 do 7 tygodni, tj. w terminach: 29, 36, 41, 47 i 54 tydzień życia. Badanie miało na celu ocenę dynamiki specyficznej odpowiedzi serologicznej.

1.1.3. Materiał do monitoringowych badań serologicznych stad kurcząt rzeźnych w Polsce w latach 2010, 2014 oraz 2019

W latach 2010, 2014 oraz 2019 prowadzono seroepidemiologiczne badania mające na celu ocenę częstości występowania przeciwciał matczynych przeciwko zapaleniu wątroby typu E ptaków w wybranych stadach u jednodniowych piskląt brojlerów kurzych (CB) pochodzących po różnych stadach rodzicielskich kur linii mięsnej w Polsce.

Do badań pobrano próbki krwi łącznie od 92 stad (2 112 surowic) z 12 województw (**Tab. 6** i **Tab. 7**). Analizowano również zależność pomiędzy seroprewalencją a wynikami produkcyjnymi uzyskanymi w tych stadach (EWW – Europejski Wskaźnik Wydajności).

Tab. 6. Zestawienie zbiorcze z liczby zbadanych stad CB i surowic metodą ELISA w latach 2010, 2014 oraz 2019.

Lp.	Rok	Liczba stad n (%)	Liczba surowic n (%)
1	2010	20 (21,59%)	458 (21,74%)
2	2014	36 (39,20%)	828 (39,13%)
3	2019	36 (39,20%)	828 (39,13%)
Suma:		92	2 112

Tab. 7. Zestawienie zbiorcze lokalizacji i liczby zbadanych stad CB w latach 2010, 2014, 2019 z podziałem według województw.

Lp.	Województwo:	2010	2014	2019	Liczba stad n (%)
1	kujawsko-pomorskie	3	1	3	7 (7,61%)
2	lubelskie	2	2	0	4 (4,35%)
3	małopolskie	0	2	0	2 (2,17%)
4	mazowieckie	7	10	12	29 (31,52%)
5	opolskie	0	6	2	8 (8,70%)
6	podkarpackie	0	1	0	1 (1,09%)
7	podlaskie	2	2	9	13 (14,13%)
8	pomorskie	2	7	5	14 (15,22%)
9	śląskie	1	0	0	1 (1,09%)
10	warminsko-mazurskie	0	1	0	1 (1,09%)
11	wielkopolskie	3	2	2	7 (7,61%)
12	zachodniopomorskie	0	2	3	5 (5,43%)
Suma:		20	36	36	92

1.2. Materiał do badań metodami RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR

W latach 2011 – 2019 przeprowadzono badania molekularne w celu wykrycia materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w wybranych stadach kur (BB i CL) w Polsce. Próbkę do badań pobierano ze świeżych zwłok padłych ptaków lub przyżyciowo (wymazy). Narządy (wątroba, śledziona i ściana pęcherzyka żółciowego) pobierano do jałowych pojemników. Żółć pobierano do strzykawki, a następnie przelewano do probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Za pomocą jałowych wymazówek pobierano wymazy z kloaki i tchawicy. Po dostarczeniu do laboratorium, próbki przechowywano w zamrożeniu do czasu wykonania analiz.

1.2.1. Materiał do badań molekularnych – tkanki i żółc

W latach 2011 – 2019 przeprowadzono badania metodami biologii molekularnej mające na celu wykrycie materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typ E w tkankach pobranych głównie w stadach rodzicielskich brojlerów kurzych, ale również w stadach niosek towarowych, pochodzących z różnych rejonów Polski. Przebadano łącznie 48 stad (45 stad BB oraz 3 stada CL) w różnym wieku od 20 do 61 tygodnia życia. Od ptaków pobierano próbki wątroby (n=172), śledziony (n=166), żółci (n=159) oraz ściany pęcherzyka żółciowego (n=22) (**Tab. 8**).

Tab. 8. Zestawienie zbiorcze ilości próbek (narządy wewnętrzne i żółc) pobranych od ptaków ze stad BB i CL w latach 2011 – 2019 do badań metodą RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR.

Lp.	Rok	Typ produkcyjny (ilość stad)	Ilość próbek			
			Pęcherzyk żółciowy	Żółc	Śledziona	Wątroba
1	2011	BB (2)	6	6	0	3
		CL (1)	0	0	0	1
2	2012	BB (3)	5	5	5	5
3	2013	BB (3)	9	13	10	10
4	2014	BB (3)	0	13	15	15
5	2015	BB (10)	0	31	39	39
		CL (1)	0	5	5	5
6	2016	BB (1)	0	2	2	2
7	2017	BB (10)	2	40	44	42
		CL (1)	0	4	4	4
8	2018	BB (12)	0	36	38	42
9	2019	BB (1)	0	4	4	4
Suma: 519 (100%)			22 (4,24%)	159 (30,64%)	166 (31,98%)	172 (33,14%)

Do przeprowadzanych badań próbki pulowano (od 1 do 9) w obrębie typu tkanki. Z każdego stada wykonywano analizy na jednej próbce zbiorczej z danego typu dostępnej tkanki. Szczegółowy wykaz pojedynczych próbek które pulowano zawarty jest w **Tab. 53** oraz **Tab. 54**.

1.2.2. Materiał do badań molekularnych – zarodki

W roku 2013 przeprowadzono zakażenie zarodków kurzych celem izolacji aHEV i określenia jego zjadliwości. Do badań użyto zarodki kurze SPF (specific pathogen – free) (VALO BioMedia, Niemcy), które inokulowano w 5-tym dniu inkubacji do pęcherzyka

żółtkowego. Materiał przeznaczony do zakażenia zarodków stanowiły zawieszone w roztworze soli fizjologicznej próbki tkanek pobranych w trakcie badania sekcijnego ptaków ze stada BB w wieku 46 tygodni w 2012 r., w którym wcześniej potwierdzono obecność materiału genetycznego wirusa BLS – stado nr 034 (**Tab. 9**). Po homogenizacji zawiesinę wirowano (5 000 rpm x 15 min. w temp. 4°C). Otrzymany supernatant wprowadzono za pomocą sterylnej igły iniekcyjnej (23G) do pęcherzyka żółtkowego w objętości 0,1 ml/zarodek. Inokulowane zarodki inkubowano w inkubatorze HEKA (Przewóz, Polska) przez 13 dni (tj. do 18 dnia inkubacji) w 37°C i 55% wilgotności, codziennie prześwietlano i odnotowywano śmiertelność.

Tab. 9. Zawiesina użyta do inokulacji zarodków (pochodząca od zakażonych kur BB).

Nazwa próbki	Materiał użyty do inokulacji (zawieszony w roztworze fizjologicznym)
Z1, Z2	Żółć
Z3, Z4	Pęcherzyk żółciowy
Z5, Z6	Śledziona
Z7, Z8	Wątroba
Z9	Roztwór soli fizjologicznej – próba negatywna (kontrola zdrowa)

Od każdego zakażonego zarodka (zamarłe, niezamarłe) oraz zarodka z grupy kontrolnej pobrano próbki wątroby oraz pęcherzyka żółciowego do jałowych pojemników które następnie przechowywano zamrożone do czasu wykonania analiz.

1.2.3. Materiał do badań molekularnych – wymazy

W roku 2012 w zdiagnozowanym (na podstawie obrazu klinicznego, historii fermi oraz wyników serologicznych) ognisku BLS w stadzie BB (oznaczonym jako 036) pobrano od 7 ptaków wymazy z kloaki (W18) oraz tchawicy (W19) za pomocą jałowych wymazówek, które następnie przechowywano zamrożone do czasu wykonania analiz.

2. Metody

2.1. Badania serologiczne

Badania serologiczne wykonano przy pomocy komercyjnego zestawu Big Liver and Spleen Disease Antibody Test Kit (BLS ELISA CK131, BioChek, Holandia), według procedury podanej przez producenta. Do odczytu gęstości optycznej (OD – optical density) próbek użyto czytnika ELISA (BioTek, ELx800, USA) oraz programu BioChek Software (wersja używana do 2017: BioChek 2008, wersja używana od 2018: BioChek II Software

2020). Uwzględniano następujące parametry: średnią geometryczną wartość mian (Gmean), współczynnik zmienności (%CV), liczbę surowic pozytywnych (POS), liczbę surowic negatywnych (NEG), procent surowic pozytywnych (%POS), procent surowic negatywnych (%NEG), miana minimalne (Min) oraz miana maksymalne (Max).

W celu określenia zależności między różnymi parametrami serologicznymi a wiekiem ptaków wyodrębniono 4 grupy wiekowe (badania w wybranych stadach BB, LB i CL w Polsce w latach 2010 – 2018):

1. Odchów – ptaki w wieku do 24 tygodnia życia
2. Wczesny okres nieśności – od 25 do 34 tygodnia życia
3. Środkowy okres nieśności – od 35 do 49 tygodnia życia
4. Końcowy okres nieśności – powyżej 50 tygodnia życia

Dla badań próbek (pobieranych pięciokrotnie w odstępach od 5 do 7 tygodni) pobranych na fermie z potwierdzoną historią zakażenia BLS (kurniki K1 i K2) wyliczono również współczynnik serokonwersji – WS [83].

Współczynnik serokonwersji (WS) wyliczano według następującego wzoru:

$$WS = \frac{Gmean\ B}{Gmean\ A}$$

Gdzie: A oznacza termin badania pierwszego (najczęściej pobiera się w okresie pojawienia się objawów klinicznych lub/i zmian sekcyjnych), zaś B oznacza termin drugiego badania.

Tab. 10. Współczynnik serokonwersji w przebiegu wirusowych chorób kur ustalony dla par surowic. Źródło: Szeleszczuk, 2023 [83]

Wartość współczynnika serokonwersji	Interpretacja
< 2	Brak serokonwersji
$> 2 \leq 5$	Słaba serokonwersja
> 5	Serokonwersja
> 10	Silna serokonwersja

Przy interpretacji wyników brano też pod uwagę: wiek stad, typ produkcyjny, lata w których były pobierane surowice oraz w przypadku jednodniowych piskląt brojlerów kurzych lokalizację stad, a także wyniki produkcyjne przedstawione za pomocą Europejskiego Wskaźnika Wydajności (EWW). Wyniki produkcyjne wyliczano na koniec cyklu produkcyjnego, w przypadku badań własnych długość odchowu trwała od 35 do 47 dni.

EWW obliczono według następującego wzoru:

$$EWW = \frac{\text{masa ciała (kg)} \times \text{przeżywalność (\%)}}{\text{wiek (dni)} \times \text{zużycie paszy} \left(\frac{\text{kg}}{\text{mc}}\right)}$$

Ze względu na duże zróżnicowanie liczby próbek pobranych w poszczególnych województwach od stad CB do celów analizy statystycznej całą Polskę podzielono na 5 regionów (**Ryc. 6**):

- PN-Z – region północno-zachodni (województwo zachodnio-pomorskie, pomorskie, kujawsko-pomorskie oraz wielkopolskie)
- PN-W – region północno-wschodni (województwo warmińsko-mazurskie oraz podlaskie)
- C – region centralny (województwo mazowieckie)
- PD-Z – region południowo-zachodni (województwo opolskie oraz śląskie)
- PD-W – region południowo-wschodni (województwo małopolskie, podkarpackie oraz lubelskie)



Ryc. 6. Podział Polski na regiony w celu analizy wyników ELISA dla anty-aHEV w wybranych stadach CB w latach 2010, 2014 oraz 2019.

2.2. PCR

W celu stwierdzenia obecności materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków przeprowadzano badanie RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR. Przygotowanie próbek do obu typów badań odbywało się w ten sam, opisany poniżej sposób.

Ekstrakcja RNA z żółci i tkanek pobranych od ptaków

Do ekstrakcji RNA wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw Total RNA Mini Plus – zestaw do ekstrakcji RNA bez użycia chloroformu (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). W procedurze podanej przez producenta wprowadzono własną modyfikację, która polegała na homogenizacji żółci (100 µl) lub tkanek (20-50 mg uprzednio roztartych w moździerzu z ciekłym azotem) po dodaniu 400 µl (lub 500 µl w przypadku wymazów – modyfikacja własna) fenozolu. Homogenizację przeprowadzano w aparacie Standard GeneReady (Life Real, Chiny) przez 4 cykle w każdym 1 minuta homogenizacji przy prędkości 6,50 m/s, a następnie 1 minuta wstrzymania. Potem próbki poddawano 5 minutowej inkubacji w temperaturze 50°C przy prędkości mieszania 800 rpm w aparacie Thermomixer comfort (Eppendorf, Niemcy). Kolejne etapy przeprowadzano według procedury podanej przez producenta zestawu: do lizatu dodawano 150 µl wody destylowanej wolnej od RNaz, następnie intensywnie worteksowano przez 15 s. przy użyciu aparatu vortex mixer (Labnet, Labnet International, Inc., Edison, New Jersey, USA). Następnie próbki pozostawiano na 5 min. w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 15 min. z prędkością 12 000×g (8800 obr./min.) przy użyciu wirówki MPW-65R (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska). Następnie przenoszono 400 µl supernatantu do nowej probówki (1,5 ml typu Eppendorf wolnej od RNaz i DNaz) i dodawano 400 µl izopropanolu. Całość dokładnie mieszano przez pipetowanie i nanoszono na minikolumnę dołączoną do zestawu. Minikolumnę wirowano przez 1 min. przy prędkości 12 000×g (8800 obr./min.) przy użyciu wirówki MPW-65R. Następnie minikolumnę umieszczano na nowej 2 ml probówce odbierającej (dołączonej do zestawu), po czym dodawano do minikolumny 700 µl roztworu płuczającego A1 i poddawano wirowaniu przez 1 min. z prędkością 12 000×g (8800 obr./min.) przy użyciu wirówki MPW-65R. Ponownie usuwano minikolumnę z próbki i umieszczano w nowej probówce 2 ml. Następnie dodano do minikolumny 700

μl roztworu płuczącego A1 i wirowano przez 1 min. przy prędkości 12 000×g (8800 obr./min.) przy użyciu tej samej wirówki. Po czym zdejmowano kolumnę z probówki 2 ml, wylewano przesącz i wkładano kolumnę z powrotem do tej samej probówki. Następnie dodawano do minikolumny 300 μl roztworu płuczącego A1 i wirowano przez 2 min. przy prędkości 12 000×g (8800 obr./min.). Minikolumnę umieszczano w nowej jałowej, wolnej od RNAz i DNAz probówce 1,5 ml i do złoza znajdującego się na dnie minikolumny dodawano 50 μl jałowej, wolnej od RNAz wody destylowanej i pozostawiano na 2 min. w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 1 min. przy prędkości 12 000×g (8800 obr./min.). W kolejnym etapie minikolumnę usuwano, a wyizolowane RNA poporcjowano do kilku probówek (wolnych od RNAz i DNAz) i przechowywano w zamrożeniu do czasu dalszych analiz.

Odwrotna transkrypcja

W celu przepisania RNA na cDNA zastosowano komercyjnie dostępny zestaw Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Litwa), zgodnie z wytycznymi producenta według protokołu I – First Strand cDNA Synthesis. Odczynniki oraz RNA rozmrażano w temperaturze 4°C, reakcję przeprowadzano w statywach chłodzących. Do probówek o pojemności 0,5 ml wolnych od DNAz i RNAz dodawano po 2 μl RNA, 1 μl oligo(dT)₁₈ primer oraz 9 μl wody wolnej od DNAz i RNAz. W kolejnym etapie podgrzewano mieszaninę w 65°C przez 5 min, a następnie schładzano do 4°C, przy pomocy urządzenia: Mastercycler personal (Eppendorf, Niemcy). Potem próbki wirowano przy pomocy urządzenia: MiniSpin (Eppendorf, Niemcy) lub miniwirówki (HTL Lab Solutions, Warszawa, Polska). Następnie do probówek dodawano: 4 μl 5xReaction Buffer, 1 μl RiboLock RNase Inhibitor (20u/μl), 2 μl 10mM dNTP Mix oraz 1 μl RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/μl). Mieszaninę mieszano przez pipetowanie i poddawano inkubacji przez 60 min. w 42°C, potem 5 min. w 70°C, a następnie schładzano do 4°C przy pomocy urządzenia: Mastercycler personal. Uzyskane cDNA przechowywano w temp. –20°C do czasu wykonania kolejnych analiz.

2.3. RT-PCR dla genu kodującego helikazę (fragment ORF1) oraz genu kodującego białko kapsydu (ORF2)

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

Skład mieszaniny reakcyjnej:

- 12,5 µl Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Litwa)
- 8 µl woda wolna od DNaz i RNaz (Fermentas, Litwa)
- 1 µl (10 pmol/µl) starter Forward (IBB PAN, Polska)
- 1 µl (10 pmol/µl) starter Reverse (IBB PAN, Polska)
- 2,5 µl cDNA

Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 25 µl. Sekwencje wszystkich testowanych starterów przedstawione zostały w **Tab. 56** (załącznik, rozdział VII), natomiast sekwencje starterów użytych w badaniach zostały przedstawione w **Tab. 11**.

Tab. 11. Zestawienie par starterów zastosowanych w celu wykrycia materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków.

Kierunek badania (gen)	Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' – 3')	Wielkość produktu	Źródło
helikaza	Helicase F	TGG CGC ACY GTW TCY CAC CG	186 pz	Huang i wsp., 2002 [27]
	Helicase R	CCT CRT GGA CCG TWA TCG ACC C		
kapsyd	Forw1_C-BLSV	GGT ATG GTT GA ^Y TTT GCC ATA AAG	280 pz	Bilic i wsp., 2009 [10]*
	Rev1_C-BLSV	GC ^Y GCN CGN ARC AGT GTC GA		

*Czerwonym kolorem zaznaczona modyfikacja własna.

Amplifikacja

Proces amplifikacji w celu wykrycia genu kodującego helikazę obejmował kolejno: wstępną denaturację 95°C 5 min., a następnie 40 cykli: denaturacja 95°C 30 sek., przyłączanie starterów 56°C 30 sek. i wydłużanie łańcucha 72°C 60 sek. Końcowe wydłużanie przebiegało w temp. 72°C przez 10 minut. Protokół powstał w oparciu o instrukcję producenta zestawu do PCR (Dream Taq PCR Master Mix), artykuł Huang i wsp. [27] wraz z wprowadzonymi modyfikacjami własnymi.

Proces amplifikacji w celu wykrycia genu kodującego białko kapsydu obejmował kolejno: wstępną denaturację 95°C przez 5 min., a następnie 40 cykli: denaturacja 95°C przez 30 sek., przyłączanie starterów 61°C przez 30 sek. i wydłużanie łańcucha 72°C przez

60 sek. Końcowe wydłużanie przebiegało w temp. 72°C przez 10 minut. Protokół opracowano na podstawie instrukcji producenta Dream Taq PCR Master Mix, artykułu Bilic i wsp. [10] oraz modyfikacji własnych.

Elektroforeza

Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, w buforze TAE, przy stałym napięciu 65 V. Do studzienek w żelu nanoszono po 10 µl mieszaniny poreakcyjnej. Żel fotografowano w świetle UV przy użyciu aparatu UVP GelDoc-It™310 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Litwa) oraz programu VisionWorksLS. Poszukiwano fragmentu genu kodującego helikazę o długości 186 par zasad [27] lub fragmentu genu kodującego białko kapsydu o długości 280 par zasad (pz) [10]. Jako wzorzec wielkości fragmentów DNA stosowano marker GeneRuler 100bp i 50bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Litwa) nakładany do studzienek w objętości 3 µl.

Sekwencjonowanie

Produkty reakcji RT-PCR, które uzyskały wyniki pozytywne dla fragmentu genu kodującego helikazę lub białko kapsydu poddawano sekwencjonowaniu (Genomed S.A., Warszawa, Polska). Wszystkie próbki sekwencjonowano w obu kierunkach, tj. ze starterami forward i reverse odpowiednim dla danej reakcji. Jedynie próbki które uzyskały wynik pozytywny z wymazów nie zostały poddane sekwencjonowaniu.

2.4. Real-Time RT-PCR (jakościowe) dla genu kodującego białko kapsydu (ORF2)

Przygotowanie liniowych standardów do reakcji Real-Time RT-PCR

Bezpośrednio po uzyskaniu oczyszczonego DNA z próbki pozytywnej przygotowano rozcieńczenia 10-krotne standardów w wodzie wolnej od DNaz i RNaz (Fermentas, Litwa). Kolejne liniowe standardy wyglądały w następujący sposób: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000. Następnie rozcieńczone standardy przechowywano zamrożone do czasu wykonania kolejnych analiz.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

Skład mieszaniny reakcyjnej:

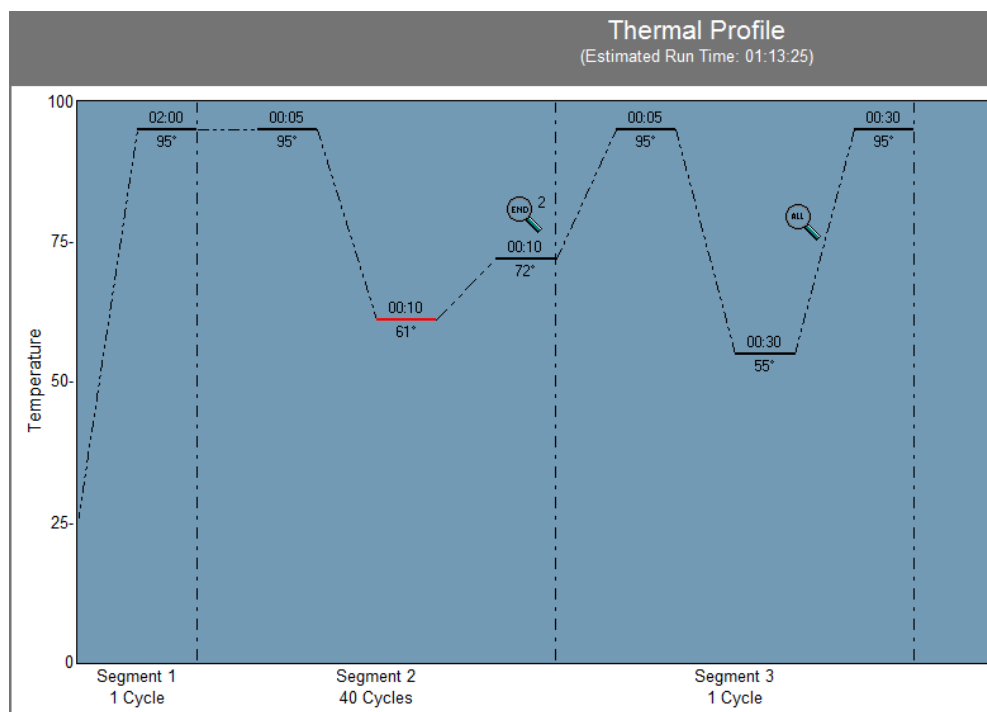
Material i metody

- 10 μ l SensiFAST SYBR Lo-ROX (Bioline, Wielka Brytania)
- 5,9 μ l woda demineralizowana (Fermentas, Litwa)
- 0,8 μ l (25 pmol/ μ l) starter Forward (IBB PAN, Polska)
- 0,8 μ l (25 pmol/ μ l) starter Reverse (IBB PAN, Polska)
- 2,5 μ l cDNA

Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 20 μ l. Sekwencje starterów zastosowane w badaniach zostały przedstawione w **Tab.11**.

Amplifikacja

Proces amplifikacji w celu wykrycia genu kodującego białko kapsydu obejmował kolejno: wstępną denaturację 95°C 2 min., a następnie 40 cykli: denaturacja 95°C przez 5 sek., przyłączanie starterów 61°C przez 10 sek. i wydłużanie łańcucha 72°C przez 10 sek. Krzywa topnienia: denaturacja 95°C przez 5 sek., podgrzanie do 55°C przez 30 sek., a następnie stopniowe podwyższanie temperatury badanej mieszaniny do 95°C (**Ryc. 7**). Protokół powstał w oparciu o instrukcję producenta SensiFAST SYBR Lo-ROX oraz artykuł Bilic i wsp. [10] wraz z modyfikacjami własnymi.

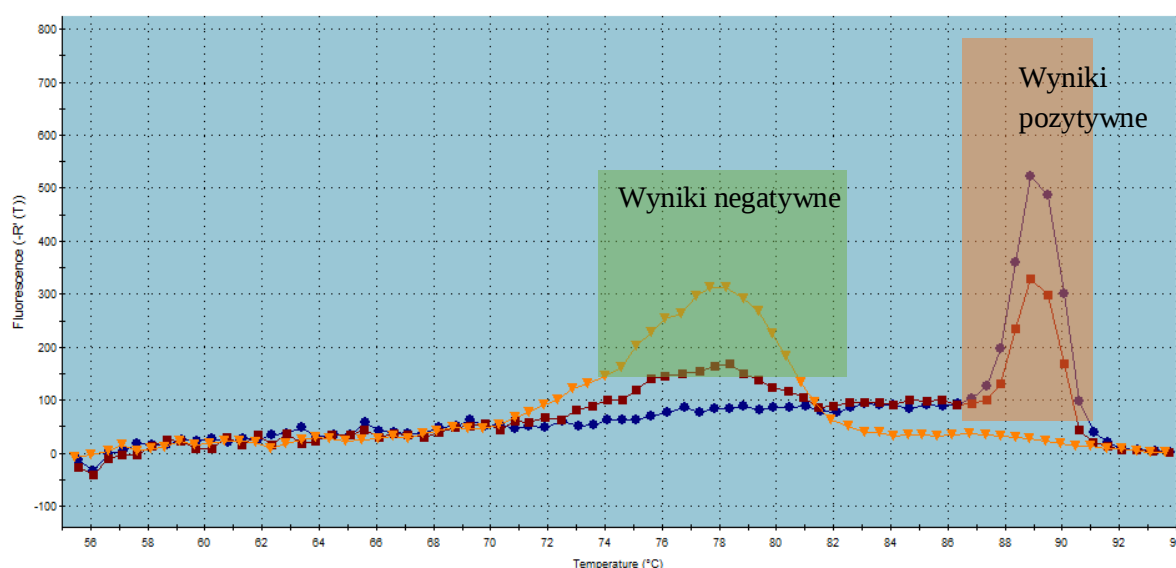


Ryc. 7. Etapy amplifikacji Real-Time RT-PCR przy użyciu starterów mających na celu wykrycie materiału genetycznego kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków.

Badania Real-Time RT-PCR były przeprowadzane przy użyciu aparatu Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) oraz programu MxPro QPCR Software.

Wyniki pozytywne

Ze względu na powstawanie dwóch pików na krzywej topnienia (jeden odpowiadający krzywej dysocjacji dimerów starterów i drugi odpowiadający za specyficzną szukaną sekwencję) [61] do określenia wyniku pozytywnego nie można było wykorzystać C_t i nie można było wykorzystać tej metody jako metody ilościowej.



Ryc. 8. Przykładowy wykres krzywej topnienia w badaniach Real-Time RT-PCR w kierunku wykrycia genu kodującego białko kapsydu – kontrola negatywna i dwie kontrole pozytywne (rozcieńczenie 1:1 i 1:10).

Za wyniki pozytywne reakcji Real-Time RT-PCR uznano wyniki które wykazywały wartość pików T_m wynoszącą $88,49^{\circ}\text{C} \pm 0,46$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$), w zakresie od $87,58$ do $89,25^{\circ}\text{C}$. Temperatura ta była specyficzna dla szukanej sekwencji fragmentu genu kodującego białko kapsydu.

Sekwencjonowanie

Produkty reakcji Real-Time RT-PCR, które uzyskały wyniki pozytywne dla fragmentu genu kodującego białko kapsydu zostały następnie wykonane ponownie bez krzywej topnienia i poddane sekwencjonowaniu (Genomed S.A., Warszawa, Polska).

Wszystkie próbki zostały sekwencjonowane ze starterem Forward oraz Reverse odpowiednim dla danej reakcji.

2.5. Kontrola pozytywna w reakcji RT-PCR i Real-Time RT-PCR

Kontrola dodatnia została pozyskana z antygeny Big Liver & Spleen disease uzyskanego z dostępnego testu AGID (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, nowa nazwa: Animal and Plant Health Agency, Wielka Brytania). Antygen rozcieńczano w proporcji 1:10 z PBS (Biomed, Lublin, Polska), a następnie przeprowadzano ekstrakcję RNA w taki sam sposób jak w przypadku materiału badanego.

3. Analiza statystyczna

W przeprowadzonych badaniach analizowano różnego typu zmienne, w tym zmienne ciągle ilościowe i zmienne skategoryzowane zero-jedynkowe. W celu porównania średnich badanych zmiennych ciągłych między latami lub regionami przeprowadzono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji i porównań wielokrotnych średnich z wykorzystaniem metody Tukeya (HSD) [71]. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) to metoda statystyczna stosowana do testowania istotnych różnic między średnimi grup danych. Jest ona powszechnie stosowana w badaniach eksperymentalnych w celu porównania wpływu różnych poziomów czynników. W przypadku jednoczynnikowej analizy wariancji, badany jest wpływ jednego czynnika na zmienną zależną. Jeśli wynik testu F w analizie wariancji wskazuje na statystycznie istotny wpływ czynnika, można przeprowadzić dalsze analizy, takie jak na przykład test Tukeya HSD, aby porównać poszczególne grupy ze sobą. Metoda Tukeya HSD pozwala na identyfikację grup jednorodnych, w celu określenia, które poziomy czynnika różnią się od siebie pod względem średnich wartości. W przeprowadzonych analizach przyjęto poziom istotności równy 0,05.

W celu określenia związków między wybranymi parami zmiennych obliczono współczynniki korelacji Pearsona. Współczynnik korelacji Pearsona, jest miarą liniowego powiązania między dwiema zmiennymi ilościowymi. Jego wartość mieści się w zakresie od -1 do 1. Wartość współczynnika korelacji informuje nas o sile i kierunku zależności między zmiennymi. Im bliżej wartości -1 lub 1, tym silniejsza jest ta zależność. Wartość 0 oznacza brak liniowej zależności między zmiennymi. Poza samym obliczeniem współczynnika korelacji określa się jego istotność statystyczną, czyli testuje się czy jego wartość jest istotnie

różna od zera. W przeprowadzonych badaniach przyjęto przy testowaniu istotności statystycznej $\alpha = 0,05$.

Ponadto dla oceny trendu zmian w latach wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana. Współczynnik korelacji rang Spearmana jest jedną z nieparametrycznych miar monotonicznej zależności statystycznej między zmiennymi losowymi. Interpretacja zarówno współczynnika korelacji Pearsona, jak i współczynnika korelacji Spearmana jest podobna. Wartości bezwzględne tych współczynników korelacji oznaczają:

- 0 – 0,3: Słaba korelacja,
- 0,3 – 0,5: Korelacja umiarkowana,
- 0,5 – 0,7: Silna korelacja,
- 0,7 – 1: Bardzo silna korelacja.

W celu określania zgodności między wynikami pozytywnymi różnych testów wykorzystano współczynnik kappa Cohena [93]. Współczynnik Kappa Cohena jest używany w statystyce do oceny zgodności między parami pomiarów zmiennych skategoryzowanych. Wartość Kappy Cohena mieści się w zakresie od –1 do 1. Im bliżej 1, tym oceny są bardziej zgodne, a wartość 0 oznacza brak zgodności między ocenami. Interpretacja przedziałów wartości:

- 0,0 – 0,2: Brak zgodności (słaba),
- 0,21 – 0,4: Słaba zgodność,
- 0,41 – 0,6: Umiarkowana zgodność,
- 0,61 – 0,8: Dobra zgodność,
- 0,81 – 1,0: Bardzo dobra zgodność.

W celu porównania frakcji procentowych zmiennych zero-jedynkowych wykorzystano test chi-kwadrat Pearsona. Test chi-kwadrat jest używany do badania współzależności między dwiema zmiennymi w tabelach kontyngencji, co może być wykorzystywane między innymi do określenia związku między dwiema zmiennymi zero-jedynkowymi, co z kolei jest tożsame z porównaniem frakcji dwóch grup dla zmiennych zero-jedynkowych. Tabela kontyngencji to krzyżowa tabela, w której obserwuje się występowanie dwóch zmiennych jakościowych, w przypadku dwóch zmiennych zero-jedynkowych jest to tabela 2x2. Test chi-kwadrat pozwala sprawdzić, czy różnice między frakcjami dwóch grup dla zmiennych zero-jedynkowych są istotne statystycznie.

Material i metody

Analizy statystyczne przeprowadzono w programie Statistica 13 (TIBCO Software Inc. 2017). We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności równy 0,05.

IV. WYNIKI

1. Wyniki monitoringu serologicznego przeprowadzanego w latach 2010 – 2019

1.1. Wyniki badań serologicznych w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków w wybranych stadach rodzicielskich kur linii mięsnej, nieśnej oraz stad niosek towarowych w Polsce w latach 2010 – 2018

Spośród zbadanych 230 stad BB, LB i CL w Polsce w latach 2010 – 2018 łącznie w 96,96% uzyskano wyniki pozytywne w kierunku aHEV. Większość badanych stad (222) stanowiły stada rodzicielskie brojlerów kurzych (BB), wśród nich, aż w 83,33% przypadków stwierdzono przeciwciała anty-aHEV. Wszystkie badane stada niosek towarowych (CL), były pozytywne zaś z dwóch stad reprodukcji nieśnej (LB) w jednym stwierdzono obecność przeciwciał.

Łącznie zbadano 5 272 surowic, z których 1 464 (27,77%) było pozytywnych. Wykazano, że w 28,2% (1 435) z 5 089 surowic pobranych od ptaków ze stad rodzicielskich kurcząt brojlerów (BB) było dodatnich, podczas gdy w 137 surowicach pochodzących od niosek towarowych (CL) wyniki pozytywne stwierdzono w 26 próbkach (18,98%), natomiast w 46 surowicach pochodzących ze stad rodzicielskich kur niosek (LB) wyniki pozytywne stwierdzono w 3 próbkach (6,52%).

W **Tab. 12** podano zestawienie liczbowe z podziałem na poszczególne lata i typy produkcyjne.

Wyniki poszczególnych stad BB, LB i CL badanych w latach 2010 – 2018 umieszczono w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 51**.

Tab. 12. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA dla przeciwciał anty-aHEV (liczba i procent stad oraz surowic pozytywnych) w stadach BB, LB, CL w latach 2010 – 2018.

Lp.	Rok	Typ produkcyjny	Wiek ptaków (tyg.)	Procent (%)	Liczba (n)	Procent (%)	Liczba (n)
				stad pozytywnych		surowic pozytywnych	
1	2010	BB, LB, CL	48 – 95	85,00%	17/20	19,00%	87/458
		BB	48 – 95	86,67%	13/15	19,48%	67/344
		LB	50 – 76	50,00%	1/2	6,52%	3/46
		CL	60 – 66	100,00%	3/3	25,00%	17/68
2	2011	BB	22 – 99	87,88%	29/33	32,65%	254/778
3	2012	BB	23 – 54	100,00%	20/20	41,48%	190/458
4	2013	BB	25 – 59	75,00%	15/20	44,78%	206/460
5	2014	BB	22 – 50	77,78%	14/18	25,18%	104/413

Wyniki

6	2015	BB, CL	28 – 76	88,24%	15/17	16,58%	65/392
		BB	28 – 76	86,67%	13/15	17,05%	59/346
		CL	35 – 37	100,00%	2/2	13,04%	6/46
7	2016	BB	23 – 77	100,00%	29/29	40,57%	258/636
8	2017	BB, CL	28 – 76	82,05%	32/39	25,53%	229/897
		BB	22 – 61	81,58%	31/38	25,86%	226/874
		CL	41	100,00%	1/1	13,04%	3/23
9	2018	BB	10 – 56	61,76%	21/34	9,10%	71/780
Suma:		BB	10 – 99	83,33%	185/222	28,20%	1 435/5 089
		LB	50 – 76	50,00%	1/2	6,52%	3/46
		CL	35 – 66	100,00%	6/6	18,98%	26/137
		BB, LB, CL	10 – 99	96,96%	223/230	27,77%	1 464/5 272

W **Tab. 13** zostały przedstawione wyniki zbiorcze ELISA wykazujące obecność przeciwciał anty-aHEV w badanych stadach. Średnia wartość miana przeciwciał wyliczona z poszczególnych średnich mian geometrycznych (Gmean) uzyskanych ze stad (BB, LB, CL) wyniosła 316,27 (wahała się od 1 do maksymalnie 1458). Współczynnik zmienności (CV) opisujący zróżnicowanie rozkładu mian wewnątrz stada wyniósł średnio 104,39% (od 31% do 424%). Średnia dla mian minimalnych (Min) wyniosła 75,34 (od 1 do 397), natomiast dla mian maksymalnych (Max) 1 922,53 (od 45 do 6 708). Należy zaznaczyć, że miano 391 lub wyższe jest uznawane za miano pozytywne (według danych producenta zestawu Big Liver and Spleen Disease Antibody Test Kit, BioChek, Holandia).

Wartości dla poszczególnych stad i opisane w tekście wartości skrajne dla różnych parametrów są przedstawione w załączniku (**Tab. 51**).

Tab. 13. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA anty-aHEV (Gmean, CV, Min, Max) w stadach BB, LB, CL w latach 2010 – 2018.

Lp.	Rok	Typ produkcyjny	Wiek ptaków (tyg.)	Gmean (średnia)	CV (średnia)	Min (średnia)	Max (średnia)
1	2010	BB, LB, CL	48 – 95	157,75	134,00%	12,30	1 580,15
		BB	48 – 95	172,93	135,47%	11,87	1 777,33
		LB	50 – 76	24,50	141,00%	1,00	419,00
		CL	60 – 66	170,67	122,00%	22,00	1 368,33
2	2011	BB	22 – 99	398,00	101,03%	80,12	2 252,76
3	2012	BB	23 – 54	468,80	95,30%	114,35	2 563,45
4	2013	BB	25 – 59	522,40	100,40%	124,60	2 217,65
5	2014	BB	22 – 50	294,06	123,72%	77,00	1 923,89
6	2015	BB, CL	28 – 76	205,53	88,82%	59,06	1 285,35
		BB	28 – 76	203,40	91,00%	55,80	1 321,73
		CL	35 – 37	221,50	72,50%	83,50	1 012,50

Wyniki

7	2016	BB	23 – 77	425,55	90,24%	118,72	2 182,21
8	2017	BB, CL	22 – 61	291,38	98,49%	77,38	2 092,77
		BB	22 – 61	294,97	98,61%	78,87	2 122,79
		CL	41	155,00	94,00%	21,00	952,00
9	2018	BB	10 – 56	121,71	114,29%	23,76	1 153,91
Suma:		BB	10 – 99	322,45	104,15%	76,90	1 956,14
		LB	50 – 76	24,50	141,00%	1,00	419,00
		CL	35 – 66	185,00	100,83%	42,33	1 180,33
		BB, LB, CL	10 – 99	316,27	104,39%	75,34	1 922,53

W **Tab. 14** przedstawiono średnią wartość Gmean, CV oraz odsetka surowic i stad pozytywnych łącznie dla stad BB, LB oraz CL uwzględniając podział na grupy wiekowe. Natomiast w **Tab. 15** przedstawiono te same wyniki jedynie dla stad rodzicielskich kurcząt brojlerów (BB). W obu przypadkach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami wiekowymi ptaków, zarówno w obrębie samych stad BB, jak również w stadach BB, LB i CL (zbiorczo), gdyż we wszystkich przypadkach wartość p (na podstawie analizy wariacji – ANOVA) była wyższa niż 0,05. Chociaż odnotowano pewną korelację między wiekiem, a wartościami średniego miana geometrycznego (Gmean) i procentem surowic pozytywnych, wartości obu tych parametrów były wyższe u ptaków powyżej 35 tygodnia życia co także odzwierciedla wartość p, która w tych dwóch przypadkach była niższa.

Tab. 14. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA dla anty-aHEV (Gmean, CV, procent stad i surowic pozytywnych) w stadach BB, LB, CL w różnych grupach wiekowych w latach 2010 – 2018.

Grupy wiekowe ptaków	Gmean (średnia)	CV (średnia)	Procent stad pozytywnych (średnia)	Procent surowic pozytywnych (średnia)
Odchów (do 24 tyg.)	249,95	79,81%	76,19%	22,85%
Wczesny okres nieśności (25 – 34 tyg.)	236,71	106,55%	81,63%	20,59%
Środkowy okres nieśności (35 – 49 tyg.)	355,60	108,89%	87,64%	31,13%
Końcowy okres nieśności (powyżej 50 tyg.)	341,51	104,52%	81,69%	30,73%
p-value	0,109	0,219	0,534	0,112

Wyniki

Tab. 15. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA anty-aHEV (Gmean, CV, procent stad i surowic pozytywnych) w stadach BB w różnych grupach wiekowych w latach 2010 – 2018.

Grupy wiekowe ptaków	Gmean (średnia)	CV (średnia)	Procent stad pozytywnych (średnia)	Procent surowic pozytywnych (średnia)
Odchów (do 24 tyg.)	249,95	79,81%	76,19%	22,85%
Wczesny okres nieśności (25 – 34 tyg.)	236,71	106,55%	81,63%	20,59%
Środkowy okres nieśności (35 – 49 tyg.)	361,05	109,91%	87,21%	31,76%
Końcowy okres nieśności (powyżej 50 tyg.)	358,88	102,62%	81,82%	31,74%
p-value	0,073	0,199	0,595	0,081

1.2. Zestawienie okresowych wyników badań ELISA w kierunku oceny specyficznej serokonwersji w ognisku BLS

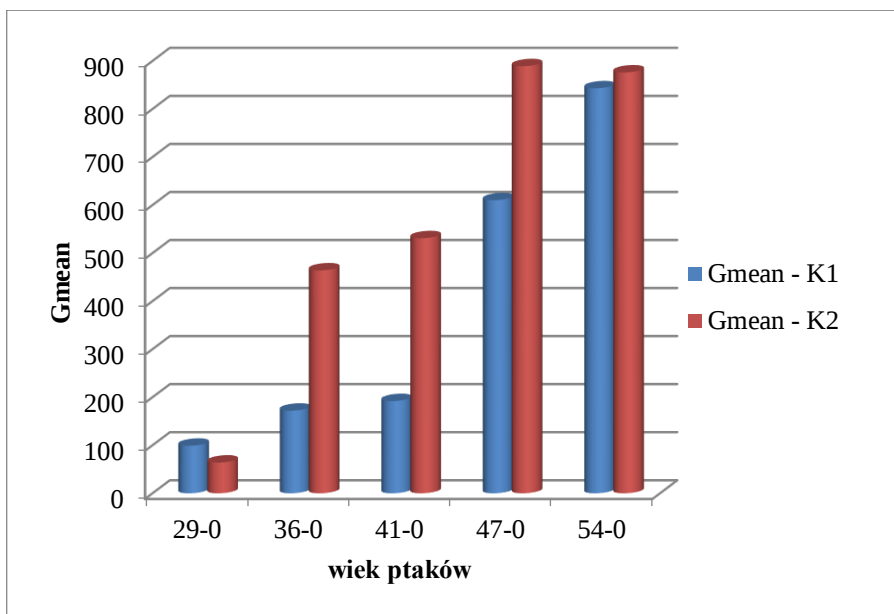
Wykonane w dwóch stadach BB fermy monitorowanej w 2011 r. badania potwierdziły obecność i rozwój zakażenia. W sumie zbadano 253 surowice, z których 104 były pozytywne, co stanowiło 41,11%. W obu stadach potwierdzono serokonwersję, w stadzie numer 1 (oznaczonym jako K1) między 41 a 47 tygodniem życia wskaźnik serokonwersji wyniósł 3,2, natomiast w stadzie numer 2 (oznaczonym jako K2) między 29, a 36 tygodniem życia wskaźnik serokonwersji wyniósł 7,25. Wyniki przedstawiono w **Tab. 16** oraz na **Ryc. 9**.

Tab. 16. Kształtowanie się wyników ELISA dla anty-aHEV w dwóch stadach BB (K1 i K2) w czasie (2011 rok).

Wiek ptaków (tyg.)	N	Gmean	%CV	Ilość surowic pozytywnych	Procent surowic pozytywnych	Min	Max
K1							
29	23	99	284%	3	13,04%	1	5 237
36	46	172	127%	10	21,74%	1	1 925
41	23	192	155%	4	17,39%	57	1 995
47	23	610	114%	12	52,17%	93	4 354
54	23	843	88%	16	69,57%	166	3 748
K2							
29	23	64	117%	3	13,04%	1	774
36	23	464	107%	11	47,83%	192	2 614

Wyniki

41	23	531	104%	13	56,52%	87	3 618
47	23	889	89%	18	78,26%	85	4 074
54	23	876	95%	14	60,87%	89	4 679



Ryc. 9. Kształtowanie się średniego miana geometrycznego (Gmean) w dwóch stadach BB (K1 i K2) w trakcie okresu nieśności.

W stadzie K1 były to wyniki oznaczone, jako: E05, E09, E14, E23 oraz E29, w stadzie oznaczonym jako K2 natomiast: E06, E10, E15, E24 i E30. Wyniki dla poszczególnych stad podane są w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 51**.

1.3. Wyniki badań ELISA w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków w wybranych stadach kurcząt rzeźnych w Polsce w latach 2010, 2014 oraz 2019

Spośród zbadanych metodą ELISA 92 stad jednodniowych piskląt brojlerów kurzych (CB) z lat 2010, 2014 oraz 2019, łącznie 50 stad (54,35%) uzyskało wyniki pozytywne w kierunku obecności przeciwciał przeciwko aHEV. Spośród zbadanych 2 112 surowic, 164 (7,77%) było pozytywnych. W **Tab. 17** podano zestawienie liczbowe dla poszczególnych lat. Wyniki szczegółowe dla poszczególnych przebadanych stad CB umieszczono w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 52**.

Wyniki

Tab. 17. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA dla anty-aHEV (liczba i procent stad oraz surowic pozytywnych) w stadach CB w latach 2010, 2014 oraz 2019.

Lp.	Rok	Liczba stad	Procent (%)	Liczba (n)	Liczba surowic	Procent (%)	Liczba (n)
			stad pozytywnych			surowic pozytywnych	
1	2010	20	50,00%	10	458	5,48%	25
2	2014	36	72,22%	26	828	12,44%	103
3	2019	36	38,89%	14	828	4,35%	36
Suma:		92	54,35%	50	2 112	7,77%	164

W **Tab. 18** przedstawiono wyniki zbiorcze pokazujące kształtowanie się poziomu przeciwciał anty-aHEV oraz dane produkcyjne w badanych stadach kurcząt rzeźnych. Średnia z wartości Gmean poszczególnych stad wynosiła w roku 2010 – 34,25, w 2014 – 97,72, a w 2019 – 20,17. Wyniki w latach 2010 i 2019 nie różniły się statystycznie między sobą, natomiast stwierdzono istotne różnice względem roku 2014. Europejski Wskaźnik Wydajności kształtował się w kolejnych latach na coraz wyższym poziomie zaczynając od 303,30, następnie 329,42, aż do 363,90 i we wszystkich trzech latach wykazano istotne statystycznie różnice w jego wysokości. Procent surowic pozytywnych w roku 2014 wyniósł 12,44% i wykazano statystyczne różnice względem roku 2010 oraz 2019, w których wyniki przedstawiały się kolejno na poziomie 5,48% oraz 4,35%. Wyższy odsetek surowic pozytywnych w 2014 roku przełożył się też na najwyższy procent stad pozytywnych (72,22%) względem innych badanych lat.

Tab. 18. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA dla anty-aHEV (Gmean, EWW, CV, procent surowic i stad pozytywnych) w stadach CB w latach 2010, 2014 oraz 2019.

Rok	Gmean (średnia)	EWW (średnia)	CV (średnia)	% surowic pozytywnych	% stad pozytywnych
2010	34,25 ^a	303,30 ^a	207,45% ^b	5,48% ^a	50,00% ^{ab}
2014	97,72 ^b	329,42 ^b	134,89% ^a	12,44% ^b	72,22% ^b
2019	20,17 ^a	363,90 ^c	181,14% ^{ab}	4,35% ^a	38,89% ^a
p-value	<0,001	<0,001	0,010	0,007	0,016

*Litery obok średnich określają istotne różnice między poszczególnymi średnimi na podstawie procedury Tukeya. Jeśli obok średnich nie ma tej samej litery, to takie średnie różnią się istotnie od siebie.

Na podstawie współczynnika korelacji Pearsona w kilku przypadkach otrzymano statystycznie istotną zależność ($p < 0,05$) (kolor czerwony).

W kolejnych dwóch tabelach zostały przedstawione wyniki zbiorcze z odsetkiem stad dodatnich (**Tab. 19**) oraz surowic dodatnich (**Tab. 20**) z podziałem względem czasu badania oraz lokalizacji w poszczególnych województwach.

Tab. 19. Zestawienie zbiorcze przedstawiające procent (%) oraz liczbę (n) zbadanych stad CB pozytywnych w ELISA dla anty-aHEV w latach 2010, 2014 oraz 2019 z podziałem według województw.

Lp.	Województwo:	2010		2014		2019	
		%	n	%	n	%	n
		stad pozytywnych		stad pozytywnych		stad pozytywnych	
1	kujawsko-pomorskie	66,67%	2	100,00%	1	33,33%	1
2	lubelskie	50,00%	1	50,00%	1	-	-
3	małopolskie	-	-	50,00%	1	-	-
4	mazowieckie	57,14%	4	70,00%	7	50,00%	6
5	opolskie	-	-	100,00%	6	0,00%	0
6	podkarpackie	-	-	0,00%	0	-	-
7	podlaskie	50,00%	1	100,00%	2	33,33%	3
8	pomorskie	50,00%	1	71,43%	5	20,00%	1
9	śląskie	100,00%	1	-	-	-	-
10	warmińsko-mazurskie	-	-	100,00%	1	-	-
11	wielkopolskie	0,00%	0	50,00%	1	50,00%	1
12	zachodniopomorskie	-	-	50,00%	1	66,67%	2
Suma:		50,00%	10	72,22%	26	38,89%	14

Tab. 20. Zestawienie zbiorcze przedstawiające procent (%) oraz liczbę (n) surowic pozytywnych w ELISA dla anty-aHEV w badanych stadach CB w latach 2010, 2014 oraz 2019 z podziałem według województw.

Lp.	Województwo:	2010		2014		2019	
		%	n	%	n	%	n
		surowic pozytywnych		surowic pozytywnych		surowic pozytywnych	
1	kujawsko-pomorskie	2,99%	2	13,04%	3	2,90%	2
2	lubelskie	2,17%	1	6,52%	3	-	-
3	małopolskie	-	-	17,39%	8	-	-
4	mazowieckie	8,75%	14	10,87%	25	5,07%	14
5	opolskie	-	-	24,64%	34	0,00%	0
6	podkarpackie	-	-	0,00%	0	-	-
7	podlaskie	4,35%	2	10,87%	5	3,86%	8
8	pomorskie	4,35%	2	9,94%	16	6,09%	7
9	śląskie	17,39%	4	-	-	-	-
10	warmińsko-mazurskie	-	-	26,09%	6	-	-
11	wielkopolskie	0,00%	0	2,17%	1	4,35%	2
12	zachodniopomorskie	-	-	4,35%	2	4,35%	3
Suma:		5,48%	25	12,44%	103	4,35%	36

W **Tab. 21** zostały przedstawione wyniki serologiczne oraz produkcyjne w badanych stadach CB z podziałem na poszczególne regiony w Polsce. Jedyne istotnie statystyczne różnice wykazano względem EWW pomiędzy regionem centralnym, północno-wschodnim

Wyniki

oraz resztą regionów. W regionie północno-wschodnim, w którego skład wchodzi województwo warmińsko-mazurskie oraz podlaskie EWW osiągnął najwyższe wartości – średnia dla regionu 379,51 (od 310 do 461 w poszczególnych stadach). Kolejny był region centralny, w którego skład wchodzi województwo mazowieckie, dla którego średnia EWW wyniosła 346,04 (od 283 do 412 w poszczególnych stadach). W dalszej kolejności znajdowały się regiony południowo-zachodni (EWW – 312,00), południowo-wschodni (EWW – 316,97) oraz północno-zachodni (EWW – 321,80) między którymi nie wykazano statystycznie istotnych różnic.

Tab. 21. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA anty-aHEV (Gmean, EWW, CV, procent surowic i stad pozytywnych) w stadach CB względem wyodrębnionych regionów.

Region	Gmean (średnia)	EWW (średnia)	CV (średnia)	% surowic pozytywnych	% stad pozytywnych
PN-W północno- wschodni	34,43 ^a	379,51 ^c	179,29 ^a	6,52% ^a	50,00% ^a
PN-Z północno- zachodni	42,61 ^a	321,80 ^a	161,64 ^a	5,28% ^a	48,48% ^a
PD-Z południowo- zachodni	103,33 ^a	312,00 ^a	136,44 ^a	18,36% ^a	77,78% ^a
C centralny	54,86 ^a	346,04 ^b	178,79 ^a	7,96% ^a	58,62% ^a
PD-W południowo- wschodni	74,29 ^a	316,97 ^a	181,29 ^a	7,46% ^a	42,86% ^a
p-value	0,157	<0,001	0,813	0,054	0,506

*Litery obok średnich określają istotne różnice między poszczególnymi średnimi na podstawie procedury Tukeya. Jeśli obok średnich nie ma tej samej litery, to takie średnie różnią się istotnie od siebie.

Na podstawie współczynnika korelacji Pearsona w kilku przypadkach otrzymano statystycznie istotną zależność ($p < 0,05$) (kolor czerwony).

Poniższa tabela (**Tab. 22**) przedstawia współczynnik korelacji Pearsona między różnymi cechami związanymi z zapaleniem wątroby typu E ptaków, a Europejskim Wskaźnikiem Wydajności. Najsilniejszą korelację odnotowano między EWW, a średnim mianem geometrycznym w 2014 roku i wyniosła ona –0,352, kolejną co do siły korelacją była zależność między tymi dwoma parametrami w 2010 roku i wyniosła 0,300. W obu tych przypadkach możemy mówić o słabej lub ewentualnie umiarkowanej korelacji. W przypadku pozostałych parametrów nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie korelacji.

Tab. 22. Współczynnik korelacji Persona między Gmean, procentem surowic i stad pozytywnych oraz CV, a EWW.

	EWW (Europejski Wskaźniki Wydajności)			
	2010	2014	2019	lata razem
Gmean (średnia)	0,300	-0,352	0,136	-0,166
%POS (surowic)	0,168	-0,131	0,194	-0,043
%POS (stad)	-0,139	0,009	0,192	-0,035
%CV (średnia)	0,169	-0,131	0,194	-0,043

*Korelacja Persona przedziały: 0-0,3 słaba korelacja, 0,3-0,5 umiarkowana korelacja, 0,5-0,7 silna korelacja, 0,7-1 bardzo silna korelacja.

1.4. Zestawienie wyników badań ELISA w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków w wybranych stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnych i pochodzących od nich stad broilerów w 2014 roku

Przeprowadzono badania w 6 wybranych stadach rodzicielskich w różnym wieku (29 – 48 tygodni) oraz w 6 stadach broilerów pochodzących z tych stad rodzicielskich z 2014 roku. W tabeli (**Tab. 23**) przedstawiono wyniki dla poszczególnych par stad (stada rodzicielskiego i pochodzącego od niego stada brojlerów rzeźnych). We wszystkich stadach BB otrzymano wyniki pozytywne w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków, natomiast 2 stada CB z 6 były pozytywne w 1 dnia życia.

Tab. 23. Zestawienie wyników ELISA dla anty-aHEV stad BB i pochodzących od nich stad CB w 2014 roku.

Wiek ptaków (tyg.)	N	Gmean	%CV	Ilość surowic pozytywnych	Procent surowic pozytywnych	Min	Max
CB (B30) woj. zachodnio-pomorskie EWW: b.d. – BB (H03)							
1 dzień	23	48	69%	0	0,00%	1	217
29	23	353	80%	9	39,13%	115	1 396
CB (B21) woj. opolskie EWW: 339 – BB (H07)							
1 dzień	23	89	113%	1	4,35%	1	776
36	23	156	101%	3	13,04%	10	1 083
CB (B23) woj. podkarpackie EWW: 301,55 – BB (H12)							
1 dzień	23	103	57%	0	0,00%	45	308
42	23	551	137%	11	47,83%	141	4 822
CB (B22) woj. lubelskie EWW: 320 – BB (H13)							
1 dzień	23	82	50%	0	0,00%	16	213
43	23	787	95%	18	78,26%	203	4 606
CB (B26) woj. pomorskie EWW: 296,65 – BB (H14)							
1 dzień	23	144	72%	2	8,70%	67	602
45	23	63	148%	3	13,04%	1	1 201

Wyniki

CB (B03) woj. pomorskie EWW: 313 – BB (H15)							
1 dzień	23	63	55%	0	0,00%	1	174
48	23	306	60%	9	39,13%	33	970

Szczegółowe wyniki dla poszczególnych stad zamieszczono w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 51** – stada rodzicielskie oznaczone jako: H03, H07, H12, H13, H14 i H15 oraz **Tab. 52** – stada brojlerów kurzych oznaczone jako: B03, B21, B22, B23, B26 i B30.

2. Wyniki badań molekularnych przeprowadzonych w celu wykrycia obecności materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E u kur

2.1. Wyniki badań molekularnych dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w tkankach oraz żółci w wybranych stadach rodzicielskich kurcząt rzeźnych i stadach niosek towarowych w Polsce w latach 2011 – 2019

RT-PCR dla genu kodującego helikazę

Spośród zbadanych 519 próbek (143 po spulowaniu) pochodzących od 48 stad (45 stad BB i 3 CL) w 21,68% przypadkach uzyskano wyniki pozytywne dla genu kodującego helikazę aHEV. Największy odsetek próbek pozytywnych uzyskano dla ściany pęcherzyka żółciowego (33,33%), następnie żółci (29,54%), śledziona (18,18%) oraz wątroby (15,28%).

W **Tab. 24** podano zestawienie liczbowe z podziałem na poszczególne lata oraz typy produkcyjne.

Wyniki poszczególnych przebadanych próbek od stad BB i CL w latach 2011 – 2019 umieszczono w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 53**.

Tab. 24. Zestawienie zbiorcze wyników badań RT-PCR w kierunku występowania genu kodującego helikazę w stadach BB i CL w latach 2011 – 2019.

Lp.	Rok	Typ produkcyjny (ilość stad)	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki			
			Pęcherzyk żółciowy	Żółć	Śledziona	Wątroba
1	2011	BB, CL (3)	1/2	1/2	-	0/2
		BB (2)	1/2	1/2	-	0/1
		CL (1)	-	-	-	0/1
2	2012	BB (3)	1/3	2/3	0/3	1/3
3	2013	BB (3)	0/3	0/3	2/3	0/3
4	2014	BB (3)	-	3/3	0/3	2/3
5	2015	BB, CL (11)	-	0/9	1/11	0/11
		BB (10)	-	0/8	1/10	0/10

Wyniki

		CL (1)	-	0/1	0/1	0/1
6	2016	BB (1)	-	0/1	0/1	0/1
7	2017	BB, CL (11)	1/1	5/11	5/11	2/11
		BB (10)	1/1	4/10	5/10	2/10
		CL (1)	-	1/1	0/1	0/1
8	2018	BB (12)	-	2/11	0/11	1/11
9	2019	BB (1)	-	0/1	0/1	1/1
Suma: 31/143 (21,68%)			3/9 (33,33%)	13/44 (29,54%)	8/44 (18,18%)	7/46 (15,28%)

W **Tab. 25** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań RT-PCR wykazujące procent (%) pozytywnych wyników w kierunku genu kodującego helikazę z podziałem na poszczególne lata. Na podstawie testu chi-kwadrat stwierdzono, że występuje statystycznie istotne zróżnicowanie ($p = 0,003$) między latami pod względem % pozytywnych wyników RT-PCR. Natomiast na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana ($r = -0,086$, $p = 0,306$) nie stwierdzono istotnego statystycznie trendu w kolejnych latach.

Tab. 25. Zestawienie zbiorcze procenta (%) wyników pozytywnych badań RT-PCR w dla genu kodującego helikazę w stadach BB i CL w poszczególnych latach.

Lp.	Rok	Procent (%) wyników pozytywnych	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki
1	2011	33,33%	2/6
2	2012	33,33%	4/12
3	2013	16,67%	2/12
4	2014	55,56%	5/9
5	2015	3,23%	1/31
6	2016	0,00%	0/3
7	2017	38,24%	13/34
8	2018	9,09%	3/33
9	2019	33,33%	1/3

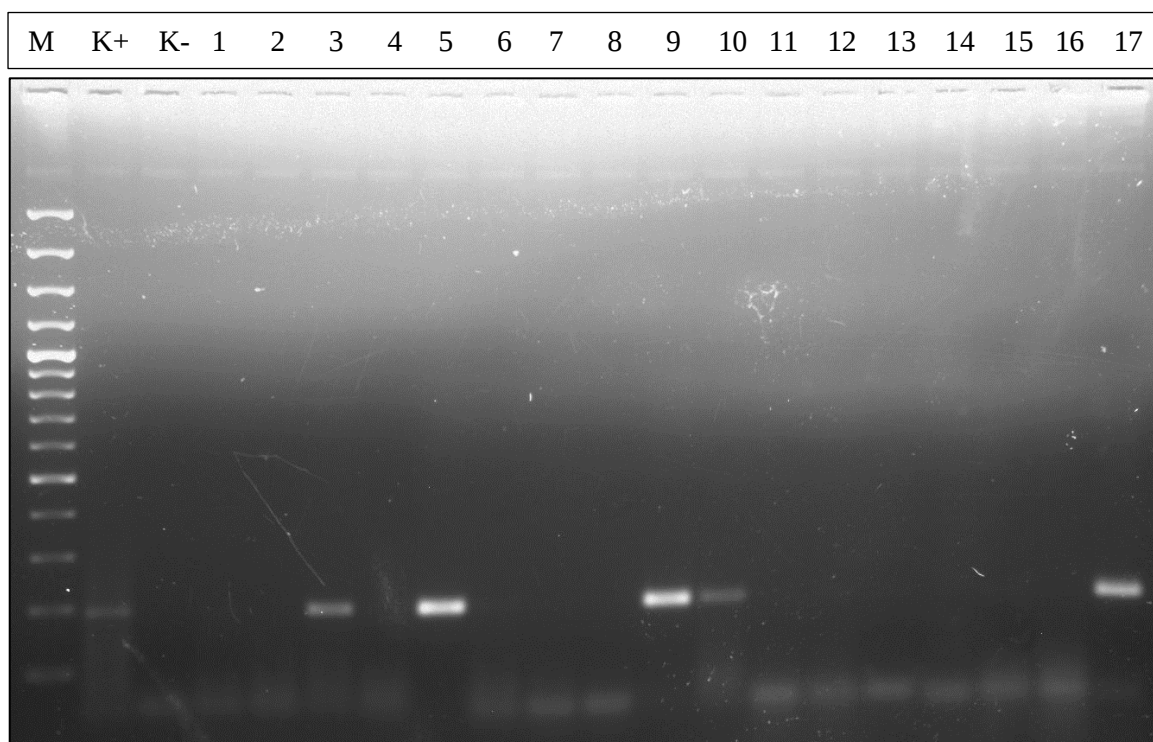
W **Tab. 26** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań RT-PCR w kierunku występowania genu kodującego helikazę z podziałem na wiek stada. Na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana ($r = 0,101$, $p = 0,234$) nie stwierdza się istotnego statystycznie trendu zależnego od wieku.

Wyniki

Tab. 26. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego helikazę w stadach BB i CL według wieku stada.

Lp.	Wiek stada w tygodniach	Procent (%) wyników pozytywnych	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki
1	20	0,00%	0/3
2	22	0,00%	0/4
3	26	33,33%	1/3
4	27	33,33%	1/3
5	28	0,00%	0/3
6	30	13,33%	2/15
7	31	50,00%	2/4
8	34	13,33%	2/15
9	35	11,11%	1/9
10	36	66,67%	2/3
11	37	66,67%	2/3
12	38	0,00%	0/3
13	40	0,00%	0/8
14	41	30,00%	6/20
15	43	75,00%	3/4
16	44	11,11%	1/9
17	46	28,57%	2/7
18	48	66,67%	4/6
19	50	0,00%	0/3
20	55	0,00%	0/3
21	56	0,00%	0/6
22	59	66,67%	2/3
23	61	0,00%	0/3

Na **Ryc. 10** przedstawiono przykładowy wynik elektroforezy w żelu agarozowym. Uwidocznione prążki na wysokości 186 pz odpowiadają wielkości produktu poszukiwanego genu kodującego helikazę. Na tej wysokości stwierdzono obecność prążka przy K⁺, 3, 5, 9, 10 i 17, co odpowiada wynikom pozytywnym odpowiednio dla: kontroli pozytywnej, 034W, 034Ż, 035Ż, 035WŻ oraz 037Ż. Wszystkie badane próbki były w ten sposób uwidaczniane, wyniki poszczególnych próbek można znaleźć w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 53**.



Ryc. 10. Przykładowy wynik elektroforezy w żelu agarozowym z uwidocznionymi prążkami na wysokości 186 pz, odpowiadającymi wielkości produktu poszukiwanego genu kodującego helikazę.

M – marker 100 pz; K+ – kontrola pozytywna; K- – kontrola negatywna; 1 – 032W; 2 – 033W; 3 – 034W; 4 – 034Ś; 5 – 034Ż; 6 – 034WŻ; 7 – 035W; 8 – 035Ś; 9 – 035Ż; 10 – 035WŻ; 11 – 036W; 12 – 036Ś; 13 – 036Ż; 14 – 036WŻ; 15 – 037W; 16 – 037Ś; 17 – 037Ż.

RT-PCR w celu wykrycia genu kodującego białko kapsydu

Spośród zbadanych 519 próbek (143 po spulowaniu) pochodzących od 48 stad (45 stad BB i 3 CL) uzyskano wyniki pozytywne w kierunku genu kodującego białko kapsydu aHEV w 30,07% przypadkach przy wykorzystaniu metody RT-PCR. Najwyższy odsetek próbek pozytywnych otrzymano dla próbek ze ściany pęcherzyka żółciowego (66,67%), następnie wątroby (34,78%), żółci (29,54%) oraz śledziony (18,18%).

W **Tab. 27** podano zestawienie liczbowe z podziałem na poszczególne lata oraz typy produkcyjne. Wyniki poszczególnych przebadanych próbek od stad BB i CL w latach 2011 – 2019 umieszczono w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 54**.

Wyniki

Tab. 27. Zestawienie zbiorcze wyników badań RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w latach 2011 – 2019.

Lp.	Rok	Typ produkcyjny (ilość stad)	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki			
			Pęcherzyk żółciowy	Żółć	Śledziona	Wątroba
1	2011	BB, CL (3)	2/2	1/2	-	1/2
		BB (2)	2/2	1/2	-	1/1
		CL (1)	-	-	-	0/1
2	2012	BB (3)	3/3	3/3	0/3	3/3
3	2013	BB (3)	0/3	0/3	0/3	0/3
4	2014	BB (3)	-	1/3	2/3	3/3
5	2015	BB, CL (11)	-	2/9	1/11	3/11
		BB (10)	-	2/8	1/10	3/10
		CL (1)	-	0/1	0/1	0/1
6	2016	BB (1)	-	1/1	0/1	0/1
7	2017	BB, CL (11)	1/1	3/11	3/11	3/11
		BB (10)	1/1	3/10	3/10	3/10
		CL (1)	-	0/1	0/1	0/1
8	2018	BB (12)	-	2/11	2/11	3/11
9	2019	BB (1)	-	0/1	0/1	0/1
Suma: 43/143 (30,07%)			6/9 (66,67%)	13/44 (29,54%)	8/44 (18,18%)	16/46 (34,78%)

W **Tab. 28** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań RT-PCR w kierunku obecności genu kodującego białko kapsydu z podziałem na poszczególne lata. Na podstawie testu chi-kwadrat wykazano istotne zróżnicowanie ($p = 0,0002$) między latami pod względem odsetka wyników pozytywnych w RT-PCR. Dodatkowo na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana ($r = -0,220$, $p = 0,008$) stwierdzono istotny trend w kolejnych latach. Trend jest ujemny, czyli występuje tendencja spadkowa udziału prób pozytywnych.

Tab. 28. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w poszczególnych latach.

Lp.	Rok	Procent (%) wyników pozytywnych	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki
1	2011	66,67%	4/6
2	2012	75,00%	9/12
3	2013	0,00%	0/12
4	2014	66,67%	6/9
5	2015	19,35%	6/31
6	2016	33,33%	1/3
7	2017	29,41%	10/34
8	2018	21,21%	7/33
9	2019	0,00%	0/3

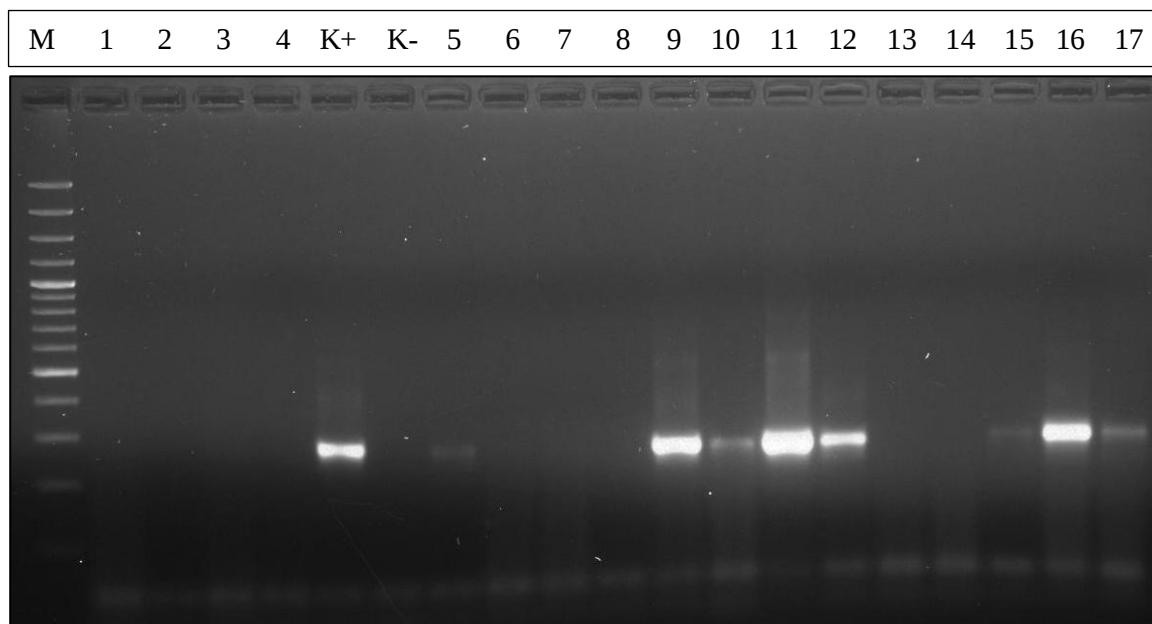
Wyniki

W **Tab. 29** zostały przedstawione wyniki zbiorcze RT-PCR w kierunku genu kodującego białko kapsydu z podziałem na wiek stada. Na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana ($r = 0,095$, $p = 0,264$) nie stwierdza się istotnego statystycznie trendu zależnego od wieku.

Tab. 29. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL z podziałem według wieku stad.

Lp.	Wiek stada w tygodniach	Procent (%) wyników pozytywnych	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki
1	20	0,00%	0/3
2	22	0,00%	0/4
3	26	0,00%	0/3
4	27	66,67%	2/3
5	28	66,67%	2/3
6	30	0,00%	0/15
7	31	75,00%	3/4
8	34	6,67%	1/15
9	35	11,11%	1/9
10	36	100,00%	3/3
11	37	100,00%	3/3
12	38	66,67%	2/3
13	40	12,50%	1/8
14	41	60,00%	12/20
15	43	100,00%	4/4
16	44	33,33%	3/9
17	46	42,86%	3/7
18	48	50,00%	3/6
19	50	0,00%	0/3
20	55	0,00%	0/3
21	56	0,00%	0/6
22	59	0,00%	0/3
23	61	0,00%	0/3

Na **Ryc. 11** przedstawiono przykładowy wynik elektroforezy na żelu agarozowym. Uwidocznione prążki na wysokości 280 pz odpowiadają wielkości produktu poszukiwanego genu kodującego białko kapsydu. Na tej wysokości stwierdzono obecność prążka przy K+, 5, 9, 10, 11, 12, 15, 16 oraz 17 co odpowiada wynikom pozytywnym dla odpowiednio: kontroli pozytywnej, 015Ż, 018W, 018Ś, 018Ż, 018WŻ, 019Ż, 020W oraz 020Ś. Wszystkie badane próbki były w ten sposób uwidaczniane, wyniki poszczególnych próbek można znaleźć w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 54**.



Ryc. 11. Przykładowy wynik elektroforezy w żelu agarozowym z uwidocznionymi prążkami na wysokości 280 pz, odpowiadającymi wielkości produktu poszukiwanego genu kodującego białko kapsydu.

M – marker 100 pz; 1 – 014Ś; 2 – 014Ż; 3 – 015W; 4 – 015Ś; K+ – kontrola pozytywna; K- – kontrola negatywna; 5 – 015Ż; 6 – 017W; 7 – 017Ś; 8 – 017Ż; 9 – 018W; 10 – 018Ś; 11 – 018Ż; 12 – 018WŻ; 13 – 019W; 14 – 019Ś; 15 – 019Ż; 16 – 020W; 17 – 020Ś.

Real-Time RT-PCR w celu wykrycia genu kodującego białko kapsydu

Spośród przebadanych 519 próbek (143 po spulowaniu) pochodzących od 48 stad (45 stad BB i 3 CL) w 32,87% uzyskano wyniki pozytywne w kierunku genu kodującego białko kapsydu aHEV przy wykorzystaniu metody Real-Time RT-PCR. Najwyższy odsetek próbek pozytywnych otrzymano w próbkach ze ściany pęcherzyka żółciowego (66,67%), następnie wątroby (34,78%), żółci (34,09%) oraz śledziony (22,73%).

W **Tab. 30** podano zestawienie liczbowe z podziałem na poszczególne lata oraz typy produkcyjne. Wyniki poszczególnych zbadanych próbek od stad BB i CL w latach 2011 – 2019 umieszczono w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 54**.

Tab. 30. Zestawienie zbiorcze wyników badań Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w latach 2011 – 2019.

Lp.	Rok	Typ produkcyjny (ilość stad)	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki			
			Pęcherzyk żółciowy	Żółć	Śledziona	Wątroba
1	2011	BB, CL (3)	2/2	2/2	-	1/2
		BB (2)	2/2	2/2	-	1/1
		CL (1)	-	-	-	0/1
2	2012	BB (3)	3/3	3/3	1/3	3/3
3	2013	BB (3)	0/3	0/3	0/3	0/3
4	2014	BB (3)	-	1/3	2/3	2/3
5	2015	BB, CL (11)	-	1/9	1/11	3/11
		BB (10)	-	1/8	1/10	3/10
		CL (1)	-	0/1	0/1	0/1
6	2016	BB (1)	-	1/1	0/1	0/1
7	2017	BB, CL (11)	1/1	3/11	3/11	3/11
		BB (10)	1/1	3/10	3/10	3/10
		CL (1)	-	0/1	0/1	0/1
8	2018	BB (12)	-	4/11	3/11	4/11
9	2019	BB (1)	-	0/1	0/1	0/1
Suma: 47/143 (32,87%)			6/9 (66,67%)	15/44 (34,09%)	10/44 (22,73%)	16/46 (34,78%)

W **Tab. 31** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań Real-Time RT-PCR w kierunku genu kodującego białko kapsydu z podziałem na poszczególne lata. Na podstawie testu chi-kwadrat stwierdzono istotne zróżnicowanie ($p = 0,0001$) między latami pod względem odsetka wyników pozytywnych w Real-Time RT-PCR. Dodatkowo na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana ($r = -0,166$, $p = 0,048$) stwierdzono istotny statystycznie trend w kolejnych latach. Trend jest ujemny, czyli występuje tendencja spadkowa udziału próbek pozytywnych.

Tab. 31. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w poszczególnych latach.

Lp.	Rok	Procent (%) wyników pozytywnych	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki
1	2011	83,33%	5/6
2	2012	83,33%	10/12
3	2013	0,00%	0/12
4	2014	55,56%	5/9
5	2015	16,13%	5/31
6	2016	33,33%	1/3
7	2017	29,41%	10/34
8	2018	33,33%	11/33
9	2019	0,00%	0/3

Wyniki

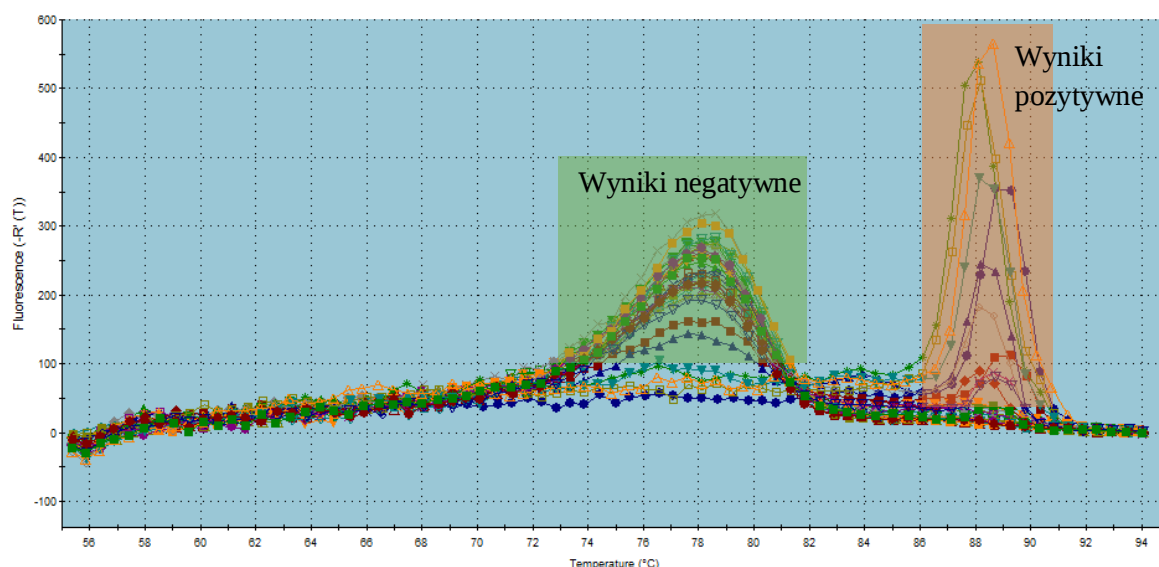
W **Tab. 32** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań Real-Time RT-PCR w kierunku występowania genu kodującego białko kapsydu z podziałem na wiek. Na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana ($r = 0,064$, $p = 0,450$) nie stwierdzono istotnego statystycznie trendu zależnego od wieku.

Tab. 32. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL z podziałem według wieku.

Lp.	Wiek stada w tygodniach	Procent (%) wyników pozytywnych	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki
1	20	0,00%	0/3
2	22	0,00%	0/4
3	26	0,00%	0/3
4	27	66,67%	2/3
5	28	66,67%	2/3
6	30	6,67%	1/15
7	31	75,00%	3/4
8	34	6,67%	1/15
9	35	11,11%	1/9
10	36	100,00%	3/3
11	37	100,00%	3/3
12	38	100,00%	3/3
13	40	25,00%	2/8
14	41	75,00%	15/20
15	43	100,00%	4/4
16	44	11,11%	1/9
17	46	57,14%	4/7
18	48	33,33%	2/6
19	50	0,00%	0/3
20	55	0,00%	0/3
21	56	0,00%	0/6
22	59	0,00%	0/3
23	61	0,00%	0/3

Na **Ryc. 12** przedstawiono przykładowy wynik Real-Time RT-PCR w celu wykrycia genu kodującego białko kapsydu. Wszystkie badane próbki były w ten sposób uwidaczniane, wyniki poszczególnych próbek można znaleźć w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 54**.

Wyniki



Ryc. 12. Przykładowy wykres krzywej topnienia w badaniach Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu.

Wyniki pozytywne dla próbek: K+(1:1), K+(1:10), 043W, 043Ś, 044W, 044Ś, 044Ż, 045W, 045Ś, 045Ż, 046W, 046Ż.

Wyniki negatywne dla próbek: K+(1:100), K+(1:1.000), K+(1:10.000), K+(1:100.000), K+(1:1.000.000), K-, 037W, 037Ś, 037, 038W, 038Ś, 038Ż, 039W, 039Ś, 039Ż, 040Ż, 041W, 041Ś, 041Ż, 042W, 042Ś, 042Ż, 046Ś.

Ocena zgodności metod RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR w badaniu obecności genu kodującego białko kapsydu

W celu określania zgodności między wynikami pozytywnymi w metodach RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR wykorzystano współczynnik kappa Cohena. W **Tab. 33** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań. Odnotowano 133 zgodne wyniki w obu testach (93,01%). Współczynnik kappa Cohena wyniósł 0,838, co oznacza bardzo dobrą zgodność, z 95% przedziałem ufności (CI – confidence interval) od 0,742, do 0,934, zaś błąd standardowy (SE – standard error) wyniósł 0,049.

Tab. 33. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych w RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w próbkach tkanek i żółci pochodzących od stad BB i CL w latach 2011 – 2019.

Ilość wyników (n)	Wyniki w Real-Time RT-PCR	
	negatywny	pozytywny
Wyniki w RT-PCR		
negatywny	93	7
pozytywny	3	40

Ocena zgodności metod RT-PCR w badaniu obecności genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu

W celu określania zgodności między wynikami pozytywnymi w testach RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu wykorzystano współczynnik kappa Cohena. W **Tab. 34** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań. Stwierdzono 107 zgodnych wyników w obu testach (74,83%). Współczynnik kappa Cohena wyniósł 0,350, co świadczy o słabej zgodności metod, z 95% CI od 0,181 do 0,518 oraz SE 0,086.

Tab. 34. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych w RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w próbkach tkanek i żółci pochodzących od stad BB i CL w latach 2011 – 2019.

Ilość wyników (n)	Wyniki w RT-PCR (kapsyd)	
Wyniki w RT-PCR (helikaza)	negatywny	pozytywny
negatywny	88	24
pozytywny	12	19

2.2. Wyniki badań molekularnych w kierunku genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w zarodkach kurzych zakażonych materiałem tkankowym z roku 2013.

Spośród 8 zakażonych zarodków zmarło 25% (2/8): zarodek nr 1 w 15 dobie (10 dpi) oraz zarodek nr 7 w 16 dobie inkubacji (11 dpi). Do końca doświadczenia (18 di) przeżyło 7 zarodków (6 zakażonych oraz kontrola negatywna). Z 18 próbek pochodzących od 9 zarodków badanych w kierunku genu kodującego helikazę (przy użyciu RT-PCR) oraz białko kapsydu (przy użyciu RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR), w 11,11% próbkach (2/18) otrzymano wyniki pozytywne jedynie dla genu kodującego białko kapsydu aHEV przy wykorzystaniu Real-Time RT-PCR. Próbkę pozytywną pochodziły od tego samego zarodka oznaczonego jako Z2 (próbki Z2W oraz Z2WŻ).

W **Tab. 35** podano zestawienie liczbowe z podziałem na rodzaj materiału badanego oraz kierunek badania. Wyniki z poszczególnych próbek umieszczono w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 54**.

Tab. 35. Zestawienie zbiorcze wyników badań w kierunku genu kodującego helikazę (przy użyciu RT-PCR) oraz białko kapsydu (przy użyciu RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR) u zakażonych zarodków kurzych.

Wyniki

Rodzaj badanego materiału	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki		
	Helikaza (RT-PCR)	Kapsyd (RT-PCR)	Kapsyd (Real-Time RT-PCR)
Wątroba	0/9	0/9	1/9
Pęcherzyk żółciowy	0/9	0/9	1/9

W celu określania zgodności między wynikami pozytywnymi w testach RT-PCR i Real-Time RT-PCR wykorzystano współczynnik kappa Cohena. W **Tab. 36** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań, zaobserwowano 16 zgodnych wyników w obu testach (88,89%). Nie dało się policzyć współczynnika kappa Cohena, gdyż nie było, żadnych wyników pozytywnych dla metody RT-PCR.

Tab. 36. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych metodą RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w tkankach pochodzących od zakażonych wirusem aHEV zarodków kurzych.

Ilość wyników (n)	Wyniki w Real-Time RT-PCR	
Wyniki w RT-PCR	negatywny	pozytywny
negatywny	16	2
pozytywny	0	0

W celu określania zgodności między wynikami pozytywnymi w RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz w RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu wykorzystano współczynnik kappa Cohena. W **Tab. 37** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań. Odnotowano 18 zgodnych wyników w obu testach (100%). Ze względu na brak wyników pozytywnych nie można było określić współczynnika kappa Cohena.

Tab. 37. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w tkankach od zarodków kurzych zakażonych wirusem aHEV.

Ilość wyników (n)	Wyniki w RT-PCR (kapsyd)	
Wyniki w RT-PCR (helikaza)	negatywny	pozytywny
negatywny	18	0
pozytywny	0	0

2.3. Wyniki badań molekularnych przeprowadzonych w celu wykrycia genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w wymazach pochodzących z ogniska BLS

Zbadano 14 próbek pochodzących ze stada BB w wieku 41 tygodni. Badania przeprowadzono dla genu kodującego helikazę (przy użyciu RT-PCR) oraz białko kapsydu

(przy użyciu RT-PCR). Wyniki pozytywne w kierunku genu kodującego helikazę aHEV otrzymano dla 14,28% (2/14) próbek, natomiast w kierunku genu kodującego białko kapsydu aHEV dla 7,14% (1/14) próbek.

W **Tab. 38** podano zestawienie liczbowe z podziałem na rodzaj materiału badanego oraz kierunek badania. Wyniki poszczególnych przebadanych próbek umieszczono w załączniku (rozdział VII) w **Tab. 53** i **Tab. 54**.

Tab. 38. Zestawienie zbiorcze wyników RT-PCR w kierunku genu kodującego helikazę oraz białko kapsydu w wymazach z kloaki i tchawicy od kur pochodzących z ogniska BLS w 2012 r.

Rodzaj badanego materiału	Ilość wyników pozytywnych/wszystkie badane próbki	
	Helikaza (RT-PCR)	Kapsyd (RT-PCR)
Wymazy z kloaki	2/7	0/7
Wymazy z tchawicy	0/7	1/7

W celu określania zgodności między wynikami pozytywnymi metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz metodą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu wykorzystano współczynnik kappa Cohena. W **Tab. 39** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań. Stwierdzono 11 zgodnych wyników w obu testach (78,57%). Współczynnik kappa Cohena wyniósł $-0,105$, co odpowiada za brak zgodność, z 95% CI między $-0,255$, a $0,044$, zaś błąd standardowy (SE) wyniósł $0,076$.

Tab. 39. Zestawienie wyników pozytywnych w RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w wymazach z kloaki i tchawicy od kur pochodzących z ogniska BLS w 2012 r.

Ilość wyników (n)	Wyniki w RT-PCR (kapsyd)	
Wyniki w RT-PCR (helikaza)	negatywny	pozytywny
negatywny	11	1
pozytywny	2	0

2.4. Zgodność metod RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu – dla całości materiału badanego

W celu określania zgodności między wynikami pozytywnymi metodą RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR wykorzystano współczynnik kappa Cohena. W **Tab. 40** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań. Stwierdzono 149 zgodnych wyników w obu testach (92,55%). Współczynnik kappa Cohena wyniósł $0,818$, co odpowiada za bardzo dobrą zgodność, z 95% CI między $0,719$, a $0,916$, zaś błąd standardowy (SE) wyniósł $0,050$.

Tab. 40. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych metodą RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w tkankach i żółci pochodzących od stad BB i CL w latach 2011 – 2019 oraz od zakażonych zarodków kurzych (materiałem z roku 2013 r.).

Ilość wyników (n)	Wyniki w Real-Time RT-PCR	
Wyniki w RT-PCR	negatywny	pozytywny
negatywny	109	9
pozytywny	3	40

2.5. Zgodność metod RT-PCR w celu wykrycia genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu – dla całości materiału badanego

W celu określania zgodności między wynikami pozytywnymi metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz metodą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu wykorzystano współczynnik kappa Cohena. W **Tab. 41** zostały przedstawione wyniki zbiorcze badań. Odnotowano 135 zgodnych wyników w obu testach (77,71%). Współczynnik kappa Cohena wyniósł 0,354, co odpowiada za słabą zgodność, z 95% CI między 0,193, a 0,516, zaś błąd standardowy (SE) wyniósł 0,082.

Tab. 41. Zestawienie wyników pozytywnych w RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w próbkach z tkanek i żółci pochodzących od stad BB i CL w latach 2011-2019, od zakażonych zarodków kurzych (materiałem tkankowym z 2013) oraz w wymazach z kloaki i tchawicy od kur z ogniska BLS w 2012 r.

Ilość wyników (n)	Wyniki w RT-PCR (kapsyd)	
Wyniki w RT-PCR (helikaza)	negatywny	pozytywny
negatywny	117	25
pozytywny	14	19

2.6. Wyniki badań molekularnych w zależności od użytego materiału badawczego

W celu określania wpływu rodzaju badanej tkanki na uzyskanie wyników pozytywnych w przypadku badań w kierunku wykrycia genu kodującego helikazę (przy użyciu metody RT-PCR) oraz białko kapsydu (przy użyciu metody RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR) wykorzystano test chi-kwadrat Pearsona. W **Tab. 42**, **Tab. 43** oraz **Tab. 44** przedstawiono wyniki dla poszczególnych grup. Na podstawie testu chi-kwadrat stwierdzono statystycznie istotną zależność ($p = 0,027$) między rodzajem badanej tkanki,

Wyniki

a odsetkiem wyników pozytywnych jedynie w przypadku badań metodą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (**Tab. 43**) w próbkach tkanek oraz żółci z wybranych stad BB i CL w Polsce w latach 2011 – 2019.

Tab. 42. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego helikazę w zależności od rodzaju badanego materiału.

Rodzaj badanego materiału	Procent (%) wyników pozytywnych		
	Tkanki oraz żółć	Zarodki	Wymazy
pęcherzyk żółciowy	33,3%	0,0%	-
śledziona	18,2%	-	-
wątroba	15,2%	0,0%	-
wymazy z kloaki	-	-	28,6%
wymazy z tchawicy	-	-	0,0%
żółć	29,5%	-	-
Wartości p – test chi-kwadrat	0,127	1,000	0,127

Tab. 43. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w zależności od rodzaju badanego materiału.

Rodzaj badanego materiału	Procent (%) wyników pozytywnych		
	Tkanki oraz żółć	Zarodki	Wymazy
pęcherzyk żółciowy	66,7%	0,0%	-
śledziona	18,2%	-	-
wątroba	34,8%	0,0%	-
wymazy z kloaki	-	-	0,0%
wymazy z tchawicy	-	-	14,3%
żółć	29,5%	-	-
Wartości p – test chi-kwadrat	0,027	1,000	0,299

Tab. 44. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w zależności od rodzaju badanego materiału.

Rodzaj badanego materiału	Procent (%) wyników pozytywnych		
	Tkanki oraz żółć	Zarodki	Wymazy
pęcherzyk żółciowy	66,7%	11,1%	-
śledziona	22,7%	-	-
wątroba	34,8%	11,1%	-
wymazy z kloaki	-	-	-
wymazy z tchawicy	-	-	-
żółć	34,1%	-	-
Wartości p – test chi-kwadrat	0,078	1,000	-

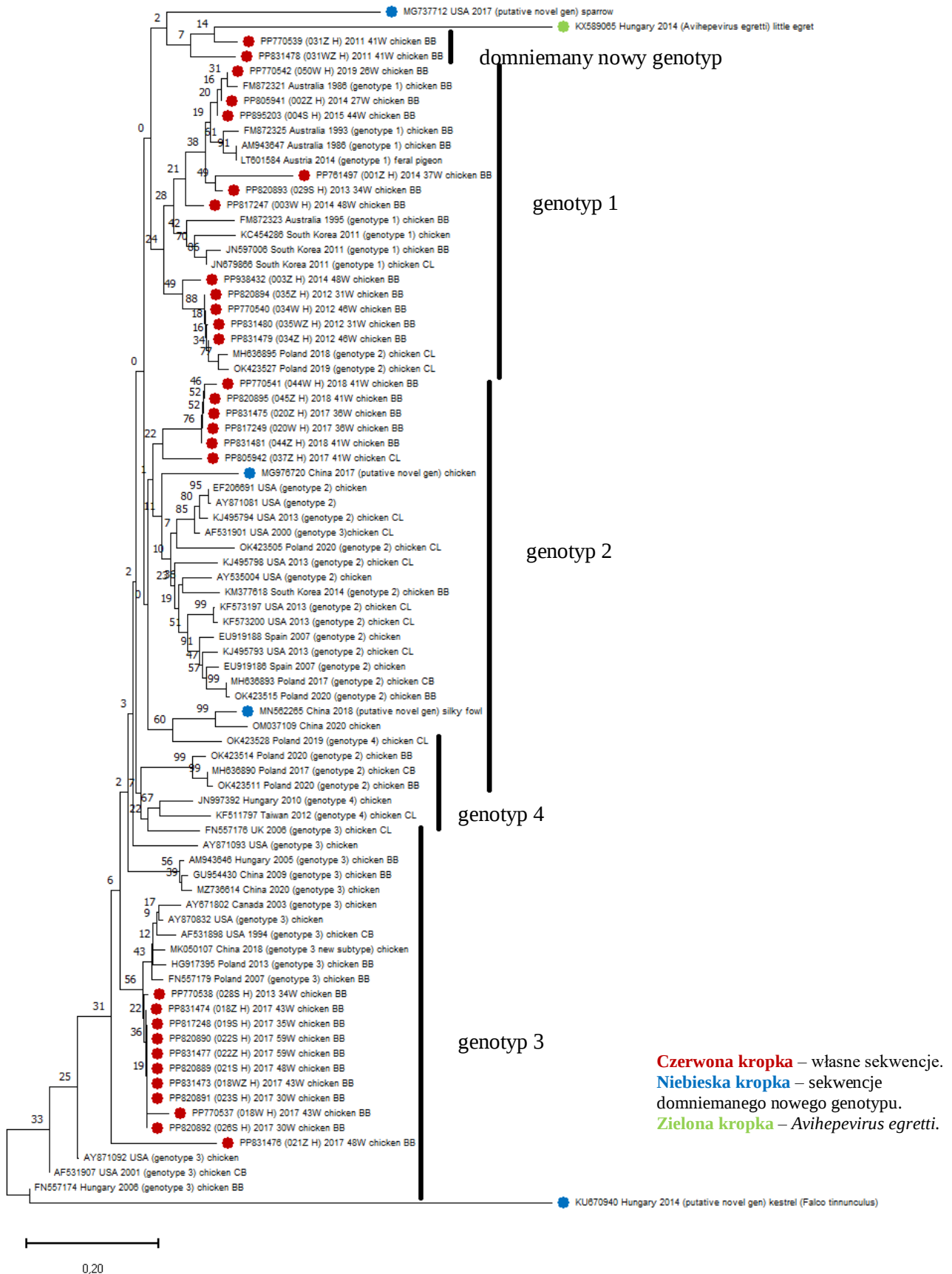
2.7. Analiza filogenetyczna

Sekwencjonowaniu poddano 31 próbek, które uzyskały wynik pozytywny w reakcji RT-PCR dla fragmentu genu kodującego helikazę oraz 52 próbki, które uzyskały wynik pozytywny w reakcji RT-PCR lub Real-Time RT-PCR dla fragmentu genu kodującego białko kapsydu.

Analizę sekwencji przeprowadzono za pomocą metody ClustalW i programu Mega 11 (wersja 11.0.13) oraz Genious Prime (wersja: 2019.2.3). Ryciny filogenetyczne wygenerowane metodą neighbour-joining z przy użyciu programu Mega 11. Przy węzłach zostały przedstawione wartości procentowe „bootstrap” dla 1000 powtórzeń.

Do pierwotnej analizy filogenetycznej względem fragmentu ORF1 aHEV, który koduje helikazę użyto 30 sekwencji własnych (numery akcesyjne w **Tab. 53**) oraz 98 sekwencji dostępnych w bazie GenBank (numery akcesyjne w **Tab. 55**). Następnie spośród sekwencji dostępnych w bazie GenBank (n=98) wybrano 51 sekwencji reprezentujących poszczególne klastry, w celu lepszej wizualizacji (**Ryc. 13**). Ostatecznie użyto 30 sekwencji własnych oraz 51 sekwencji dostępnych w bazie GenBank: 18 sekwencji pełnych lub prawie pełnych genomów aHEV oraz 33 sekwencje fragmentu genomu aHEV kodującego helikazę (ORF1) pochodzących od ptaków z różnych lat, rejonów geograficznych i przypisanych do różnych genotypów. Sekwencje własne zostały oznaczone czerwoną kropką. Niebieską kropką – sekwencje domniemanego nowego genotypu, zieloną kropką – *Avihepevirus egretti*.

Wyniki



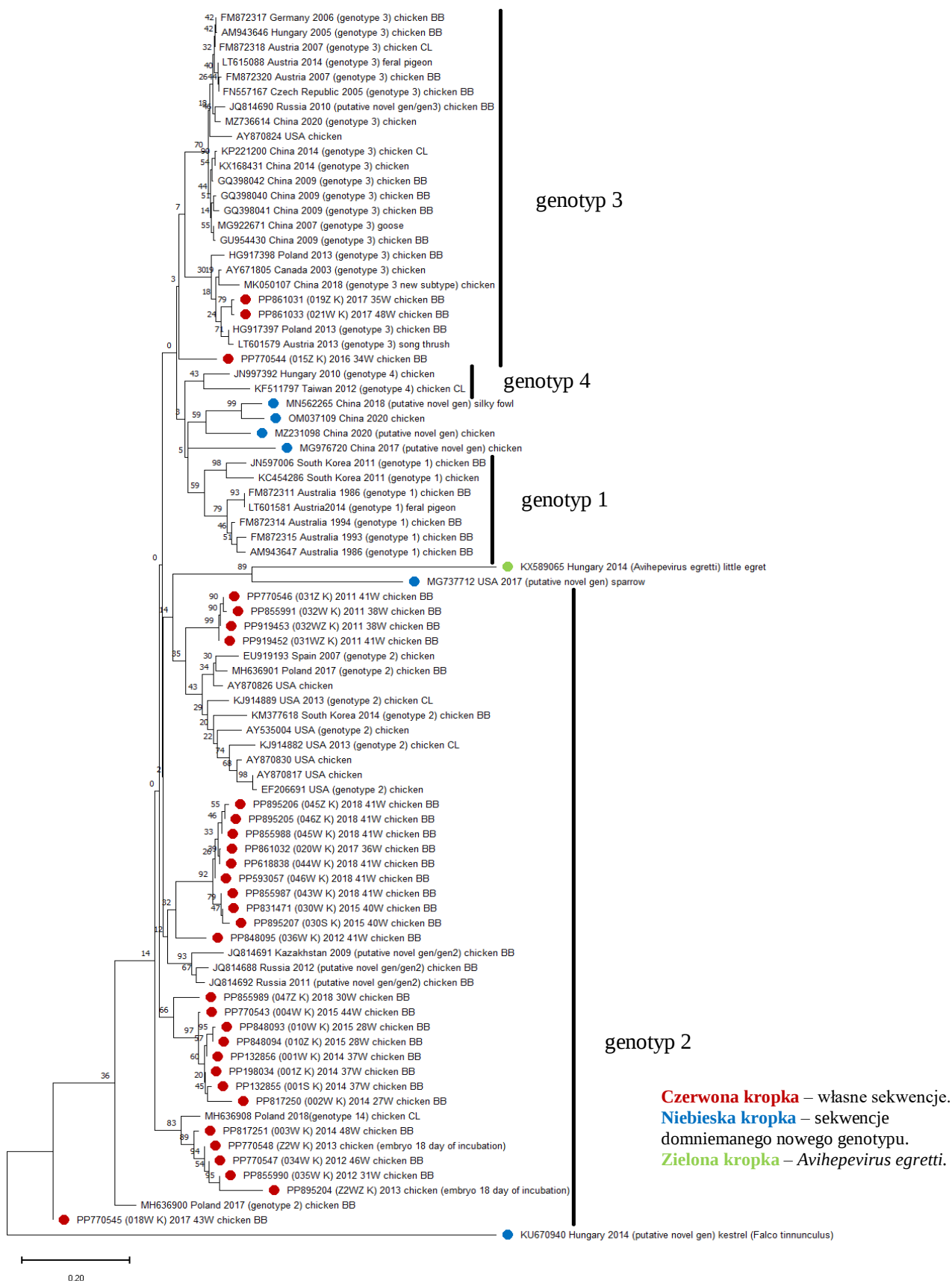
Ryc. 13. Analiza filogenetyczna na podstawie własnych sekwencji nukleotydów kodujących helikazę (fragment ORF1) aHEV oraz izolatów zdeponowanych w GenBank.

Wyniki

Analiza filogenetyczna oparta o fragment genu kodującego helikazę wykazała przynależność otrzymanych sekwencji do trzech znanych genotypów: genotyp 1 (11 uzyskanych sekwencji), genotyp 3 (11 sekwencji), genotyp 2 (6 sekwencji), zaś pozostałe 2 sekwencje nie przynależą do żadnego z czterech znanych genotypów (domniemany nowy genotyp).

Do pierwotnej analizy filogenetycznej względem fragmentu ORF2 aHEV, który koduje białko kapsydu użyto 31 sekwencji własnych (numery akcesyjne w **Tab. 54**) oraz 62 sekwencji dostępnych w bazie GenBank (numery akcesyjne w **Tab. 55**). Następnie spośród sekwencji dostępnych w bazie GenBank (n=62) wybrano 52 sekwencje reprezentujące poszczególne klastry, w celu lepszej wizualizacji (**Ryc. 14**). Ostatecznie użyto 31 sekwencji własnych oraz 52 sekwencje dostępne w bazie GenBank: 18 sekwencji pełnych lub prawie pełnych genomów aHEV oraz 34 sekwencje fragmentu genomu aHEV kodujące białko kapsydu (ORF2) pochodzące od ptaków z różnych lat, rejonów geograficznych i przypisanych do różnych genotypów. Sekwencje własne zostały oznaczone czerwoną kropką. Niebieską kropką – sekwencje domniemanego nowego genotypu, zieloną kropką – *Avihepevirus egretti*.

Wyniki



Ryc. 14. Analiza filogenetyczna na podstawie własnych sekwencji nukleotydów kodujących białko kapsydu (ORF2) aHEV oraz izolatów zdeponowanych w GenBank.

Wyniki

Analiza filogenetyczna oparta o fragment genu kodującego białko kapsydu wykazała, że największa ilość uzyskanych sekwencji ($n = 28$) przynależy do genotypu 2, zaś pozostałe 3 sekwencje przynależą do genotypu 3.

3. Korelacja między wynikami badań serologicznych i molekularnych

W celu porównania uzyskanych wyników pozytywnych w badaniach serologicznych z badaniami molekularnymi w poszczególnych latach wykorzystano test chi-kwadrat Pearsona. W poniższych tabelach przedstawiono wyniki uwzględniające odsetek uzyskanych wyników pozytywnych w badaniach serologicznych dla poszczególnych surowic w porównaniu do wyników pozytywnych uzyskanych w badaniach molekularnych: RT-PCR dla genu kodującego helikazę (**Tab. 45**), RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (**Tab. 46**) oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (**Tab. 47**) w próbkach tkanek oraz żółci z wybranych stad BB i CL w Polsce z lat 2011 – 2019. Na podstawie testu chi-kwadrat w kilku przypadkach otrzymano statystycznie istotną zależność ($p < 0,05$) (kolor czerwony).

Tab. 45. Porównanie wyników ELISA (% surowic pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.

Rok	ELISA			Helikaza (RT-PCR)			P -test chi- kwadrat
	surowice pozytywne	surowice negatywne	% pozytywnych surowic	pozytywny	negatywny	% pozytywnych	
2010	87	371	19,0%	-	-	-	-
2011	254	524	32,6%	2	4	33,3%	0,972
2012	190	268	41,5%	4	8	33,3%	0,571
2013	206	254	44,8%	2	10	16,7%	0,053
2014	104	309	25,2%	5	4	55,6%	0,039
2015	65	327	16,6%	1	30	3,2%	0,049
2016	258	378	40,6%	0	3	0,0%	0,153
2017	229	668	25,5%	13	21	38,2%	0,097
2018	71	709	9,1%	3	30	9,1%	0,998
2019	-	-	-	1	2	33,3%	-

Wyniki

Tab. 46. Porównanie wyników ELISA (% surowic pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.

Rok	ELISA			Kapsyd (RT-PCR)			P -test chi-kwadrat
	surowice pozytywne	surowice negatywne	% pozytywnych surowic	pozytywny	negatywny	% pozytywnych	
2010	87	371	19,0%	-	-	-	-
2011	254	524	32,6%	4	2	66,7%	0,077
2012	190	268	41,5%	9	3	75,0%	0,020
2013	206	254	44,8%	0	12	0,0%	0,002
2014	104	309	25,2%	6	3	66,7%	0,005
2015	65	327	16,6%	6	25	19,4%	0,691
2016	258	378	40,6%	1	2	33,3%	0,799
2017	229	668	25,5%	10	24	29,4%	0,611
2018	71	709	9,1%	7	26	21,2%	0,021
2019	-	-	-	0	3	0,0%	-

Tab. 47. Porównanie wyników ELISA (% surowic pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.

Rok	ELISA			Kapsyd (Real-Time RT-PCR)			P -test chi-kwadrat
	surowice pozytywne	surowice negatywne	% pozytywnych surowic	pozytywny	negatywny	% pozytywnych	
2010	87	371	19,0%	-	-	-	-
2011	254	524	32,6%	5	1	83,3%	0,009
2012	190	268	41,5%	10	2	83,3%	0,004
2013	206	254	44,8%	0	12	0,0%	0,002
2014	104	309	25,2%	5	4	55,6%	0,039
2015	65	327	16,6%	5	26	16,1%	0,948
2016	258	378	40,6%	1	2	33,3%	0,799
2017	229	668	25,5%	10	24	29,4%	0,611
2018	71	709	9,1%	11	22	33,3%	0,000
2019	-	-	-	0	3	0,0%	-

W poniższych tabelach przedstawiono wyniki uwzględniające procent uzyskanych wyników pozytywnych w badaniach serologicznych dla poszczególnych stad w porównaniu do wyników pozytywnych uzyskanych w badaniach molekularnych: RT-PCR dla genu kodującego helikazę (**Tab. 48**), RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (**Tab. 49**) oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (**Tab. 50**) w próbkach tkanek oraz żółci z wybranych stad BB i CL w Polsce z lat 2011 – 2019. Na podstawie testu chi-kwadrat w kilku przypadkach otrzymano statystycznie istotną zależność ($p < 0,05$) (kolor czerwony).

Wyniki

Tab. 48. Porównanie wyników ELISA (% stad pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.

Rok	ELISA			Helikaza (RT-PCR)			P -test chi- kwadrat
	stada pozytywne	stada negatywne	% stad pozytywnych	pozytywny	negatywny	% pozytywnych	
2010	17	3	85,0%	-	-	-	-
2011	29	4	87,9%	2	4	33,3%	0,023
2012	20	0	100,0%	4	8	33,3%	0,000
2013	15	5	75,0%	2	10	16,7%	0,001
2014	14	4	77,8%	5	4	55,6%	0,233
2015	15	2	88,2%	1	30	3,2%	0,000
2016	29	0	100,0%	0	3	0,0%	0,000
2017	32	7	82,1%	13	21	38,2%	0,001
2018	21	13	61,8%	3	30	9,1%	0,000
2019	-	-	-	1	2	33,3%	-

Tab. 49. Porównanie wyników ELISA (% stad pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.

Rok	ELISA			Kapsyd (RT-PCR)			P -test chi- kwadrat
	stada pozytywne	stada negatywne	% stad pozytywnych	pozytywny	negatywny	% pozytywnych	
2010	17	3	85,0%	-	-	-	-
2011	29	4	87,9%	4	2	66,7%	0,185
2012	20	0	100,0%	9	3	75,0%	0,019
2013	15	5	75,0%	0	12	0,0%	0,000
2014	14	4	77,8%	6	3	66,7%	0,535
2015	15	2	88,2%	6	25	19,4%	0,000
2016	29	0	100,0%	1	2	33,3%	0,000
2017	32	7	82,1%	10	24	29,4%	0,000
2018	21	13	61,8%	7	26	21,2%	0,001
2019	-	-	-	0	3	0,0%	-

Wyniki

Tab. 50. Porównanie wyników ELISA (% stad pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.

Rok	ELISA			Kapsyd (Real-Time RT-PCR)			P -test chi- kwadrat
	stada pozytywne	stada negatywne	% stad pozytywnych	pozytywny	negatywny	% pozytywnych	
2010	17	3	85,0%	-	-	-	-
2011	29	4	87,9%	5	1	83,3%	0,759
2012	20	0	100,0%	10	2	83,3%	0,059
2013	15	5	75,0%	0	12	0,0%	0,000
2014	14	4	77,8%	5	4	55,6%	0,233
2015	15	2	88,2%	5	26	16,1%	0,000
2016	29	0	100,0%	1	2	33,3%	0,000
2017	32	7	82,1%	10	24	29,4%	0,000
2018	21	13	61,8%	11	22	33,3%	0,020
2019	-	-	-	0	3	0,0%	-

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Badania serologiczne przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej w 2010 roku udowodniły, że problem zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków występuje powszechnie w stadach kur utrzymywanych w gospodarstwach komercyjnych w Polsce [55], co potwierdzono w dalszym etapie w badaniach molekularnych z wykorzystaniem techniki PCR. Należy zaznaczyć, że wykonane badania nad BLS są pierwszymi przeprowadzonymi na tak szeroką skalę w naszym kraju.

Ocena występowania zakażeń aHEV (BLS) w badaniach serologicznych w stadach BB, LB i CL

W badaniach serologicznych przeprowadzonych na 5 272 surowicach od stad BB (n=222), LB (n=2) oraz CL (n=6) w latach 2010 – 2018 stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko aHEV u 27,77% (1 464/5 272) ptaków. Podobny odsetek seropozytywnych ptaków uzyskano w Korei w 2012 [33], Iranie w latach 2018 – 2020 (28,4% – 440/1 547) [64] oraz USA w 2002 (30% – 380/1 276) [27].

Niższą seroprevalencję odnotowano w badaniach z Nigerii w latach 2018 – 2019 (14,6% – 67/460) [56], Egipcie w 2016 (18,8% – 80/426) [77], Brazylii w 2005 (20% – 5/25) [92] oraz Polsce w latach 2015 – 2017 (21,28% – 220/1 034) [43], zaś wyższą w badaniach przeprowadzonych w Chinach w 2013 (36,9% – 489/1 323) [108], Tajwanie w 2013 (40,57% – 538/1 326) [26] oraz USA w 2013 (44,8% – 145/310) [19].

W badaniach własnych stwierdzono 28,20% (1 435/5 089) seropozytywnych kur w stadach rodzicielskich brojlerów (BB). Podobny odsetek zakażeń u BB stwierdzono w Polsce w latach 2015 – 2017 (25% – 197/788) [43], Iranie w latach 2018 – 2020 (28,5% – 439/1 540) [64], Egipcie w 2016 (32,5% – 62/191) [77] oraz Tajwanie w 2013 roku (34,31% – 294/857) [26]. Dużo wyższą seroprevalencję w stadach BB niż w pracy własnej wykazano w Chinach w 2013 roku (49,6% – 347/699) [108].

W pracy własnej otrzymano 6,52% (3/46) wyników seropozytywnych w stadach rodzicielskich kur niosek (LB). Pomimo, że badania przeprowadzono na mniejszej liczbie surowic to podobne wyniki dla LB odnotowano w Egipcie w 2016 (7,5% – 18/235) [76]. Wyższy odsetek ptaków seropozytywnych odnotowano w Iranie w latach 2018 – 2020 (14,28% – 1/7) [64].

Podobne wyniki jak w pracy własnej dla niosek towarowych (CL) (18,98% – 26/137) odnotowano dla CL w Nigerii w latach 2018 – 2019 (14,6% – 67/460) [56] oraz w Chinach

w 2013 roku (22,7% – 142/624) [108]. Natomiast niższą seroprewalencję odnotowano w Polsce w latach 2015 – 2017 (9,4% – 23/246) [43], zaś dużo wyższą w USA w 2013 roku (44,8% – 145/310) [19] oraz w Tajwanie w 2013 roku (52,03% – 244/469) [26].

Przeprowadzona analiza serologiczna ogółu populacji kur w Polsce wykazała najwyższą seroprewalencję w stadach BB (28,20%), następnie u CL (18,98%), zaś najniższą u LB (6,52%). Podobne uszeregowanie można zauważyć w większości doniesień na świecie w okresie od 2013 do 2020 roku (BB – 25,0%; CL – 9,4%) [43], (BB – 28,5%, CL – 14,28%) [64], (BB 32,5%, LB 7,6%) [77] (BB 49,6%, CL – 22,7%) [108]. Odwrotną kolejność potwierdzono tylko na Tajwanie w 2013 roku, gdzie większy odsetek seropozytywnych kur stwierdzono w stadach CL (52,03%), niż BB (34,31%) [26].

Większą liczbę przypadków BLS odnotowano po przeprowadzeniu analizy z punktu widzenia pojedynczych stad, ponieważ już jeden ptak seropozytywny decydował o tym, że całe stado było uważane za seropozytywne. W badaniach własnych 96,96% stad (BB, LB i CL) było seropozytywnych (223/230 stad – 185/222 BB, 1/2 LB i 6/6 CL). Analiza pod względem stad była zbliżona do wyników uzyskanych na Tajwanie w 2013 roku (95,08% – 58/61) [26], w Hiszpanii w 2009 roku (89,7% – 26/29) [59], Chinach w 2013 roku (100% – 9/9) [108] oraz w USA w 2013 roku (100% ferm – 7/7) [19]. Natomiast niższe wyniki odnotowano w Polsce w latach 2015 – 2017 (56,14% – 32/57) [43], Korei w 2012 roku (57% – 20/35) [33], Iranie w latach 2018 – 2020 (67,6% – 23/34) [64], Egipcie w 2016 roku (69,6% – 16/23) [77], USA w 2002 roku (71% – 54/76) [27] oraz Nigerii w latach 2018 – 2019 (75% – 27/36) [56].

Z przebadanych w pracy własnej stad BB, 83,33% (185/222) było seropozytywnych, podobne wyniki odnotowano w Egipcie w 2016 roku (83,3% – 10/12) [77]. Natomiast wyższą seroprewalencję stad BB odnotowano na Tajwanie w 2013 roku (97,22% – 39/41) [26] oraz w Chinach w 2013 roku (100% – 5/5) [108], natomiast niższą w Polsce w latach 2015 – 2017 (50% – 23/46) [43] i Iranie w latach 2018 – 2020 (66,7% – 22/33) [64]. Spośród przebadanych w pracy własnej 2 stad rodzicielskich kur niosek (LB), połowa była seropozytywna, analogiczny wynik uzyskano w Egipcie w 2016 roku (54,5% – 6/11) [77], u dużo większej liczby przebadanych stad. Natomiast w Iranie przebadano tylko jedno stado, które było seropozytywne [64].

Wszystkie przebadane we własnej pracy stada niosek towarowych (CL) były seropozytywne (100% – 6/6). Zbliżone wyniki uzyskano w stadach CL na Tajwanie (95% – 19/20) [26], Chinach (100% – 4/4) [108] i USA (100% – 7/7 ferm) [19] w 2013 roku, niższą

seroprewalencję odnotowano w Nigerii w latach 2018 – 2019 (75% – 27/36) [56] i w Polsce w latach 2015 – 2017 (81,8% – 9/11) [43].

W badaniach własnych najwyższą seroprewalencję wykazały stada CL (100%), następnie stada BB (83,33%) i LB (50%). Podobną tendencję stwierdzono w Egipcie w 2016 roku (BB 83,3%, LB 54,5%) [77] oraz w Polsce w latach 2015 – 2017 (CL 81,8%, BB 50%) [43]. Co ciekawe odwrotny trend odnotowano w Iranie w latach 2018 – 2020 (LB 100%, BB 66,7%) [64], jednakże trzeba podkreślić, że badaniami objęto tam tylko jedno stado LB. Z kolei w badaniach z 2013 roku przeprowadzonych w Chinach (BB 100%, CL 100%) [108] i na Tajwanie (BB 97,22%, CL 95%) [26] nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy stadami z różnych typów produkcyjnych.

Podsumowując, na podstawie obserwacji własnych i danych piśmiennictwa można stwierdzić niższą seroprewalencję zakażeń aHEV w stadach BB i LB, w porównaniu do CL, co może wynikać z wyższego poziomu bioasekuracji w stadach reprodukcyjnych [72]. Co ciekawe gdy analizujemy wyniki z punktu widzenia poszczególnych osobników można wnioskować że, wirus intensywniej rozprzestrzeniał się w stadach reprodukcji mięsnej, czyli w stadach BB.

Kolejnym ciekawym aspektem jest wiek ptaków, u których odnotowano obecność przeciwciał skierowanych przeciwko aHEV. W badaniach własnych w przebadanym zakresie wiekowym (od 11 do 99 tygodnia życia) najwcześniej wyniki seropozytywne stwierdzono w 20 tygodniu. Według danych poszczególnych autorów przeciwciała wykrywano najwcześniej u ptaków od 13 [80], 16 [19] lub 35 tygodnia życia [77] albo w zakresie 10 – 19 tygodni [108], 24 – 30 tygodni życia [56,59] lub w wieku poniżej 25 tygodni [43,64]. Według Zhao i wsp. (2010) wykrycie przeciwciał w danym terminie oznacza, że zakażenie miało miejsce przynajmniej 2 – 3 tygodnie wcześniej [108].

Na podstawie otrzymanych wyników własnych wykazano wyższe wartości średniego miana geometrycznego, a także wyższy odsetek surowic pozytywnych u ptaków powyżej 35 tygodnia życia. Mimo, że nie były to różnice istotne statystycznie, to wartości p w obu przypadkach były zdecydowanie niższe ($G_{mean}: p = 0,109$ (łącznie dla BB, LB, CL) oraz $p = 0,073$ (BB) oraz odsetek surowic pozytywnych: $p = 0,112$ (łącznie dla BB, LB, CL) oraz $p = 0,081$ (BB)). W wielu publikacjach można znaleźć podobne zależności chociaż odnotowywane w różnym wieku. Huang i wsp. (2002) zauważyli wzrost liczby ptaków seropozytywnych powyżej 18 tygodnia życia, ale trzeba zwrócić uwagę, że autorzy cytowanej pracy podzielili ptaki na dwie grupy, czyli młode do 18 tygodnia i dorosłe

powyżej tego wieku [27]. W innych przypadkach zauważano wzrost ilości ptaków pozytywnych w stadach badanych powyżej 34[77], 40[59], 47[43,64], a nawet 50 tygodnia życia [19], choć też nie zawsze były to różnice istotne statystycznie. W piśmiennictwie można znaleźć przykłady, potwierdzające, że nie było żadnej różnicy odnośnie wyników pozytywnych i wieku ptaków, jak w przypadku wyników z Nigerii [56] i Chin [108], chociaż u ptaków z Chin można dostrzec odwrotną tendencję, bowiem w stadach powyżej 40 tygodni stwierdzono spadek ilości surowic pozytywnych, co mogło wynikać z bardzo wysokich wyników pozytywnych w młodym wieku (w grupie 10 – 19 tygodni 47%; 20 – 29 tygodni 51,7%) i wynikać z bardzo wczesnego przechorowania BLS.

Uzyskane rezultaty badań serologicznych pozwalają na wysnucie wniosku, że zakażenie aHEV w Polsce było bardzo powszechne w latach 2010 – 2018 i było stwierdzane najczęściej u kur w wieku powyżej 35 tygodnia życia (w grupie do 24 tygodnia 22,85%; 25 – 34 tygodni 20,59%; 35 – 49 tygodni 31,13%; powyżej 50 tygodni 30,73%). Wyniki te potwierdzają krajowe badania z lat 2015 – 2017 (Matczuk i wsp., 2019), w których odnotowano nawet, wyższy odsetek ptaków serododatnich w wieku powyżej 47 tygodnia (w grupie do 25 tygodni 12,6%; 26 – 46 tygodni 10,8%; powyżej 47 tygodni 39,6%) [43].

Ocena specyficznej serokonwersji w ognisku BLS

Analiza wyników dwóch stad BB pochodzących z jednej fermy z historią kliniczną BLS, przez 25 tygodniowy okres obserwacji (29 – 54 tyg. życia), potwierdziła występowanie specyficznej serokonwersji w tych stadach. Serokonwersję wykazano między 29 a 36 (stado K2) oraz między 41 a 47 tygodniem życia (stado K1), co wskazuje na obecność aktywnego zakażenia. Wykazanie serokonwersji w stadach utrzymywanych w oddzielnych obiektach blisko siebie na tej samej fermie, mimo braku objawów klinicznych w tym czasie, świadczy o endemicznym utrzymywaniu się zakażenia aHEV na tej fermie. Przy długoterminowej obserwacji można odnotować zmienny charakter infekcji i przechodzenie BLS z formy klinicznej w formę podkliniczną. Podobne obserwacje poczynił Bartczak [7,8], co może odzwierciedlać standardową sytuację w stadach kur w Polsce. Według danych piśmiennictwa do aktywacji zakażenia aHEV dochodzi w stanach zwiększonego stresu, presji niekorzystnych czynników środowiskowych, bądź immunosupresji, spowodowanej na przykład innym czynnikiem zakaźnym np. *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Clostridium perfringens* czy *Aspergillus fumigatus* [8].

Ocena występowania zakażeń aHEV w badaniach serologicznych w stadach CB

Wstępne wyniki badań z 2010 roku zostały opublikowane przez Nerc i wsp. (2013) [55]. W późniejszych latach przeprowadzono badania w wybranych stadach jednodniowych piskląt CB w 2010, 2014 oraz 2019 roku na obszarze większości województw w Polsce (12/16). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między regionami (**Ryc. 6**) pod względem występowania seropozytywnych stad CB, jak i ptaków. Odnotowano natomiast różnice pomiędzy latami w odniesieniu do seroprewalencji w stadach brojlerów, ale nie odnotowano wzrastającej lub malejącej liczby przypadków zakażeń stad lub poszczególnych ptaków w czasie. Natomiast średnio 54,35% stad CB było seropozytywnych (od 38,89% w 2019 roku do 72,22% w 2014 roku) i 7,77% ptaków było seropozytywnych (od 4,35% w 2019 roku do 12,44% w 2014 roku), co może świadczyć o bardzo powszechnym występowaniu przeciwciał przeciwko aHEV w stadach rodzicielskich.

Analiza Europejskiego Wskaźnika Wydajności (EWW) wskazała na wzrost jego wartości w czasie: 303,30 w 2010 roku, 329,42 w 2014 roku oraz 363,90 w 2019 roku, co jest odzwierciedleniem postępu hodowlanego. Pomimo wyższej seroprewalencji aHEV u CB w 2014 roku w porównaniu do lat 2010 i 2019, wskaźnik EWW nie obniżył się, co może świadczyć, że silna presja wirusa w środowisku BB i powszechność występowania przeciwciał przeciwko aHEV u CB, mogą nie mieć wpływu na efektywność odchovu kurcząt rzeźnych. Ponadto przeprowadzona analiza między średnią Gmean, a EWW wykazała słabą dodatnią oraz umiarkowaną ujemną korelację, co udowadnia, że wzrost średniego miana geometrycznego nie przekłada się na spadek EWW. Dodatkowo odnotowano istotne statystycznie różnice w EWW względem regionów w Polsce, najwyższą efektywność produkcji uzyskano w regionie północno-wschodnim (województwo warmińsko-mazurskie oraz podlaskie). W dostępnym piśmiennictwie z zakresu aHEV u CB brakuje informacji o wpływie tego zakażenia na wartość EWW.

Powszechnie uważa się, że przeciwciała które wykrywa się u jednodniowych piskląt są przeciwciałami matczynymi, które do około 3 tygodnia życia zabezpieczają ptaki przed skutkami wczesnego zakażenia [27]. W pracy własnej jedno stado CB (A10, **Tab. 52**), zbadano dwukrotnie tj. w pierwszej dobie oraz w trzecim tygodniu życia. W pierwszym dniu życia jedna surowica była pozytywna (miano 500), następnie w trzecim tygodniu również tylko jedna surowica była pozytywna. Ze względu na niskie miano przeciwciał w 3 tygodniu (miano 493) można przypuszczać, że były to zanikające przeciwciała matczyne. Bowiem miana o wartości 390 i poniżej są uznawane już za negatywne (według danych producenta

Big Liver and Spleen Disease Antibody Test Kit). Podobnie, inni autorzy przebadali jedno stado CB w wieku 45 dni i otrzymali wynik negatywny co wskazuje na brak zakażenia oraz brak przeciwciał matczynych w tym czasie [77]. Należy podkreślić, że określenie dynamiki zanikania przeciwciał matczynych przy aHEV wymaga badania monitoringowego obejmującego większą pulę stad i przeprowadzonego kilkakrotnie w określonych odstępach czasu (co najmniej trzykrotnie tj. w pierwszej dobie życia, w trzecim tygodniu i przed ubojem).

Ocena poziomu przeciwciał w stadach BB i pochodzących od nich stad CB

Analiza transmisji przeciwciał anty-aHEV ze stad BB (n=6) wykazała obecność przeciwciał u 33,33% (2/6) stad piskląt jednodniowych CB pochodzących od BB tylko w wieku 36 i 45 tygodni, zaś brak transmisji od stad w 29, 42, 43 oraz 48 tygodniu życia.

Podobnie tak jak w badaniach Troxler i wsp. (2014) potwierdzono transmisję przeciwciał do jaj w stadach BB w wieku 45 tygodni [90]. Cytowani autorzy nie wykazali transmisji przeciwciał od tych stad w wieku 25 i 62 tygodni, natomiast w badaniach własnych najwcześniejszą transmisję przeciwciał do jaj odnotowano w stadach w 36 tygodniu życia, zatem można wnioskować, że jest to najwcześniejszy wiek w którym stado rodzicielskie przekazuje przeciwciała potomstwu.

Na podstawie własnych obserwacji nie zauważono zależności między wiekiem BB i wysokością mian przeciwciał (Tmax, Gmean), a zdolnością przekazywania ich potomstwu. Natomiast wykazano, że liczba seropozytywnych osobników w stadach BB, może mieć znaczenie. Zaobserwowano, że przy niskim odsetku surowic pozytywnych (13,04% w obu terminach) w stadach BB transmisja miała miejsce. Co ciekawe do transmisji nie dochodziło gdy w stadach BB było więcej seropozytywnych osobników (39,13%; 47,83%; 78,26%). We wcześniejszych pracach nie odnotowano takiej zależności, ponieważ transmisję lub jej brak odnotowywano przy obecności 50% seropozytywnych osobników w stadzie BB [90].

Podsumowując, nie każde serododatnie stado BB ma zdolność przekazywania przeciwciał anty-aHEV, a odsetek przekazywanych przeciwciał matczynych wynosi około 60%. Według niektórych autorów obecność przeciwciał anty-aHEV u niosek (BB) jest czynnikiem hamującym pionową transmisję wirusa do stad potomnych, bowiem do transmisji pionowej zakażenia dochodzi przed pojawieniem się przeciwciał anty-aHEV u BB, co oznacza, że seronegatywne nioski przekazują wirus potomstwu [17,90]. Istnieje potrzeba kontynuacji badań w tym zakresie oraz określenia zdolności transmisji pionowej

wirusa, a także zbadania skutków wczesnego zakażenia u potomstwa w obecności lub braku przeciwciał matczynych.

Warto zaznaczyć, że większość badań od 2014 roku [26,43,56,64,77,90] do których odnoszono się w dyskusji było wykonywanych za pomocą takiego samego testu dostępnego komercyjnie (BLS ELISA CK131, BioChek, Holandia), co pozwala na bardziej obiektywną ocenę i lepszą porównywalność różnych parametrów.

Ocena występowania zakażeń aHEV w stadach drobiu z wykorzystaniem badań molekularnych

W toku przeprowadzonych badań molekularnych materiał genetyczny wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków wykryto w 60,42% stadach kur w Polsce w latach 2011 – 2019. Odnotowano różnice w występowaniu zakażeń aHEV w zależności od typu produkcyjnego: zakażenie częściej stwierdzano w stadach BB (62,22% – 28/45) niż w stadach CL (33,33% – 1/3), chociaż trzeba zaznaczyć, że była badana niewielka liczba stad niosek towarowych w porównaniu do stad reprodukcyjnych. Ponadto stwierdzono także różnice w wynikach, w zależności od poszukiwanego genu (gen kodujący helikazę lub gen kodujący białko kapsydu) oraz zastosowanej metody jaką był wykrywany dany gen (RT-PCR lub Real-Time RT-PCR).

Wyniki badań molekularnych za pomocą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu wskazały na wyższą prevalencję zakażenia aHEV w stadach kur (45,83% stad tj. 48,89% stad BB i 0% stad CL) niż dla genu kodującego helikazę (41,67% stad tj. 42,22% stad BB i 33,33% stad CL). W badaniach Matczuk i wsp. przeprowadzonych na terenie Polski w latach 2017 – 2018 prevalencja aHEV w stadach drobiu różnych typów produkcyjnych (CB, BB i CL) była niższa dla genu kodującego białko kapsydu (15,38% – 10/65), jak i genu kodującego helikazę (fragment ORF1 wirusa) (27,7% – 18/65) lecz autorzy nie podają jaki odsetek zakażeń stwierdzono w stadach BB i CL [43]. Siedlecka i wsp. w badaniach przeprowadzonych w późniejszym okresie (2018 – 2020) odnotowali niższy odsetek zakażeń (na podstawie obecności genu kodującego helikazę) w stadach drobiu (BB, CL; 25,84% – 23/89) w Polsce niż w badaniach własnych, również w odniesieniu do konkretnych typów produkcyjnych (BB 35% – 14/40 i CL 18,4% – 9/49) [69].

Ocena występowania różnych fragmentów genomu wirusa aHEV w latach 2017 – 2018 wskazała na znacznie wyższą wykrywalność fragmentu kodującego helikazę [43], zaś

w badaniach własnych wykrywalność obydwu genów była podobna (zbliżony procent stad wykazywał obecność fragmentu genu kodującego helikazę jak i genu kodującego białko kapsydu wirusa aHEV). Jednakże trzeba zaznaczyć, że obecność obydwu genów nie zawsze stwierdzano w tych samych stadach czy próbkach. Z wszystkich zbadanych stad, w 13-stu stwierdzono obecność genu helikazy oraz genu białka kapsydu przynajmniej w jednej próbce (nie zawsze materiał ten był w tych samych próbkach). W 7 stadach wykryto materiał genetyczny kodujący helikazę (wynik negatywny dla kapsydu), zaś w 9 materiał genetyczny kodujący białko kapsydu (wynik negatywny dla helikazy). W pracy własnej potwierdzono słabą zgodność między wykrywalnością genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu za pomocą RT-PCR (współczynnik kappa Cohena 0,350).

W pracy własnej gen kodujący białko kapsydu aHEV wykrywano za pomocą dwóch technik molekularnych RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR. Ogólnie, dla obu zastosowanych technik otrzymano taki sam odsetek stad zakażonych aHEV (41,67% stad, tj. 44,44% stad BB i 0% stad CL). W przypadku 4 stad BB odnotowano brak spójności między technikami. Dwa stada (nr 003, 006 **Tab. 54**) były pozytywne w RT-PCR i negatywne w Real-Time RT-PCR oraz dwa stada (nr 046, 047 **Tab. 54**) były pozytywne w Real-Time RT-PCR negatywne w RT-PCR. Jednakże, podsumowując na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono bardzo dobrą zgodność między RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków (współczynnika kappa Cohena 0,838).

Ocena występowania zakażeń aHEV z wykorzystaniem badań molekularnych w czasie i pod względem wieku ptaków

W przebiegu badań własnych (próbki pobrane w latach: 2011 – 2019) zaobserwowano istotny spadek odsetka wyników pozytywnych w stadach kur w Polsce w kolejnych latach zarówno w testach RT-PCR (**Tab. 28**) jak i Real-Time RT-PCR (**Tab. 31**) w odniesieniu do fragmentu genu kodującego białko kapsydu aHEV. Mimo istotnych różnic między poszczególnymi latami w przypadku RT-PCR dla genu kodującego helikazę, nie stwierdzono istotnego statystycznie trendu (wzrostu lub spadku zakażeń) w kolejnych latach (**Tab. 25**).

Ponadto, nie stwierdzono istotnej zależności między występowaniem zakażenia aHEV a wiekiem ptaków (CL, BB) w badaniach molekularnych (RT-PCR, Real-Time RT-PCR) dla genu kodującego helikazę oraz białko kapsydu (**Tab. 26, Tab. 29, Tab. 32**).

Ocena występowania zakażeń aHEV z wykorzystaniem badań molekularnych – pod względem występowania w różnym materiale (tkanki i żółć)

W diagnostyce molekularnej zakażenia aHEV u kur wykorzystywano próbki wątroby [18,41,54,88,90], żółci [26,27,29,53,54,81,88], śledziony [43,54,90], kałomoczu [19,29,33,59,81,90], wymazy z kloaki [41,54,88] lub surowicę [59]. Wielu badaczy stosuje w diagnostyce aHEV metodę masowego testowania (tzw. pulowanie), w której łączy wątrobę i śledzionę [43,64,69]. W piśmiennictwie brakuje prac, w których porównywano skuteczność wykrywania danego fragmentu materiału genetycznego aHEV w zależności od rodzaju badanej próbki.

Analiza własna różnych typów próbek od kur pod względem występowania aHEV, wykazała największy odsetek wyników pozytywnych kolejno w pęcherzyku żółciowym (66,67% – 6/9) > żółci (47,73% – 21/44) > wątrobie (39,13% – 18/46) i śledzionie (38,64% – 17/44). Biorąc pod uwagę patogenezę zakażenia ptasim wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) zakładano, że wątroba będzie narządem w którym najczęściej będzie wykrywany materiał genetyczny tego wirusa, ponieważ jest ona narządem docelowym w którym zachodzi jego replikacja [13,52]. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że wirus pozostaje dłużej w ścianie pęcherzyka żółciowego i dlatego jest większa szansa na jego wykrycie w tej próbce.

Kluczowym elementem diagnostyki molekularnej BLS jest wybór odpowiedniego genu docelowego. W pracy własnej, w dodatknych próbkach pobranych od kur częściej wykrywano gen kodujący białko kapsydu (80,64% – 50/62) w porównaniu do genu kodującego helikazę (50% – 31/62), zaś obydwa geny wykryto w 30,64% (19/62) próbek. Podobnie Troxler i wsp. częściej wykrywali gen kodujący kapsyd niż helikazę [90]. W odróżnieniu od badań własnych inni autorzy we wszystkich próbkach pozytywnych wykrywali helikazę natomiast kapsyd rzadziej (na poziomie 55,56% i 69,23%) [43,88]. Wyniki sugerują, że fragmenty RNA wirusa aHEV kodujące różne ORF (ORF1 – helikaza, ORF2 – kapsyd) są replikowane w różnych ilościach, w zależności od etapu zakażenia [90]. W związku z tym najbardziej właściwe w diagnostyce aHEV wydaje się badanie w kierunku dwóch genów (kodującego białko kapsydu i helikazy), co dodatkowo potwierdzono wykazując słabą zgodność (pokrywalność wyników) w RT-PCR (**Tab. 34**).

Biorąc pod uwagę obecność poszczególnych genów aHEV w pozytywnych próbkach, helikazę kolejno wykrywano w próbkach żółci (61,90% – 13/21) > pęcherzyka żółciowego (50% – 3/6) > śledziony (47,06% – 8/17) > wątroby (38,89% – 7/18). Wyniki

dodatknie dla kapsydu otrzymywano najczęściej w próbkach z pęcherzyka żółciowego (100% – 6/6) > wątroby (94,44% – 17/18) > żółci (76,19% – 16/21) > śledziony (64,70% – 11/17). Spośród pozytywnych próbek oba geny najczęściej wykrywano w próbkach z pęcherzyka żółciowego (50% – 3/6) > żółci (39,09% – 8/21) > wątroby (33,33% – 6/18) > śledziony (11,76% – 2/17).

W porównaniu do wyników własnych inni autorzy helikazę wykrywali częściej w wątrobie (88,89% – 16/18) niż w śledzionie (44,44% – 8/18). Natomiast gen białka kapsydu wykrywano w pulowanych próbkach z wątroby i śledziony jednakże w niższym odsetku (55,56% – 10/18) niż w badaniach własnych dla wątroby i śledziony indywidualnie [43]. Warto zaznaczyć, że w badaniach własnych w niektórych stadach (16,67% – 8/48) wykrywano materiał genetyczny aHEV w pęcherzyku żółciowym i/lub żółci nawet gdy wątroba i/lub śledziona były ujemne.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono istotną ($p < 0,05$) zależność między rodzajem badanej tkanki, a odsetkiem wyników pozytywnych w badaniach metodą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (**Tab. 43**), co może mieć bezpośrednie znaczenie dla praktycznego pobierania próbek do badań.

Podsumowując na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że najbardziej odpowiednim materiałem do badań laboratoryjnych w diagnostyce molekularnej aHEV u kur jest fragment pęcherzyka żółciowego, stąd też zalecenie, aby pęcherzyk żółciowy, jak i wątroba stanowiły konieczne próbki do badań.

Ocena występowania zakażeń aHEV z wykorzystaniem badań molekularnych – wymazy

W pracy własnej zdiagnozowano zakażenie aHEV w stadzie BB w wieku 41 tygodni poprzez wykazanie obecności materiału genetycznego wirusa za pomocą RT-PCR w wymazach z kloaki oraz z tchawicy (rozdział 2.3. **Tab. 38, Tab. 39**; załącznik **Tab. 53 i Tab. 54**). W wymazach z kloaki (28,57% – 2/7) wykryto tylko gen kodujący helikazę, zaś w wymazach z tchawicy (14,28% – 1/7) wykryto tylko gen kodujący białko kapsydu. Jednocześnie w tym stadzie otrzymano wyniki pozytywne dla genu kodującego kapsyd (helikaza negatywna) w wątrobie, żółci i pęcherzyku żółciowym (śledziona negatywna) dodatkowo stado to było seropozytywne w ELISA (stado 036 **Tab. 53, Tab. 54**; stado F07 **Tab. 51**). W piśmiennictwie można znaleźć informację o wykorzystaniu wymazów z kloaki w diagnostyce aHEV. Podobnie jak w pracy własnej inni autorzy otrzymywali wyniki dodatnie dla wymazów z kloaki w kierunku helikazy [54,88]. Wyniki własne są zgodne

z Troxler i wsp. [88], którzy również z wymazach z kloaki wykrywali wyłącznie gen kodujący helikazę (kapsyd negatywny). W odróżnieniu od powyższych doniesień Marek i wsp. [41] wykrywali obydwa geny (kapsyd i helikazę) w wymazach z kloaki od kur.

Według najlepszej wiedzy, w pracy własnej po raz pierwszy potwierdzono obecność materiału genetycznego aHEV w wymazach z tchawicy u kur, co wskazuje na możliwość siewstwa i transmisji wirusa wraz z wydzieliną z dróg oddechowych. Dotychczas tylko po zakażeniu eksperymentalnym 60 tyg. kur SPF wirus reizolowano z płuc (16, 20, 56 dpi) [13]. Otrzymane wyniki własne wskazują, że wirus może szerzyć się również drogą kropelkową, dotychczas droga ta nie była opisywana w epidemiologii zakażenia aHEV.

Ocena występowania zakażeń aHEV z wykorzystaniem badań molekularnych – zarodki

W piśmiennictwie są nieliczne doniesienia dotyczące określenia patogenności aHEV na modelu zarodków kurzych [22,90]. Badania własne na zarodkach kurzych nie potwierdziły wysokiej patogenności użytego szczepu aHEV, bowiem śmiertelność wynosiła 25% i występowała stosunkowo późno po zakażeniu (5-6 dpi). Dodatkowo nie reizolowano materiału genetycznego aHEV z tkanek zmarłych zarodków, co może świadczyć, że zarodki (15-16 di) zwalczyły zakażenie. Z drugiej strony wykryto materiał genetyczny aHEV w tkankach zarodka (wątroba i pęcherzyk żółciowy), który przeżył do końca doświadczenia (18 di), warto zaznaczyć, że wykryto wyłączenie gen kodujący kapsyd aHEV (helikaza negatywna). Obserwacje własne wskazują na zróżnicowaną patogenność aHEV dla zarodków kurzych, a także sugerują możliwą transmisję pionową zakażenia. Możliwość taką potwierdzili Troxler i wsp. [90] w badaniach terenowych, wykazując obecność materiału genetycznego wirusa (helikaza i kapsyd) u jednodniowych piskląt pochodzących od stada rodzicielskiego w wieku 25 tygodni. Podobnie inni autorzy, którzy po zakażeniu eksperymentalnym zarodków reizolowali wirus z wątroby, żółci i kału piskląt. Z drugiej strony po zakażeniu eksperymentalnym kur SPF wykluczono możliwość transmisji pionowej wirusa do jaj, ale potwierdzono jego obecność w białku [22]. Istnieje potrzeba kontynuowania badań celem potwierdzenia możliwości transmisji pionowej aHEV u kur.

Analiza filogenetyczna

Analiza filogenetyczna otrzymanych sekwencji (n=30) fragmentu ORF1 kodującego helikazę aHEV wykazała, że szczepy izolowane od kur BB i CL w latach 2011 – 2019 w Polsce należą do czterech genotypów: genotyp 1, 2, 3 oraz tzw. domniemany nowy genotyp (putative new genotype). W badaniach własnych żaden wirus nie przynależał do genotypu 4 w odróżnieniu od wcześniejszych doniesień z Polski [43,69]. Większość przynależała do genotypu 1 i 3 (z każdego po 36,67% – 11/30), natomiast w badaniach innych autorów szczepy od kur (BB, CL) przynależały głównie do genotypu 2 (63,33% [69]; 100% [43]).

Do genotypu 1 przyporządkowano 11 uzyskanych sekwencji, część z nich utworzyła klaster z sekwencjami pochodzącymi z izolatami pochodzącymi ze stad CL z Polski z lat 2018 – 2019 (MH636895 i OK423527 – CL województwo wielkopolskie), które wówczas przyporządkowano do genotypu 2 [43,69]. Do genotypu 2 przyporządkowano 6 własnych sekwencji aHEV, które utworzyły jeden zwarty klaster nieznacznie oddalony od innych szczepów pochodzących z Polski z wcześniejszych badań [43,69]. Do genotypu 3 przyporządkowane zostało 11 sekwencji uzyskanych w pracy własnej, z czego 10 utworzyło bardzo jednorodny klaster mocno zbliżony do sekwencji uzyskiwanych w innych badaniach pochodzących z Polski z 2007 [41] i 2013 roku [90], co może świadczyć o znacznym podobieństwie genetycznym tych szczepów aHEV. Sekwencja jednego wirusa (PP831476) była oddalona od wspólnego klastra (w genotypie 3), w którym znajdował się drugi wirus (PP820889) pochodzący z tego samego stada BB (numer 021), co może wskazywać na zróżnicowanie genetyczne wirusa w obrębie tego samego stada. Kolejne otrzymane sekwencje własne (PP770539, PP831478 – obie z tego samego stada) przyporządkowane zostały do tzw. domniemanego nowego genotypu, ponieważ różniły się znacznie od czterech znanych genotypów i były spokrewnione ze szczepem wyizolowanym od wróbla (MG737712) [100] oraz *Avihepevirus egretti* od czapli nadobnej (KX589065) [65]. Warto zaznaczyć, że *Avihepevirus egretti* stanowi oddzielny gatunek blisko spokrewniony z aHEV.

Analiza filogenetyczna otrzymanych sekwencji (n=31) fragmentu ORF2 kodującego kapsyd aHEV wykazała, że szczepy izolowane od kur BB oraz od zarodków w latach 2011 – 2018 należą do dwóch genotypów: genotyp 2 oraz 3. W odróżnieniu od wcześniejszych doniesień, w badaniach własnych żaden wirus nie przynależał do genotypu 1 i 4 [43]. Większość własnych szczepów aHEV przynależała do genotypu 2 (90,32% – 28/31), podobnie tak jak we wcześniejszych analizach z Polski (90% – 9/10) [43]. Do genotypu 2 przyporządkowano 28 uzyskanych sekwencji, które utworzyły 4 zwarte klastry. Wykazano, że jeden szczep (PP770545), który został przyporządkowany do tego genotypu był znacznie

oddalony od pozostałych, co świadczy o jego dużym genetycznym zróżnicowaniu. Do genotypu 2 przyporządkowane zostały także wcześniejsze izolaty uzyskane w badaniach przeprowadzonych w latach 2017 – 2018 w Polsce [43]. Do genotypu 3 przyporządkowano 3 sekwencje własne, z czego dwie (PP861031, PP861033 – BB z 2017 roku) utworzyły jeden klaster wspólnie z izolatem z 2013 roku, pochodzącym z Polski (HG917397 – BB w wieku 10 tygodni) [90].

Tak szeroka różnorodność w obrębie wykrywanych genotypów aHEV świadczy o [90] równie dużym zróżnicowaniu tego wirusa w Polsce, co jest zgodne z obserwacjami z wcześniejszych lat [43,69].

Biorąc pod uwagę zakażone stada BB, pozytywne dla obu genów ($n=13$), u części stad (38,46% – 5/13) istnieje przynależność do tych samych genotypów (genotyp 2 lub 3) niezależnie od analizowanego genu, z czego 3 stada przynależały do genotypu 2 i pochodziły z lat 2017 – 2018, a 2 stada przynależały do genotypu 3 i pochodziły z 2017 roku. W pozostałych 8 stadach (61,54%) analiza sekwencji genu kodującego kapsyd umieściła je w genotypie 2, zaś analiza sekwencji genu kodującego helikazę w genotypie 1 (6 stad: lata 2012 – 2015), genotypie 3 (1 stado: 2017) oraz w tzw. domniemanym nowym genotypie (1 stado: 2011).

Otrzymane wyniki wskazują, że ORF1 i ORF 2 (reprezentowane w badaniach własnych przez gen kodujący helikazę oraz białko kapsydu) są amplifikowane w reakcji PCR w zależności od stadium infekcji, a także, że na badanych fermach mogło dojść do zakażenia różnymi typami genetycznymi wirusa w tym samym czasie, co znajduje potwierdzenie także we wcześniejszych doniesieniach [19,43,90].

Na podstawie przeprowadzanych analiz, można stwierdzić, że zakażenia aHEV są rozprzestrzenione w stadach kur w Polsce, ale jednocześnie są powodowane przez różne genotypy wirusa niezależnie od roku, regionu czy typu produkcyjnego stada.

Korelacja między wynikami badań serologicznych i molekularnych

W pracy własnej podjęto próbę porównania wyników badań serologicznych z molekularnymi. Porównano procent wyników pozytywnych poszczególnych surowic z wynikami pozytywnymi badań molekularnych. Za każdym razem porównywane były wyniki ze stad z tego samego roku (**Tab. 45, Tab. 46, Tab. 47**) oraz w odniesieniu do wykrycia konkretnego fragmentu genu. W kolejnym porównaniu wzięto pod uwagę odsetek

stad pozytywnych w badaniach serologicznych (**Tab. 48, Tab. 49, Tab. 50**) w tym przypadku zależność była bardziej widoczna.

W piśmiennictwie nie znaleziono prac, w których analizowano korelację między badaniami serologicznymi a molekularnymi dla aHEV. Gerber i wsp., badali fermy zarówno testami serologicznymi jak i molekularnymi, ale nie podjęli się próby zestawienia tych wyników [19].

Mimo występowania, w niektórych przypadkach, korelacji pomiędzy liczbą surowic lub stad pozytywnych w badaniach serologicznych, a pozytywnymi wynikami RT-PCR lub Real Time RT-PCR trudno wyciągnąć jednoznaczne wnioski. Można stwierdzić, że taka korelacja nie ma praktycznego znaczenia w diagnostyce zakażenia aHEV. Badania ELISA mają za zadanie przedstawienie ogólnej sytuacji epidemiologicznej oraz historii stada pod względem wcześniejszego kontaktu z wirusem, ponadto wykorzystując zjawisko serokonwersji można odnotować przejście z formy podklinicznej w formę kliniczną zakażenia. Badania molekularne umożliwiają rozpoznanie występowania zakażenia w danym momencie (poprzez wykrycie obecności materiału genetycznego wirusa w badanej próbce). Ponadto diagnostyka molekularna ma znaczną przewagę nad metodami serologicznymi szczególnie w początkowej fazie infekcji, gdy organizm nie zdążył jeszcze wytworzyć swoistych przeciwciał. W przypadku podejrzenia klinicznego o zakażenia kur aHEV właściwsze w pierwszej kolejności jest przeprowadzenie badań molekularnych, następnie badań serologicznych w celu kontrolowania sytuacji epidemiologicznej w stadzie.

Prowadzone od 2010 badania serologiczne oraz dodatkowo od 2011 badania molekularne wykazały, częste występowanie zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) zarówno w wybranych stadach kur (BB, CL) jak i kurcząt (CB) w Polsce. Pomimo tego, że wirus aHEV nie jest aktualnie zaliczany do patogenów o potencjale zoonotycznym to trzeba brać pod uwagę możliwość wystąpienia w późniejszym czasie zakażeń międzygatunkowych biorąc pod uwagę jego rozpowszechnienie i zróżnicowanie genetyczne nie tylko w Polsce, ale także na świecie. Bardzo istotną kwestią jest dalsze monitorowanie zakażeń aHEV, opracowanie nowych testów diagnostycznych, a także technik zwalczania i zapobiegania tym zakażeniom.

Obecnie jedynym sposobem zapobiegania zakażeniom aHEV u drobiu jest poprawa bioasekuracji, na co w ostatnich latach kładzie się bardzo duży nacisk ze względów takich jak poprawa ogólnie rozumianej „zdrowotności stad” oraz redukcja zużycia antybiotyków dzięki temu forma kliniczna aHEV nie występuje często. Brak szczepień i skutecznego specyficznego leczenia spowodowały spadek zainteresowania lekarzy praktyków badaniami

kur w kierunku zakażenia aHEV, co było jednym z problemów z pozyskiwaniem materiału do badań diagnostycznych.

Podsumowanie wyników

1. Badania serologiczne wykazały powszechne występowanie zakażeń aHEV (wirus zapalenia wątroby typu E ptaków) w wybranych stadach rodzicielskich kur linii mięsnej, nieśnej oraz stadach niosek towarowych (BB, LB, CL) w Polsce w latach 2010 – 2018 (96,96% stad seropozytywnych).
2. Najwyższa seroprewalencja zakażeń aHEV w Polsce w badanych stadach w latach 2010 – 2018 występowała w stadach CL (100%) a następnie w BB (83,33%) i LB (50%).
3. Najwyższa seroprewalencja aHEV u poszczególnych osobników w stadach drobiu występowała u kur stad rodzicielskich linii mięsnej (28,20%), następnie u kur stad niosek towarowych (18,98%) i kur stad rodzicielskich linii nieśnej (6,52%).
4. W badaniach serologicznych występowanie zakażenia aHEV w Polsce w latach 2010 – 2018 najczęściej stwierdzano u kur ze stad rodzicielskich kur linii mięsnej, nieśnej oraz stad niosek towarowych (BB, CL, LB) w wieku powyżej 35 tygodnia życia (w grupie do 24 tygodnia 22,85%; 25 – 34 tygodni 20,59%; 35 – 49 tygodni 31,13%; powyżej 50 tygodni 30,73%).
5. Serokonwersja w stadach rodzicielskich kur linii mięsnej (BB) trzymanyh w kurnikach z uprzednią historią BLS, w długoterminowej obserwacji świadczy o endemicznym występowaniu zakażenia aHEV na danym terenie, co może wskazywać na zmienny charakter zakażenia (postać kliniczna i podkliniczna) i możliwość jego aktywacji.
6. W Polsce w latach 2010, 2014 oraz 2019 stwierdzono powszechne występowanie zakażenia aHEV w wybranych stadach piskląt brojlerów kurzych (CB) (54,35% stad; 7,77% ptaków seropozytywnych), co świadczy również o powszechnym występowaniu przeciwciał w stadach rodzicielskich (BB). Obecność przeciwciał anty-aHEV u jednodniowych CB nie wpływała na efektywność produkcji (wartość EWW – Europejski Wskaźnik Wydajności). W kolejnych latach badań odnotowano istotny wzrost EWW oraz istotne różnice w EWW u CB między badanymi regionami w Polsce. Najwyższa efektywność produkcji była w regionie północno-wschodnim (województwo warmińsko-mazurskie oraz podlaskie).

7. Nie każde serododatnie stado rodzicielskie kur linii mięsnej (BB) przekazuje przeciwciała anti-aHEV na pochodzące od nich kurczęta (CB) a wysokość transmisji przeciwciał matczynych na potomstwo wynosi około 60%.
8. W badaniach molekularnych wykazano, że zakażenie BLS występowało powszechnie w badanych stadach drobiu w Polsce (60,42% stad zakażonych) w latach 2011 – 2019. Zakażenie aHEV częściej stwierdzano w stadach BB (62,22%) niż CL (33,33%).
9. Odnotowano istotne obniżenie liczby stad zakażonych wraz z kolejnymi latami w okresie 2011 – 2019 (w odniesieniu do genu kodującego białko kapsydu aHEV).
10. Na podstawie badań molekularnych nie ma zależności między wiekiem ptaków (BB, CL) a zakażeniem aHEV.
11. Najbardziej właściwe w diagnostyce molekularnej BLS jest badanie w kierunku detekcji dwóch genów: genu kodującego helikazę i genu kodującego białko kapsydu (ze względu na słabą zgodność wyników w RT-PCR). Natomiast stwierdzono bardzo dobrą zgodność między RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu aHEV.
12. Najbardziej odpowiednim materiałem do badań laboratoryjnych w diagnostyce molekularnej aHEV u kur jest fragment pęcherzyka żółciowego. Należy jednak zaznaczyć, aby wraz z pęcherzykiem żółciowym pobierać także wątrobę, która jest pierwotnym miejscem replikacji wirusa.
13. Możliwe jest siewstwo i transmisja wirusa aHEV wraz z wydzieliną z dróg oddechowych kur.
14. Wirus aHEV cechuje się zróżnicowaną patogennością dla zarodków kurzych, a długotrwała przeżywalność zakażonych zarodków może sugerować możliwość transmisji pionowej.
15. Analiza filogenetyczna wykazała szeroką różnorodność w obrębie wykrywanych genotypów aHEV w Polsce w latach 2011 – 2019 ze względu na helikazę (genotypy 1, 2, 3 oraz tzw. domniemany nowy genotyp) oraz kapsyd (genotyp 2 i 3).
16. Istnieje możliwość zakażenia tego samego stada różnymi typami genetycznymi aHEV. Dwa geny wirusa aHEV (helikaza i kapsyd) nie zawsze zgodnie podlegają amplifikacji w reakcji PCR w zależności od stadium zakażenia i rodzaju próbki.

VI. WNIOSKI

W oparciu o uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Badania serologiczne wykazały bardzo powszechne (96,96%) występowanie zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków w stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnej, nieśnej oraz niosek jaj konsumpcyjnych w Polsce w latach 2010 – 2018. Najwyższa seroprewalencja występowała w stadach niosek jaj konsumpcyjnych, natomiast najwięcej osobników serododatnich odnotowano w stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnej. Kury powyżej 35 tygodnia życia były częściej seropozytywne. Badania serologiczne jednodniowych brojlerów kurzych w latach 2010, 2014 oraz 2019, potwierdziły powszechne (54,35%) występowanie zakażeń aHEV w stadach rodzicielskich. Obecność przeciwciał matczynych nie wpływała na efektywność produkcji (EWW), niezależnie od badanego regionu kraju.
2. Badania molekularne wykazały powszechne (60,42%) występowanie zakażeń aHEV w stadach rodzicielskich kurcząt rzeźnych oraz stadach niosek towarowych w Polsce w latach 2011 – 2019. Obecność materiału genetycznego wirusa częściej wykrywano w stadach rodzicielskich kur linii mięsnej. Liczba stad zakażonych obniżała się istotnie w kolejnych badanych latach względem obecności genu kodującego białko kapsydu aHEV.
3. Najlepszą próbką do badania obecności materiału genetycznego wirusa aHEV za pomocą technik biologii molekularnej jest ściana pęcherzyka żółciowego. Najwłaściwsze jest badanie w kierunku detekcji dwóch genów, zarówno genu kodującego helikazę jak i genu kodującego białko kapsydu.
4. Analiza filogenetyczna wirusów aHEV uzyskanych w Polsce w latach 2011 – 2019 wykazała szeroką zmienność genetyczną w oparciu o sekwencje genu helikazy (genotypy 1, 2, 3 oraz tzw. domniemany nowy genotyp) oraz kapsydu (genotyp 2 i 3).

VII. ZAŁĄCZNIK

W załączniku przedstawiono wyniki badań serologicznych ELISA oraz badań molekularnych w kierunku aHEV.

Tab. 51. Wyniki ELISA przebadanych stad BB, LB i CL z lat 2010 – 2018.

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
1	2010	D01	BB	48-0	23	297	109	10	13	43,48%	56,52%	19	2 231
2	2010	D02	BB	50-0	23	83	86	1	22	4,35%	95,65%	1	517
3	2010	D03	BB	50-0	23	56	83	0	23	0,00%	100,00%	1	260
4	2010	D04	BB	50-0	23	55	82	0	23	0,00%	100,00%	5	270
5	2010	D05	BB	50-0	23	63	187	1	22	4,35%	95,65%	5	1 168
6	2010	D06	BB	50-0	23	85	222	4	19	17,39%	82,61%	14	2 755
7	2010	D07	LB	50-0	23	12	118	0	23	0,00%	100,00%	1	133
8	2010	D08	BB	54-0	23	40	201	2	21	8,70%	91,30%	1	1 036
9	2010	D09	BB	54-0	23	56	321	1	22	4,35%	95,65%	1	3 962
10	2010	D10	CL	60-0	23	243	102	9	14	39,13%	60,87%	24	1 393
11	2010	D11	BB	61-0	23	89	95	4	19	17,39%	82,61%	1	562
12	2010	D12	BB	61-0	23	78	144	1	22	4,35%	95,65%	1	996
13	2010	D13	CL	63-0	23	209	71	5	18	21,74%	78,26%	41	854
14	2010	D14	BB	63-0	23	151	53	1	22	4,35%	95,65%	41	400
15	2010	D15	BB	65-0	23	777	105	17	6	73,91%	26,09%	78	5 754
16	2010	D16	CL	66-0	22	60	193	3	19	13,64%	86,36%	1	1 858
17	2010	D17	BB	68-0	23	130	128	2	21	8,70%	91,30%	1	1 374
18	2010	D18	LB	76-0	23	37	164	3	20	13,04%	86,96%	1	705
19	2010	D19	BB	95-0	22	236	114	10	12	45,45%	54,55%	1	2 435
20	2010	D20	BB	95-0	23	398	102	13	10	56,52%	43,48%	8	2 940
21	2011	E01	BB	22-0	23	80	101	2	21	8,70%	91,30%	23	439

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
22	2011	E02	BB	22-0	23	102	63	0	23	0,00%	100,00%	13	325
23	2011	E03	BB	27-0	23	122	74	2	21	8,70%	91,30%	21	476
24	2011	E04	BB	28-0	23	53	77	0	23	0,00%	100,00%	5	268
25	2011	E05	BB	29-0	23	99	284	3	20	13,04%	86,96%	1	5 237
26	2011	E06	BB	29-0	23	64	117	3	20	13,04%	86,96%	1	774
27	2011	E07	BB	33-0	23	114	86	1	22	4,35%	95,65%	1	735
28	2011	E08	BB	33-0	23	166	97	3	20	13,04%	86,96%	26	870
29	2011	E09	BB	36-0	46	172	127	10	36	21,74%	78,26%	1	1 925
30	2011	E10	BB	36-0	23	464	107	11	12	47,83%	52,17%	192	2 614
31	2011	E11	BB	37-0	23	72	85	1	22	4,35%	95,65%	24	393
32	2011	E12	BB	39-0	23	374	94	9	14	39,13%	60,87%	114	1 940
33	2011	E13	BB	40-0	23	88	123	2	21	8,70%	91,30%	24	758
34	2011	E14	BB	41-0	23	192	155	4	19	17,39%	82,61%	57	1 995
35	2011	E15	BB	41-0	23	531	104	13	10	56,52%	43,48%	87	3 618
36	2011	E16	BB	42-0	23	146	97	2	21	8,70%	91,30%	50	850
37	2011	E17	BB	43-0	23	641	97	13	10	56,52%	43,48%	36	4 172
38	2011	E18	BB	45-0	23	74	109	1	22	4,35%	95,65%	1	615
39	2011	E19	BB	45-0	23	92	75	1	22	4,35%	95,65%	8	406
40	2011	E20	BB	45-0	23	59	64	0	23	0,00%	100,00%	1	205
41	2011	E21	BB	46-0	23	200	140	7	16	30,43%	69,57%	1	2 558
42	2011	E22	BB	46-0	23	114	47	0	23	0,00%	100,00%	33	243

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
43	2011	E23	BB	47-0	23	610	114	12	11	52,17%	47,83%	93	4 354
44	2011	E24	BB	47-0	23	889	89	18	5	78,26%	21,74%	85	4 074
45	2011	E25	BB	47-0	22	1 375	82	21	1	95,45%	4,55%	215	5 616
46	2011	E26	BB	47-0	22	1 404	88	21	1	95,45%	4,55%	344	5 836
47	2011	E27	BB	50-0	22	869	73	19	3	86,36%	13,64%	297	2 750
48	2011	E28	BB	50-0	22	1 273	75	21	1	95,45%	4,55%	314	4 898
49	2011	E29	BB	54-0	23	843	88	16	7	69,57%	30,43%	166	3 748
50	2011	E30	BB	54-0	23	876	95	14	9	60,87%	39,13%	89	4 679
51	2011	E31	BB	58-0	23	552	89	14	9	60,87%	39,13%	252	2 540
52	2011	E32	BB	63-0	23	356	132	9	14	39,13%	60,87%	68	3 978
53	2011	E33	BB	99-0	23	68	86	1	22	4,35%	95,65%	1	452
54	2012	F01	BB	23-0	23	34	166	1	22	4,35%	95,65%	1	924
55	2012	F02	BB	26-0	23	215	76	4	19	17,39%	82,61%	41	907
56	2012	F03	BB	28-0	23	164	57	2	21	8,70%	91,30%	57	522
57	2012	F04	BB	33-0	23	723	85	18	5	78,26%	21,74%	28	3 734
58	2012	F05	BB	38-0	23	410	58	11	12	47,83%	52,17%	225	1 240
59	2012	F06	BB	40-0	23	375	33	10	13	43,48%	56,52%	199	649
60	2012	F07	BB	41-0	22	743	93	15	7	68,18%	31,82%	172	3 280
61	2012	F08	BB	41-0	23	250	132	4	19	17,39%	82,61%	114	2 311
62	2012	F09	BB	46-0	23	514	128	12	11	52,17%	47,83%	74	4 429
63	2012	F10	BB	47-0	23	588	106	15	8	65,22%	34,78%	38	3 893

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
64	2012	F11	BB	48-0	23	1 458	60	20	3	86,96%	13,04%	190	3 774
65	2012	F12	BB	49-0	23	385	76	12	11	52,17%	47,83%	125	1 510
66	2012	F13	BB	49-0	23	701	120	14	9	60,87%	39,13%	155	5 245
67	2012	F14	BB	49-0	23	192	142	1	22	4,35%	95,65%	65	1 965
68	2012	F15	BB	50-0	23	230	59	6	17	26,09%	73,91%	50	649
69	2012	F16	BB	50-0	23	480	119	11	12	47,83%	52,17%	110	3 806
70	2012	F17	BB	51-0	23	217	46	3	20	13,04%	86,96%	217	498
71	2012	F18	BB	53-0	22	736	102	15	7	68,18%	31,82%	145	4 665
72	2012	F19	BB	54-0	23	531	120	9	14	39,13%	60,87%	166	3 742
73	2012	F20	BB	54-0	23	430	128	7	16	30,43%	69,57%	115	3 526
74	2013	G01	BB	25-0	23	1	360	0	23	0,00%	100,00%	1	70
75	2013	G02	BB	26-0	23	558	56	16	7	69,57%	30,43%	314	1 814
76	2013	G03	BB	28-0	23	260	42	3	20	13,04%	86,96%	94	520
77	2013	G04	BB	32-0	23	1 069	78	23	0	100,00%	0,00%	397	4 114
78	2013	G05	BB	32-0	23	1 410	87	22	1	95,65%	4,35%	363	5 787
79	2013	G06	BB	35-0	23	75	123	0	23	0,00%	100,00%	1	380
80	2013	G07	BB	38-0	23	77	82	0	23	0,00%	100,00%	32	219
81	2013	G08	BB	39-0	23	150	50	1	22	4,35%	95,65%	47	425
82	2013	G09	BB	40-0	23	442	47	12	11	52,17%	47,83%	158	1 088
83	2013	G10	BB	41-0	23	133	185	4	19	17,39%	82,61%	1	3 463
84	2013	G11	BB	41-0	23	95	184	3	20	13,04%	86,96%	1	2 402

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowiec)	NEG (surowiec)	%POS (surowiec)	%NEG (surowiec)	Min	Max
85	2013	G12	BB	42-0	23	669	56	21	2	91,30%	8,70%	36	1 784
86	2013	G13	BB	50-0	23	62	72	0	23	0,00%	100,00%	4	221
87	2013	G14	BB	53-0	23	906	110	12	11	52,17%	47,83%	50	3 660
88	2013	G15	BB	54-0	23	1 264	81	21	2	91,30%	8,70%	186	4 507
89	2013	G16	BB	57-0	24	527	48	20	4	83,33%	16,67%	184	1 624
90	2013	G17	BB	59-0	23	1 067	73	20	3	86,96%	13,04%	237	2 914
91	2013	G18	BB	59-0	22	1 164	90	20	2	90,91%	9,09%	217	5 406
92	2013	G19	BB	59-0	23	375	137	8	15	34,78%	65,22%	102	3 626
93	2013	G20	BB	59-0	23	144	47	0	23	0,00%	100,00%	67	329
94	2014	H01	BB	22-0	23	179	38	0	23	0,00%	100,00%	67	350
95	2014	H02	BB	28-0	23	164	57	2	21	8,70%	91,30%	57	522
96	2014	H03	BB	29-0	23	353	80	9	14	39,13%	60,87%	115	1 396
97	2014	H04	BB	30-0	23	225	58	3	20	13,04%	86,96%	81	710
98	2014	H05	BB	33-0	23	188	40	1	22	4,35%	95,65%	70	400
99	2014	H06	BB	34-0	23	285	147	6	17	26,09%	73,91%	91	3 155
100	2014	H07	BB	36-0	23	156	101	3	20	13,04%	86,96%	10	1 083
101	2014	H08	BB	37-0	22	650	102	13	9	59,09%	40,91%	184	3 708
102	2014	H09	BB	39-0	23	3	218	0	23	0,00%	100,00%	1	213
103	2014	H10	BB	39-0	23	9	141	0	23	0,00%	100,00%	1	233
104	2014	H11	BB	39-0	23	1	424	0	23	0,00%	100,00%	1	245
105	2014	H12	BB	42-0	23	551	137	11	12	47,83%	52,17%	141	4 822

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
106	2014	H13	BB	43-0	23	787	95	18	5	78,26%	21,74%	203	4 606
107	2014	H14	BB	45-0	23	63	148	3	20	13,04%	86,96%	1	1 201
108	2014	H15	BB	48-0	23	306	60	9	14	39,13%	60,87%	33	970
109	2014	H16	BB	49-0	23	701	120	14	9	60,87%	39,13%	155	5 245
110	2014	H17	BB	49-0	23	192	142	1	22	4,35%	95,65%	65	1 965
111	2014	H18	BB	50-0	23	480	119	11	12	47,83%	52,17%	110	3 806
112	2015	I01	BB	28-0	23	149	88	1	22	4,35%	95,65%	38	838
113	2015	I02	BB	30-0	23	96	84	1	22	4,35%	95,65%	14	469
114	2015	I03	BB	30-0	23	140	56	0	23	0,00%	100,00%	43	333
115	2015	I04	BB	35-0	23	111	66	1	22	4,35%	95,65%	31	391
116	2015	I05	CL	35-0	23	139	70	1	22	4,35%	95,65%	40	600
117	2015	I06	CL	37-0	23	304	75	5	18	21,74%	78,26%	127	1 425
118	2015	I07	BB	40-0	23	101	143	3	20	13,04%	86,96%	11	1 163
119	2015	I08	BB	40-0	23	311	60	5	18	21,74%	78,26%	96	1 100
120	2015	I09	BB	44-0	23	283	50	6	17	26,09%	73,91%	153	882
121	2015	I10	BB	44-0	23	129	84	3	20	13,04%	86,96%	28	522
122	2015	I11	BB	46-0	23	462	162	12	11	52,17%	47,83%	149	6 012
123	2015	I12	BB	49-0	23	64	137	2	21	8,70%	91,30%	1	765
124	2015	I13	BB	60-0	23	360	118	9	14	39,13%	60,87%	93	3 114
125	2015	I14	BB	60-0	23	156	106	1	22	4,35%	95,65%	78	1 097
126	2015	I15	BB	60-0	23	327	109	10	13	43,48%	56,52%	49	2 050

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
127	2015	I16	BB	60-0	23	162	36	0	23	0,00%	100,00%	52	316
128	2015	I17	BB	76-0	24	200	66	5	19	20,83%	79,17%	1	774
129	2016	J01	BB	23-0	20	695	50	16	4	80,00%	20,00%	287	1 614
130	2016	J02	BB	24-0	24	285	49	5	19	20,83%	79,17%	108	820
131	2016	J03	BB	24-0	23	556	62	17	6	73,91%	26,09%	149	1 833
132	2016	J04	BB	24-0	23	434	69	13	10	56,52%	43,48%	158	1 490
133	2016	J05	BB	24-0	23	410	93	14	9	60,87%	39,13%	40	2 491
134	2016	J06	BB	24-0	22	243	135	4	18	18,18%	81,82%	67	2 309
135	2016	J07	BB	25-0	23	291	102	7	16	30,43%	69,57%	104	1 928
136	2016	J08	BB	25-0	20	193	96	4	16	20,00%	80,00%	21	1 140
137	2016	J09	BB	25-0	20	298	54	9	11	45,00%	55,00%	63	783
138	2016	J10	BB	26-0	23	407	111	8	15	34,78%	65,22%	141	3 031
139	2016	J11	BB	26-0	20	290	161	6	14	30,00%	70,00%	112	3 327
140	2016	J12	BB	33-0	23	489	108	13	10	56,52%	43,48%	151	2 981
141	2016	J13	BB	34-0	23	461	73	13	10	56,52%	43,48%	203	2 040
142	2016	J14	BB	35-0	23	315	59	8	15	34,78%	65,22%	112	845
143	2016	J15	BB	36-0	24	127	129	2	22	8,33%	91,67%	18	1 185
144	2016	J16	BB	40-0	25	269	31	4	21	16,00%	84,00%	158	493
145	2016	J17	BB	40-0	25	268	31	3	22	12,00%	88,00%	110	454
146	2016	J18	BB	40-0	25	201	63	5	20	20,00%	80,00%	41	701
147	2016	J19	BB	41-0	22	418	61	10	12	45,45%	54,55%	245	1 360

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
148	2016	J20	BB	43-0	23	1 089	97	18	5	78,26%	21,74%	270	5 971
149	2016	J21	BB	44-0	23	1 138	84	20	3	86,96%	13,04%	178	4 587
150	2016	J22	BB	57-0	23	944	96	15	8	65,22%	34,78%	115	5 000
151	2016	J23	BB	58-0	23	144	78	4	19	17,39%	82,61%	41	553
152	2016	J24	BB	60-0	20	131	152	3	17	15,00%	85,00%	33	1 434
153	2016	J25	BB	60-0	23	57	100	1	22	4,35%	95,65%	1	522
154	2016	J26	BB	60-0	22	326	143	10	12	45,45%	54,55%	31	4 816
155	2016	J27	BB	60-0	17	179	125	3	14	17,65%	82,35%	41	1 295
156	2016	J28	BB	70-0	12	521	108	7	5	58,33%	41,67%	114	2 979
157	2016	J29	BB	77-0	19	1 162	97	16	3	84,21%	15,79%	331	5 302
158	2017	K01	BB	22-0	23	424	114	12	11	52,17%	47,83%	93	2 837
159	2017	K02	BB	22-0	23	503	95	11	12	47,83%	52,17%	239	2 750
160	2017	K03	BB	25-0	23	426	33	13	10	56,52%	43,48%	213	762
161	2017	K04	BB	28-0	23	203	43	2	21	8,70%	91,30%	104	498
162	2017	K05	BB	30-0	23	180	46	2	21	8,70%	91,30%	63	436
163	2017	K06	BB	30-0	23	262	50	4	19	17,39%	82,61%	112	604
164	2017	K07	BB	35-0	23	155	66	1	22	4,35%	95,65%	47	539
165	2017	K08	BB	35-0	23	118	48	0	23	0,00%	100,00%	1	321
166	2017	K09	BB	35-0	23	176	39	1	22	4,35%	95,65%	78	400
167	2017	K10	BB	35-0	25	237	194	4	21	16,00%	84,00%	110	3 771
168	2017	K11	BB	35-0	25	136	55	0	25	0,00%	100,00%	13	344

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
169	2017	K12	BB	35-0	23	541	158	13	10	56,52%	43,48%	131	6 708
170	2017	K13	BB	37-0	23	33	234	3	20	13,04%	86,96%	1	2 125
171	2017	K14	BB	39-0	23	496	162	13	10	56,52%	43,48%	258	5 905
172	2017	K15	BB	40-0	23	298	128	6	17	26,09%	73,91%	78	2 324
173	2017	K16	BB	40-0	23	1 270	97	23	0	100,00%	0,00%	395	5 781
174	2017	K17	BB	40-0	23	241	70	8	15	34,78%	65,22%	1	1 128
175	2017	K18	CL	41-0	23	155	94	3	20	13,04%	86,96%	21	952
176	2017	K19	BB	42-0	23	285	147	8	15	34,78%	65,22%	78	3 257
177	2017	K20	BB	43-0	23	160	263	1	22	4,35%	95,65%	33	4 757
178	2017	K21	BB	43-0	23	478	129	12	11	52,17%	47,83%	33	4 568
179	2017	K22	BB	45-0	23	270	158	5	18	21,74%	78,26%	47	3 419
180	2017	K23	BB	45-0	23	223	64	4	19	17,39%	82,61%	57	769
181	2017	K24	BB	46-0	23	519	108	12	11	52,17%	47,83%	139	3 236
182	2017	K25	BB	48-0	23	152	47	1	22	4,35%	95,65%	65	445
183	2017	K26	BB	48-0	23	605	100	12	11	52,17%	47,83%	125	3 283
184	2017	K27	BB	49-0	23	641	99	14	9	60,87%	39,13%	76	3 734
185	2017	K28	BB	52-0	23	494	132	10	13	43,48%	56,52%	40	5 562
186	2017	K29	BB	55-0	22	205	69	3	19	13,64%	86,36%	41	824
187	2017	K30	BB	56-0	23	596	105	16	7	69,57%	30,43%	104	4 108
188	2017	K31	BB	57-0	23	39	65	0	23	0,00%	100,00%	5	123
189	2017	K32	BB	59-0	23	130	53	0	23	0,00%	100,00%	50	338

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max
190	2017	K33	BB	59-0	23	182	53	1	22	4,35%	95,65%	45	395
191	2017	K34	BB	60-0	23	50	77	0	23	0,00%	100,00%	13	248
192	2017	K35	BB	60-0	23	134	93	2	21	8,70%	91,30%	33	794
193	2017	K36	BB	60-0	21	102	52	0	21	0,00%	100,00%	41	248
194	2017	K37	BB	60-0	23	42	58	0	23	0,00%	100,00%	1	121
195	2017	K38	BB	60-0	23	95	151	8	15	34,78%	65,22%	1	2 598
196	2017	K39	BB	61-0	22	108	92	1	21	4,55%	95,45%	33	606
197	2018	L01	BB	10-0	23	42	55	0	23	0,00%	100,00%	10	104
198	2018	L02	BB	19-0	21	60	74	0	21	0,00%	100,00%	5	237
199	2018	L03	BB	20-0	23	182	77	3	20	13,04%	86,96%	38	714
200	2018	L04	BB	20-0	23	191	64	2	21	8,70%	91,30%	63	671
201	2018	L05	BB	20-0	23	171	62	1	22	4,35%	95,65%	21	620
202	2018	L06	BB	22-0	23	114	54	0	23	0,00%	100,00%	41	312
203	2018	L07	BB	22-0	23	200	77	1	22	4,35%	95,65%	72	996
204	2018	L08	BB	22-0	23	174	72	4	19	17,39%	82,61%	40	626
205	2018	L09	BB	23-0	23	170	106	2	21	8,70%	91,30%	18	1 163
206	2018	L10	BB	25-0	23	90	236	3	20	13,04%	86,96%	1	3 361
207	2018	L11	BB	26-0	23	65	64	0	23	0,00%	100,00%	29	233
208	2018	L12	BB	27-0	24	83	75	0	24	0,00%	100,00%	8	361
209	2018	L13	BB	28-0	21	58	164	2	19	9,52%	90,48%	2	996
210	2018	L14	BB	30-0	23	58	186	6	17	26,09%	73,91%	1	3 440

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowiec)	NEG (surowiec)	%POS (surowiec)	%NEG (surowiec)	Min	Max
211	2018	L15	BB	30-0	23	1	300	0	23	0,00%	100,00%	1	45
212	2018	L16	BB	30-0	23	91	65	0	23	0,00%	100,00%	21	340
213	2018	L17	BB	30-0	23	109	48	0	23	0,00%	100,00%	40	281
214	2018	L18	BB	30-0	23	154	78	2	21	8,70%	91,30%	47	705
215	2018	L19	BB	30-0	23	142	51	1	22	4,35%	95,65%	59	408
216	2018	L20	BB	31-0	23	72	223	1	22	4,35%	95,65%	8	1 890
217	2018	L21	BB	32-0	23	192	202	4	19	17,39%	82,61%	61	3 811
218	2018	L22	BB	32-0	23	129	84	2	21	8,70%	91,30%	49	624
219	2018	L23	BB	32-0	23	101	108	1	22	4,35%	95,65%	45	719
220	2018	L24	BB	33-0	23	4	196	0	23	0,00%	100,00%	1	199
221	2018	L25	BB	34-0	23	132	78	3	20	13,04%	86,96%	1	640
222	2018	L26	BB	35-0	23	16	169	3	20	13,04%	86,96%	1	1 050
223	2018	L27	BB	42-0	23	116	49	0	23	0,00%	100,00%	8	340
224	2018	L28	BB	42-0	23	112	57	0	23	0,00%	100,00%	1	370
225	2018	L29	BB	45-0	23	16	285	2	21	8,70%	91,30%	1	3 761
226	2018	L30	BB	52-0	23	162	139	9	14	39,13%	60,87%	1	3 142
227	2018	L31	BB	52-0	23	418	119	8	15	34,78%	65,22%	63	3 254
228	2018	L32	BB	55-0	23	397	113	11	12	47,83%	52,17%	31	3 306
229	2018	L33	BB	56-0	24	61	95	0	24	0,00%	100,00%	19	338
230	2018	L34	BB	56-0	23	55	61	0	23	0,00%	100,00%	1	176

Tab. 52. Wyniki ELISA stad CB w latach 2010, 2014 oraz 2019.

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max	województwo	EWW
1	2010	A01	CB	0-1	23	55	68	0	23	0,00%	100,00%	10	184	podlaskie	320
2	2010	A02	CB	0-1	23	45	82	0	23	0,00%	100,00%	19	233	wielkopolskie	274
3	2010	A03	CB	0-1	23	114	180	4	19	17,40%	82,60%	34	2 027	śląskie	304
4	2010	A04	CB	0-1	23	62	123	1	22	4,50%	95,50%	13	551	mazowieckie	337
5	2010	A05	CB	0-1	23	17	138	0	23	0,00%	100,00%	1	264	mazowieckie	353
6	2010	A06	CB	0-1	23	103	210	4	19	17,40%	82,60%	1	3 547	mazowieckie	311
7	2010	A07	CB	0-1	23	10	116	0	23	0,00%	100,00%	1	117	mazowieckie	312
8	2010	A08	CB	0-1	23	178	141	8	15	34,80%	65,20%	1	3 348	mazowieckie	333
9	2010	A09	CB	0-1	23	3	141	0	23	0,00%	100,00%	1	41	mazowieckie	303
10	2010	A10	CB	0-1	22	7	243	1	21	4,50%	95,50%	1	500	mazowieckie	283
11	2010	A11	CB	0-1	23	11	161	0	23	0,00%	100,00%	1	279	pomorskie	309
12	2010	A12	CB	0-1	23	32	330	2	21	8,70%	91,30%	1	3 568	pomorskie	289
13	2010	A13	CB	0-1	23	1	353	0	23	0,00%	100,00%	1	52	lubelskie	256
14	2010	A14	CB	0-1	23	3	426	1	22	4,40%	95,60%	1	2 660	lubelskie	270
15	2010	A15	CB	0-1	23	5	307	2	21	8,70%	91,30%	1	1 693	podlaskie	310
16	2010	A16	CB	0-1	23	3	347	1	22	4,40%	95,60%	1	801	kujawsko-pomorskie	279
17	2010	A17	CB	0-1	22	17	105	0	22	0,00%	100,00%	1	168	kujawsko-pomorskie	262
18	2010	A18	CB	0-1	22	5	343	1	21	4,50%	95,50%	1	749	kujawsko-pomorskie	278
19	2010	A19	CB	0-1	22	8	160	0	22	0,00%	100,00%	1	229	wielkopolskie	341,5
20	2010	A20	CB	0-1	23	6	175	0	23	0,00%	100,00%	1	211	wielkopolskie	341,5

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max	województwo	EWW
21	2014	B01	CB	0-1	23	162	145	8	15	34,78%	65,22%	1	3 941	małopolskie	321,6
22	2014	B02	CB	0-1	23	83	52	0	23	0,00%	100,00%	1	223	małopolskie	358,6
23	2014	B03	CB	0-1	23	63	55	0	23	0,00%	100,00%	1	174	pomorskie	313
24	2014	B04	CB	0-1	23	54	81	0	23	0,00%	100,00%	1	225	pomorskie	318
25	2014	B05	CB	0-1	23	51	198	2	21	8,70%	91,30%	1	1 340	pomorskie	307
26	2014	B06	CB	0-1	23	129	59	0	23	0,00%	100,00%	36	378	wielkopolskie	313
27	2014	B07	CB	0-1	23	120	207	2	21	8,70%	91,30%	28	2 673	mazowieckie	322,7
28	2014	B08	CB	0-1	23	72	232	4	19	17,39%	82,61%	1	2 780	pomorskie	253
29	2014	B09	CB	0-1	23	86	186	3	20	13,04%	86,96%	1	2 007	lubelskie	391
30	2014	B10	CB	0-1	23	104	94	3	20	13,04%	86,96%	18	480	podlaskie	316,1
31	2014	B11	CB	0-1	23	148	170	4	19	17,39%	82,61%	18	2 271	pomorskie	b.d.
32	2014	B12	CB	0-1	23	75	191	4	19	17,39%	82,61%	1	2 145	pomorskie	348
33	2014	B13	CB	0-1	23	168	122	9	14	39,13%	60,87%	1	2 829	opolskie	273
34	2014	B14	CB	0-1	23	64	191	6	17	26,09%	73,91%	1	3 272	mazowieckie	370,7
35	2014	B15	CB	0-1	23	255	96	12	11	52,17%	47,83%	1	2 231	opolskie	295
36	2014	B16	CB	0-1	23	64	227	2	21	8,70%	91,30%	1	2 408	mazowieckie	380
37	2014	B17	CB	0-1	23	119	166	5	18	21,74%	78,26%	7	2 415	opolskie	319
38	2014	B18	CB	0-1	23	79	145	5	18	21,74%	78,26%	1	1 287	mazowieckie	330
39	2014	B19	CB	0-1	23	88	158	6	17	26,09%	73,91%	1	1 975	warmińsko-mazurskie	389
40	2014	B20	CB	0-1	23	119	136	4	19	17,39%	82,61%	1	1 488	opolskie	344

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max	województwo	EWW
41	2014	B21	CB	0-1	23	89	113	1	22	4,35%	95,65%	1	776	opolskie	339
42	2014	B22	CB	0-1	23	82	50	0	23	0,00%	100,00%	16	213	lubelskie	320
43	2014	B23	CB	0-1	23	103	57	0	23	0,00%	100,00%	45	308	podkarpackie	301,6
44	2014	B24	CB	0-1	23	158	133	1	22	4,35%	95,65%	63	1 471	mazowieckie	309
45	2014	B25	CB	0-1	23	75	176	1	22	4,35%	95,65%	1	1 316	wielkopolskie	304
46	2014	B26	CB	0-1	23	144	72	2	21	8,70%	91,30%	67	602	pomorskie	296,7
47	2014	B27	CB	0-1	23	111	194	2	21	8,70%	91,30%	16	2 005	podlaskie	368
48	2014	B28	CB	0-1	23	134	90	3	20	13,04%	86,96%	33	651	kujawsko-pomorskie	b.d.
49	2014	B29	CB	0-1	23	27	81	0	23	0,00%	100,00%	1	143	mazowieckie	355,6
50	2014	B30	CB	0-1	23	48	69	0	23	0,00%	100,00%	1	217	zachodniopomorskie	b.d.
51	2014	B31	CB	0-1	23	61	148	3	20	13,04%	86,96%	1	905	opolskie	b.d.
52	2014	B32	CB	0-1	23	23	175	2	21	8,70%	91,30%	1	891	zachodniopomorskie	b.d.
53	2014	B33	CB	0-1	23	142	205	4	19	17,39%	82,61%	16	3 626	mazowieckie	345
54	2014	B34	CB	0-1	23	166	168	5	18	21,74%	78,26%	4	2 981	mazowieckie	b.d.
55	2014	B35	CB	0-1	23	34	63	0	23	0,00%	100,00%	1	131	mazowieckie	335
56	2014	B36	CB	0-1	23	18	151	0	23	0,00%	100,00%	1	385	mazowieckie	346
57	2019	C01	CB	0-1	23	7	274	3	20	13,04%	86,96%	1	1 544	podlaskie	378
58	2019	C02	CB	0-1	23	1	250	0	23	0,00%	100,00%	1	21	podlaskie	461
59	2019	C03	CB	0-1	23	7	275	2	21	8,70%	91,30%	1	905	zachodniopomorskie	370
60	2019	C04	CB	0-1	23	2	379	1	22	4,35%	95,65%	1	1 437	mazowieckie	360

Załącznik

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowiec)	NEG (surowiec)	%POS (surowiec)	%NEG (surowiec)	Min	Max	województwo	EWW
61	2019	C05	CB	0-1	23	44	79	0	23	0,00%	100,00%	1	186	mazowieckie	348
62	2019	C06	CB	0-1	23	17	85	0	23	0,00%	100,00%	1	102	mazowieckie	349
63	2019	C07	CB	0-1	23	25	282	2	21	8,70%	91,30%	1	1 997	mazowieckie	377
64	2019	C08	CB	0-1	23	37	255	2	21	8,70%	91,30%	1	2 087	podlaskie	390
65	2019	C09	CB	0-1	23	8	93	0	23	0,00%	100,00%	1	57	podlaskie	371
66	2019	C10	CB	0-1	23	3	100	0	23	0,00%	100,00%	1	14	opolskie	310
67	2019	C11	CB	0-1	23	2	167	0	23	0,00%	100,00%	1	24	opolskie	312
68	2019	C12	CB	0-1	23	6	115	0	23	0,00%	100,00%	1	52	pomorskie	328
69	2019	C13	CB	0-1	23	2	167	0	23	0,00%	100,00%	1	21	podlaskie	412
70	2019	C14	CB	0-1	23	2	267	0	23	0,00%	100,00%	1	155	podlaskie	417
71	2019	C15	CB	0-1	23	2	466	1	22	4,35%	95,65%	1	1 524	mazowieckie	372
72	2019	C16	CB	0-1	23	2	231	0	23	0,00%	100,00%	1	135	mazowieckie	342
73	2019	C17	CB	0-1	23	163	124	7	16	30,43%	69,57%	19	1 663	mazowieckie	400
74	2019	C18	CB	0-1	23	26	246	3	20	13,04%	86,96%	1	2 296	podlaskie	401
75	2019	C19	CB	0-1	23	16	65	0	23	0,00%	100,00%	1	54	podlaskie	384
76	2019	C20	CB	0-1	23	20	72	0	23	0,00%	100,00%	5	89	podlaskie	396
77	2019	C21	CB	0-1	23	14	173	0	23	0,00%	100,00%	1	229	kujawsko-pomorskie	357
78	2019	C22	CB	0-1	23	7	161	0	23	0,00%	100,00%	1	123	kujawsko-pomorskie	332
79	2019	C23	CB	0-1	23	101	155	7	16	30,43%	69,57%	5	2 193	pomorskie	364,3
80	2019	C24	CB	0-1	23	9	95	0	23	0,00%	100,00%	1	57	pomorskie	421

L.p.	Rok	Stado	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	N	Gmean	%CV	POS (surowic)	NEG (surowic)	%POS (surowic)	%NEG (surowic)	Min	Max	województwo	EWW
81	2019	C25	CB	0-1	23	51	125	1	22	4,35%	95,65%	1	579	zachodniopomorskie	356,4
82	2019	C26	CB	0-1	23	18	78	0	23	0,00%	100,00%	1	81	zachodniopomorskie	329,8
83	2019	C27	CB	0-1	23	17	138	0	23	0,00%	100,00%	1	229	mazowieckie	306
84	2019	C28	CB	0-1	23	24	74	0	23	0,00%	100,00%	1	119	mazowieckie	328
85	2019	C29	CB	0-1	23	27	281	2	21	8,70%	91,30%	2	1 908	mazowieckie	412
86	2019	C30	CB	0-1	23	13	238	1	22	4,35%	95,65%	1	473	mazowieckie	399
87	2019	C31	CB	0-1	23	10	295	2	21	8,70%	91,30%	1	1 578	kujawsko-pomorskie	352
88	2019	C32	CB	0-1	23	10	210	2	21	8,70%	91,30%	1	452	wielkopolskie	290
89	2019	C33	CB	0-1	23	10	161	0	23	0,00%	100,00%	1	145	wielkopolskie	312
90	2019	C34	CB	0-1	23	9	145	0	23	0,00%	100,00%	1	149	pomorskie	326
91	2019	C35	CB	0-1	23	11	75	0	23	0,00%	100,00%	1	40	pomorskie	367
92	2019	C36	CB	0-1	23	3	125	0	23	0,00%	100,00%	1	16	mazowieckie	370
93	2010	A10	CB	3-0	22	7	239	1	21	4,55%	95,45%	1	493	mazowieckie	283

Tab. 53. Wyniki badań molekularnych w kierunku wykrycia genu kodującego helikazę (fragment ORF1) aHEV stad BB (n=45) i CL (n=3).

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
1	001W	wątroba	BB	37-0	2014	pozytywny	not aHEV (brak pokrycia z bazą)		6
2	001Ś	śledziona	BB	37-0	2014	negatywny			6
3	001Ż	żółć	BB	37-0	2014	pozytywny	aHEV (F-96,3%; R-85,5%)	PP761497	4
4	002W	wątroba	BB	27-0	2014	negatywny			5
5	002Ś	śledziona	BB	27-0	2014	negatywny			5
6	002Ż	żółć	BB	27-0	2014	pozytywny	aHEV (F-97,6%; R-97,7%)	PP805941	5
7	003W	wątroba	BB	48-0	2014	pozytywny	aHEV (F-94,0%; R-88,7%)	PP817247	4
8	003Ś	śledziona	BB	48-0	2014	negatywny			4
9	003Ż	żółć	BB	48-0	2014	pozytywny	aHEV (F-90,4%; R-87,1%)	PP938432	4
10	004W	wątroba	BB	44-0	2015	negatywny			3
11	004Ś	śledziona	BB	44-0	2015	pozytywny	aHEV (F-100,0%; R-91,8%)	PP895203	3
12	004Ż	żółć	BB	44-0	2015	negatywny			3
13	005W	wątroba	BB	35-0	2015	negatywny			5
14	005Ś	śledziona	BB	35-0	2015	negatywny			5
15	005Ż	żółć	BB	35-0	2015	negatywny			5
16	006W	wątroba	BB	44-0	2015	negatywny			5
17	006Ś	śledziona	BB	44-0	2015	negatywny			5
18	006Ż	żółć	BB	44-0	2015	negatywny			5
19	007W	wątroba	BB	40-0	2015	negatywny			5
20	007Ś	śledziona	BB	40-0	2015	negatywny			5

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek piaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
21	007Ż	żółć	BB	40-0	2015	negatywny			5
22	008W	wątroba	CL	35-0	2015	negatywny			5
23	008Ś	śledziona	CL	35-0	2015	negatywny			5
24	008Ż	żółć	CL	35-0	2015	negatywny			5
25	009W	wątroba	BB	40-0	2015	negatywny			3
26	009Ś	śledziona	BB	40-0	2015	negatywny			3
27	009Ż	żółć	BB	40-0	2015	negatywny			3
28	010W	wątroba	BB	28-0	2015	negatywny			4
29	010Ś	śledziona	BB	28-0	2015	negatywny			4
30	010Ż	żółć	BB	28-0	2015	negatywny			3
31	011W	wątroba	BB	b.d.	2015	negatywny			5
32	011Ś	śledziona	BB	b.d.	2015	negatywny			5
33	012W	wątroba	BB	30-0	2015	negatywny			3
34	012Ś	śledziona	BB	30-0	2015	negatywny			3
35	012Ż	żółć	BB	30-0	2015	negatywny			3
36	014W	wątroba	BB	30-0	2015	negatywny			5
37	014Ś	śledziona	BB	30-0	2015	negatywny			5
38	014Ż	żółć	BB	30-0	2015	negatywny			4
39	015W	wątroba	BB	34-0	2016	negatywny			2
40	015Ś	śledziona	BB	34-0	2016	negatywny			2

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
41	015Ż	żółć	BB	34-0	2016	negatywny			2
42	017W	wątroba	BB	20-0	2017	negatywny			7
43	017Ś	śledziona	BB	20-0	2017	negatywny			9
44	017Ż	żółć	BB	20-0	2017	negatywny			8
45	018W	wątroba	BB	43-0	2017	pozytywny	aHEV (F-98,1%; R-96,8%)	PP770537	3
46	018Ś	śledziona	BB	43-0	2017	negatywny			3
47	018Ż	żółć	BB	43-0	2017	pozytywny	aHEV (F-97,7%; R-96,0%)	PP831474	2
48	018WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	43-0	2017	pozytywny	aHEV (F-96,9%; R-91,1%)	PP831473	2
49	019W	wątroba	BB	35-0	2017	negatywny			3
50	019Ś	śledziona	BB	35-0	2017	pozytywny	aHEV (F-94,1%; R-93,9%)	PP817248	3
51	019Ż	żółć	BB	35-0	2017	negatywny			3
52	020W	wątroba	BB	36-0	2017	pozytywny	aHEV (F-91,5%; R-86,4%)	PP817249	5
53	020Ś	śledziona	BB	36-0	2017	negatywny			5
54	020Ż	żółć	BB	36-0	2017	pozytywny	aHEV (F-91,0%; R-85,2%)	PP831475	5
55	021W	wątroba	BB	48-0	2017	negatywny			3
56	021Ś	śledziona	BB	48-0	2017	pozytywny	aHEV (F-94,3%; R-96,0%)	PP820889	3
57	021Ż	żółć	BB	48-0	2017	pozytywny	aHEV (F-90,8%; R-88,5%)	PP831476	3
58	022W	wątroba	BB	59-0	2017	negatywny			4
59	022Ś	śledziona	BB	59-0	2017	pozytywny	aHEV (F-97,1%; R-96,4%)	PP820890	4
60	022Ż	żółć	BB	59-0	2017	pozytywny	aHEV (F-97,5%; R-96,9%)	PP831477	3

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
61	023W	wątroba	BB	30-0	2017	negatywny			4
62	023Ś	śledziona	BB	30-0	2017	pozytywny	aHEV (F-96,1%; R-96,4%)	PP820891	4
63	023Ż	żółć	BB	30-0	2017	negatywny			4
64	024W	wątroba	BB	61-0	2017	negatywny			4
65	024Ś	śledziona	BB	61-0	2017	negatywny			4
66	024Ż	żółć	BB	61-0	2017	negatywny			3
67	025W	wątroba	BB	55-0	2017	negatywny			4
68	025Ś	śledziona	BB	55-0	2017	negatywny			4
69	025Ż	żółć	BB	55-0	2017	negatywny			4
70	026W	wątroba	BB	30-0	2017	negatywny			5
71	026Ś	śledziona	BB	30-0	2017	pozytywny	aHEV (F-96,2%; R-95,6%)	PP820892	5
72	026Ż	żółć	BB	30-0	2017	negatywny			5
73	027W	wątroba	BB	34-0	2013	negatywny			4
74	027Ś	śledziona	BB	34-0	2013	negatywny			4
75	027Ż	żółć	BB	34-0	2013	negatywny			3
76	027WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	34-0	2013	negatywny			3
77	028W	wątroba	BB	34-0	2013	negatywny			3
78	028Ś	śledziona	BB	34-0	2013	pozytywny	aHEV (F-97,1%; R-97,5%)	PP770538	3
79	028Ż	żółć	BB	34-0	2013	negatywny			7
80	028WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	34-0	2013	negatywny			3

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
81	029W	wątroba	BB	34-0	2013	negatywny			3
82	029Ś	śledziona	BB	34-0	2013	pozytywny	aHEV (F-98,1%; R-90,9%)	PP820893	3
83	029Ż	żółć	BB	34-0	2013	negatywny			3
84	029WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	34-0	2013	negatywny			3
85	030W	wątroba	BB	40-0	2015	negatywny			1
86	030Ś	śledziona	BB	40-0	2015	negatywny			1
87	031Ż	żółć	BB	41-0	2011	pozytywny	aHEV (F-92,4%; R-92,6%)	PP770539	3
88	031WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	41-0	2011	pozytywny	aHEV (F-93,8%; R-89,6%)	PP831478	3
89	032W	wątroba	BB	38-0	2011	negatywny			3
90	032Ż	żółć	BB	38-0	2011	negatywny			3
91	032WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	38-0	2011	negatywny			3
92	033W	wątroba	CL	młoda	2011	negatywny			1
93	034W	wątroba	BB	46-0	2012	pozytywny	aHEV (F-98,9%; R-97,4%)	PP770540	1
94	034Ś	śledziona	BB	46-0	2012	negatywny			1
95	034Ż	żółć	BB	46-0	2012	pozytywny	aHEV (F-99,0%; R-97,4%)	PP831479	1
96	034WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	46-0	2012	negatywny			1
97	035W	wątroba	BB	31-0	2012	negatywny			2
98	035Ś	śledziona	BB	31-0	2012	negatywny			2
99	035Ż	żółć	BB	31-0	2012	pozytywny	aHEV (F-99,4%; R-97,1%)	PP820894	2
100	035WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	31-0	2012	pozytywny	aHEV (F-94,0%; R-97,0%)	PP831480	2

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
101	036W	wątroba	BB	41-0	2012	negatywny			2
102	036Ś	śledziona	BB	41-0	2012	negatywny			2
103	036Ż	żółć	BB	41-0	2012	negatywny			2
104	036WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	41-0	2012	negatywny			2
105	037W	wątroba	CL	41-0	2017	negatywny			4
106	037Ś	śledziona	CL	41-0	2017	negatywny			4
107	037Ż	żółć	CL	41-0	2017	pozytywny	aHEV (F-86,6%; R-84,3%)	PP805942	4
108	038W	wątroba	BB	44-0	2018	negatywny			5
109	038Ś	śledziona	BB	44-0	2018	negatywny			5
110	038Ż	żółć	BB	44-0	2018	negatywny			5
111	039W	wątroba	BB	22-0	2018	negatywny			4
112	039Ś	śledziona	BB	22-0	2018	negatywny			2
113	039Ż	żółć	BB	22-0	2018	negatywny			3
114	040Ż	żółć	BB	22-0	2018	negatywny			4
115	041W	wątroba	BB	56-0	2018	negatywny			6
116	041Ś	śledziona	BB	56-0	2018	negatywny			6
117	041Ż	żółć	BB	56-0	2018	negatywny			6
118	042W	wątroba	BB	56-0	2018	negatywny			6
119	042Ś	śledziona	BB	56-0	2018	negatywny			6
120	042Ż	żółć	BB	56-0	2018	negatywny			4

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
121	043W	wątroba	BB	41-0	2018	negatywny			1
122	043Ś	śledziona	BB	41-0	2018	negatywny			1
123	044W	wątroba	BB	41-0	2018	pozytywny	aHEV (F-86,3%; R-86,7%)	PP770541	1
124	044Ś	śledziona	BB	41-0	2018	negatywny			1
125	044Ż	żółć	BB	41-0	2018	pozytywny	aHEV (F-88,1%; R-85,8%)	PP831481	1
126	045W	wątroba	BB	41-0	2018	negatywny			1
127	045Ś	śledziona	BB	41-0	2018	negatywny			1
128	045Ż	żółć	BB	41-0	2018	pozytywny	aHEV (F-91,0%; R-85,6%)	PP820895	1
129	046W	wątroba	BB	41-0	2018	negatywny			2
130	046Ś	śledziona	BB	41-0	2018	negatywny			2
131	046Ż	żółć	BB	41-0	2018	negatywny			2
132	047W	wątroba	BB	30-0	2018	negatywny			4
133	047Ś	śledziona	BB	30-0	2018	negatywny			4
134	047Ż	żółć	BB	30-0	2018	negatywny			4
135	048W	wątroba	BB	46-0	2018	negatywny			8
136	048Ś	śledziona	BB	46-0	2018	negatywny			6
137	048Ż	żółć	BB	46-0	2018	negatywny			3
138	049W	wątroba	BB	50-0	2018	negatywny			4
139	049Ś	śledziona	BB	50-0	2018	negatywny			4
140	049Ż	żółć	BB	50-0	2018	negatywny			3

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
141	050W	wątroba	BB	26-0	2019	pozytywny	aHEV (F- - ; R-98,5%)	PP770542	4
142	050Ś	śledziona	BB	26-0	2019	negatywny			4
143	050Ż	żółć	BB	26-0	2019	negatywny			4
144	Z1W	wątroba	zarodki	15 di (10 dpi)	2013	negatywny			1
145	Z1WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	15 di (10 dpi)	2013	negatywny			1
146	Z2W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
147	Z2WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
148	Z3W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
149	Z3WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
150	Z4W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
151	Z4WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
152	Z5W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
153	Z5WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
154	Z6W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
155	Z6WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
156	Z7W	wątroba	zarodki	16 di (11 dpi)	2013	negatywny			1
157	Z7WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	16 di (11dpi)	2013	negatywny			1
158	Z8W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
159	Z8WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1
160	Z9W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny			1

Załącznik

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
161	Z9WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13dpi)	2013	negatywny			1
162	W18-01	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	pozytywny	b.d.		1
163	W19-01	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny			1
164	W18-02	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny			1
165	W19-02	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny			1
166	W18-03	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny			1
167	W19-03	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny			1
168	W18-04	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	pozytywny	b.d.		1
169	W19-04	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny			1
170	W18-05	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny			1
171	W19-05	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny			1
172	W18-06	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny			1
173	W19-06	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny			1
174	W18-07	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny			1
175	W19-07	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny			1

*Wynik sekwencjonowania analizowany przy użyciu narzędzia BLAST (NCBI) za pomocą oprogramowania Geneious Prime (wersja: 2019.2.3) programem blastn oraz megablast w dniu 02.04.2024.

Tab. 54. Wyniki badań molekularnych w kierunku wykrycia genu kodującego białko kapsydu (ORF2) aHEV stad BB (n=45) i CL (n=3).

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
1	001W	wątroba	BB	37-0	2014	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,6%; R-83,7%)	PP132856	6
2	001Ś	śledziona	BB	37-0	2014	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,6%; R-87,0%)	PP132855	6
3	001Ż	żółć	BB	37-0	2014	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,8%; R-84,9%)	PP198034	4
4	002W	wątroba	BB	27-0	2014	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-84,6%; R-83,9%)	PP817250	5
5	002Ś	śledziona	BB	27-0	2014	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,4%; R-83,7%)		5
6	002Ż	żółć	BB	27-0	2014	negatywny	negatywny			5
7	003W	wątroba	BB	48-0	2014	pozytywny	negatywny	aHEV (F-93,0%; R-92,6%)	PP817251	4
8	003Ś	śledziona	BB	48-0	2014	negatywny	negatywny			4
9	003Ż	żółć	BB	48-0	2014	negatywny	negatywny			4
10	004W	wątroba	BB	44-0	2015	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-85,6%; R-86,2%)	PP770543	3
11	004Ś	śledziona	BB	44-0	2015	pozytywny	negatywny	aHEV (F-85,1%; R-86,1%)		3
12	004Ż	żółć	BB	44-0	2015	negatywny	negatywny			3
13	005W	wątroba	BB	35-0	2015	negatywny	negatywny			5
14	005Ś	śledziona	BB	35-0	2015	negatywny	negatywny			5
15	005Ż	żółć	BB	35-0	2015	negatywny	negatywny			5
16	006W	wątroba	BB	44-0	2015	negatywny	negatywny			5
17	006Ś	śledziona	BB	44-0	2015	negatywny	negatywny			5
18	006Ż	żółć	BB	44-0	2015	pozytywny	negatywny	aHEV (F-95,5%; R-85,4%)		5
19	007W	wątroba	BB	40-0	2015	negatywny	negatywny			5
20	007Ś	śledziona	BB	40-0	2015	negatywny	negatywny			5

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
21	007Ż	żółć	BB	40-0	2015	negatywny	negatywny			5
22	008W	wątroba	CL	35-0	2015	negatywny	negatywny			5
23	008Ś	śledziona	CL	35-0	2015	negatywny	negatywny			5
24	008Ż	żółć	CL	35-0	2015	negatywny	negatywny			5
25	009W	wątroba	BB	40-0	2015	negatywny	negatywny			3
26	009Ś	śledziona	BB	40-0	2015	negatywny	negatywny			3
27	009Ż	żółć	BB	40-0	2015	negatywny	negatywny			3
28	010W	wątroba	BB	28-0	2015	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-88,7%; R-87,0%)	PP848093	4
29	010Ś	śledziona	BB	28-0	2015	negatywny	negatywny			4
30	010Ż	żółć	BB	28-0	2015	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,2%; R-85,9%)	PP848094	3
31	011W	wątroba	BB	b.d.	2015	negatywny	negatywny			5
32	011Ś	śledziona	BB	b.d.	2015	negatywny	negatywny			5
33	012W	wątroba	BB	30-0	2015	negatywny	negatywny			3
34	012Ś	śledziona	BB	30-0	2015	negatywny	negatywny			3
35	012Ż	żółć	BB	30-0	2015	negatywny	negatywny			3
36	014W	wątroba	BB	30-0	2015	negatywny	negatywny			5
37	014Ś	śledziona	BB	30-0	2015	negatywny	negatywny			5
38	014Ż	żółć	BB	30-0	2015	negatywny	negatywny			4
39	015W	wątroba	BB	34-0	2016	negatywny	negatywny			2
40	015Ś	śledziona	BB	34-0	2016	negatywny	negatywny			2

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
41	015Ż	żółć	BB	34-0	2016	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-87,3%; R-87,4%)	PP770544	2
42	017W	wątroba	BB	20-0	2017	negatywny	negatywny			7
43	017Ś	śledziona	BB	20-0	2017	negatywny	negatywny			9
44	017Ż	żółć	BB	20-0	2017	negatywny	negatywny			8
45	018W	wątroba	BB	43-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-98,4%; R-98,8%)	PP770545	3
46	018Ś	śledziona	BB	43-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-96,0%; R-97,6%)		3
47	018Ż	żółć	BB	43-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-98,8%; R-98,4%)		2
48	018WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	43-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-98,4%; R-98,4%)		2
49	019W	wątroba	BB	35-0	2017	negatywny	negatywny			3
50	019Ś	śledziona	BB	35-0	2017	negatywny	negatywny			3
51	019Ż	żółć	BB	35-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-95,6%; R-96,4%)	PP861031	3
52	020W	wątroba	BB	36-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,0%; R-85,2%)	PP861032	5
53	020Ś	śledziona	BB	36-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,1%; R-86,1%)		5
54	020Ż	żółć	BB	36-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,1%; R-86,1%)		5
55	021W	wątroba	BB	48-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-96,2%; R-96,9%)	PP861033	3
56	021Ś	śledziona	BB	48-0	2017	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-95,6%; R-94,4%)		3
57	021Ż	żółć	BB	48-0	2017	negatywny	negatywny			3
58	022W	wątroba	BB	59-0	2017	negatywny	negatywny			4
59	022Ś	śledziona	BB	59-0	2017	negatywny	negatywny			4
60	022Ż	żółć	BB	59-0	2017	negatywny	negatywny			3

Załącznik

Ilość badanych próbek	Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
3	61	023W	wątroba	BB	30-0	2017	negatywny	negatywny			4
3	62	023Ś	śledziona	BB	30-0	2017	negatywny	negatywny			4
3	63	023Ż	żółć	BB	30-0	2017	negatywny	negatywny			4
3	64	024W	wątroba	BB	61-0	2017	negatywny	negatywny			4
1	65	024Ś	śledziona	BB	61-0	2017	negatywny	negatywny			4
1	66	024Ż	żółć	BB	61-0	2017	negatywny	negatywny			3
3	67	025W	wątroba	BB	55-0	2017	negatywny	negatywny			4
3	68	025Ś	śledziona	BB	55-0	2017	negatywny	negatywny			4
3	69	025Ż	żółć	BB	55-0	2017	negatywny	negatywny			4
3	70	026W	wątroba	BB	30-0	2017	negatywny	negatywny			5
3	71	026Ś	śledziona	BB	30-0	2017	negatywny	negatywny			5
1	72	026Ż	żółć	BB	30-0	2017	negatywny	negatywny			5
1	73	027W	wątroba	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny			4
1	74	027Ś	śledziona	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny			4
1	75	027Ż	żółć	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny			3
1	76	027WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny			3
2	77	028W	wątroba	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny			3
2	78	028Ś	śledziona	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny			3
2	79	028Ż	żółć	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny			7
2	80	028WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny			3

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)
81	029W	wątroba	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny		
82	029Ś	śledziona	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny		
83	029Ż	żółć	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny		
84	029WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	34-0	2013	negatywny	negatywny		
85	030W	wątroba	BB	40-0	2015	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,8%; R-86,0%)	PP831471
86	030Ś	śledziona	BB	40-0	2015	negatywny	pozytywny	aHEV (F-86,5%; R-86,8%)	PP895207
87	031Ż	żółć	BB	41-0	2011	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-90,1%; R-90,3%)	PP770546
88	031WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	41-0	2011	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-90,6%; R-90,7%)	PP919452
89	032W	wątroba	BB	38-0	2011	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-90,1%; R-89,0%)	PP855991
90	032Ż	żółć	BB	38-0	2011	negatywny	pozytywny	aHEV (F-89,0%; R-89,4%)	
91	032WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	38-0	2011	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-89,4%; R-90,2%)	PP919453
92	033W	wątroba	CL	młoda	2011	negatywny	negatywny		
93	034W	wątroba	BB	46-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-92,9%; R-93,1%)	PP770547
94	034Ś	śledziona	BB	46-0	2012	negatywny	pozytywny	aHEV (F-87,4%; R-85,3%)	
95	034Ż	żółć	BB	46-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-93,3%; R-90,8%)	
96	034WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	46-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-92,9%; R-93,0%)	
97	035W	wątroba	BB	31-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-92,6%; R-93,2%)	PP855990
98	035Ś	śledziona	BB	31-0	2012	negatywny	negatywny		
99	035Ż	żółć	BB	31-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-93,3%; R-89,9%)	
100	035WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	31-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-92,1%; R-92,9%)	

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
101	036W	wątroba	BB	41-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,3%; R-86,7%)	PP848095	2
102	036Ś	śledziona	BB	41-0	2012	negatywny	negatywny			2
103	036Ż	żółć	BB	41-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-90,8%; R-91,3%)		2
104	036WŻ	pęcherzyk żółciowy	BB	41-0	2012	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-87,6%; R-88,0%)		2
105	037W	wątroba	CL	41-0	2017	negatywny	negatywny			4
106	037Ś	śledziona	CL	41-0	2017	negatywny	negatywny			4
107	037Ż	żółć	CL	41-0	2017	negatywny	negatywny			4
108	038W	wątroba	BB	44-0	2018	negatywny	negatywny			5
109	038Ś	śledziona	BB	44-0	2018	negatywny	negatywny			5
110	038Ż	żółć	BB	44-0	2018	negatywny	negatywny			5
111	039W	wątroba	BB	22-0	2018	negatywny	negatywny			4
112	039Ś	śledziona	BB	22-0	2018	negatywny	negatywny			2
113	039Ż	żółć	BB	22-0	2018	negatywny	negatywny			3
114	040Ż	żółć	BB	22-0	2018	negatywny	negatywny			4
115	041W	wątroba	BB	56-0	2018	negatywny	negatywny			6
116	041Ś	śledziona	BB	56-0	2018	negatywny	negatywny			6
117	041Ż	żółć	BB	56-0	2018	negatywny	negatywny			6
118	042W	wątroba	BB	56-0	2018	negatywny	negatywny			6
119	042Ś	śledziona	BB	56-0	2018	negatywny	negatywny			6
120	042Ż	żółć	BB	56-0	2018	negatywny	negatywny			4

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
121	043W	wątroba	BB	41-0	2018	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,3%; R-86,3%)	PP855987	1
122	043Ś	śledziona	BB	41-0	2018	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,1%; R-86,3%)		1
123	044W	wątroba	BB	41-0	2018	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,0%; R-85,2%)	PP618838	1
124	044Ś	śledziona	BB	41-0	2018	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-85,8%; R-86,3%)		1
125	044Ż	żółć	BB	41-0	2018	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,0%; R-75,9%)		1
126	045W	wątroba	BB	41-0	2018	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-85,3%; R-85,3%)	PP855988	1
127	045Ś	śledziona	BB	41-0	2018	negatywny	pozytywny	aHEV (F-85,5%; R-85,5%)		1
128	045Ż	żółć	BB	41-0	2018	pozytywny	pozytywny	aHEV (F-86,1%; R- -%)	PP895206	1
129	046W	wątroba	BB	41-0	2018	negatywny	pozytywny	aHEV (F-85,8%; R-85,2%)	PP593057	2
130	046Ś	śledziona	BB	41-0	2018	negatywny	negatywny			2
131	046Ż	żółć	BB	41-0	2018	negatywny	pozytywny	aHEV (F-85,5%; R-85,3%)	PP895205	2
132	047W	wątroba	BB	30-0	2018	negatywny	negatywny			4
133	047Ś	śledziona	BB	30-0	2018	negatywny	negatywny			4
134	047Ż	żółć	BB	30-0	2018	negatywny	pozytywny	aHEV (F-84,2%; R-84,2%)	PP855989	4
135	048W	wątroba	BB	46-0	2018	negatywny	negatywny			8
136	048Ś	śledziona	BB	46-0	2018	negatywny	negatywny			6
137	048Ż	żółć	BB	46-0	2018	negatywny	negatywny			3
138	049W	wątroba	BB	50-0	2018	negatywny	negatywny			4
139	049Ś	śledziona	BB	50-0	2018	negatywny	negatywny			4
140	049Ż	żółć	BB	50-0	2018	negatywny	negatywny			3

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
141	050W	wątroba	BB	26-0	2019	negatywny	negatywny			4
142	050Ś	śledziona	BB	26-0	2019	negatywny	negatywny			4
143	050Ż	żółć	BB	26-0	2019	negatywny	negatywny			4
144	Z1W	wątroba	zarodki	15 di (10 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
145	Z1WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	15 di (10 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
146	Z2W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	pozytywny	aHEV (F-91,8%; R-92,3%)	PP770548	1
147	Z2WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	pozytywny	aHEV (F-83,8%; R-83,7%)	PP895204	1
148	Z3W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
149	Z3WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
150	Z4W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
151	Z4WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
152	Z5W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
153	Z5WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
154	Z6W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
155	Z6WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
156	Z7W	wątroba	zarodki	16 di (11 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
157	Z7WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	16 di (11dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
158	Z8W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
159	Z8WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
160	Z9W	wątroba	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1

Załącznik

Lp.	Nazwa próbki	Rodzaj badanej tkanki	Typ produkcyjny	Wiek ptaków	Rok	Wynik RT-PCR	Wynik Real-Time RT-PCR	Wynik sekwencjonowania (BLAST)	Numer akcesyjny (GenBank)	Ilość badanych próbek
161	Z9WŻ	pęcherzyk żółciowy	zarodki	18 di (13 dpi)	2013	negatywny	negatywny			1
162	W18-01	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
163	W19-01	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
164	W18-02	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
165	W19-02	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
166	W18-03	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
167	W19-03	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
168	W18-04	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	pozytywny	b.d.	b.d.		1
169	W19-04	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
170	W18-05	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
171	W19-05	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
172	W18-06	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
173	W19-06	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
174	W18-07	wymazy z kloaki	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1
175	W19-07	wymazy z tchawicy	BB	41-0	2012	negatywny	b.d.			1

*Wynik sekwencjonowania analizowany przy użyciu narzędzia BLAST (NCBI) za pomocą oprogramowania Geneious Prime (wersja: 2019.2.3) programem blastn oraz megablast w dniu 02.04.2024.

Tab. 55. Sekwencje użyte do analizy filogenetycznej

Lp.	Gen	Numer akcesyjny (GenBank)	Kraj	Rok	Genotyp wg. piśmiennictwa	Gatunek
1	Kompletny genom	AM943646	Węgry	2005	genotyp 3 [10]	kura BB
2	Kompletny genom	AM943647	Australia	1986	genotyp 1 [10]	kura BB
3	Kompletny genom	AY535004	USA		genotyp 2(?) [28]	kura
4	Kompletny genom	EF206691	USA		genotyp 2(?) [14]	kura
5	Kompletny genom	GU954430	Chiny	2009	genotyp 3 [110]	kura BB
6	Kompletny genom	JN597006	Korea Południowa	2011	genotyp 1 [33]	kura BB
7	Kompletny genom	JN997392	Węgry	2010	genotyp 4 [5]	kura
8	Kompletny genom	KC454286	Korea Południowa	2011	genotyp 1 [78]*	kura
9	Kompletny genom	KF511797	Tajwan	2012	genotyp 4 [26]	kura CL
10	Kompletny genom	KM377618	Korea Południowa	2014	genotyp 2 [53]	kura BB
11	Kompletny genom	KU670940	Węgry	2014	domniemany nowy genotyp [65]	pustulka (<i>Falco tinnunculus</i>)
12	Kompletny genom	KX589065	Węgry	2014	<i>Avihepevirus egretti</i> [66]	czapla nadobna (little egret)
13	Kompletny genom	MG737712	USA	2017	domniemany nowy genotyp [101]	wróbel (sparrow)
14	Kompletny genom	MG976720	Chiny	2017	domniemany nowy genotyp [76]	kura
15	Kompletny genom	MK050107	Chiny	2018	genotyp 3 (nowy podtyp) [105]	kura
16	Kompletny genom	MN562265	Chiny	2018	domniemany nowy genotyp [38]	kura jedwabista (silky fowl)
17	Kompletny genom	MZ736614	Chiny	2020	genotyp 3 [107]	kura
18	Kompletny genom	OM037109	Chiny	2020	[44]	kura
19	helikaza (ORF1)	AF531898	USA	1994	genotyp 3(?) [27]	kura CB
20	helikaza (ORF1)	AF531901	USA	2000	genotyp 3(?) [27]	kura CL
21	helikaza (ORF1)	AF531907	USA	2001	genotyp 3(?) [27]	kura CB

Załącznik

22	helikaza (ORF1)	AY671802	Kanada	2003	genotyp 3(?) [2]	kura
23	helikaza (ORF1)	AY671803	Kanada	2003	genotyp 3(?) [2]	kura
24	helikaza (ORF1)	AY870832	USA		genotyp 3(?) [80]	kura
25	helikaza (ORF1)	AY871081	USA		genotyp 2(?) [80]	
26	helikaza (ORF1)	AY871092	USA		genotyp 3(?) [79]	kura
27	helikaza (ORF1)	AY871093	USA		genotyp 3(?) [79]	kura
28	helikaza (ORF1)	EU919186	Hiszpania	2007	genotyp 2(?) [59]	kura
29	helikaza (ORF1)	EU919188	Hiszpania	2007	genotyp 2(?) [59]	kura
30	helikaza (ORF1)	EU919191	Hiszpania	2008	genotyp 2(?) [59]	kura
31	helikaza (ORF1)	EU919192	Hiszpania	2008	genotyp 2(?) [59]	kura
32	helikaza (ORF1)	FM872321	Australia	1986	genotyp 1 [10]	kura BB
33	helikaza (ORF1)	FM872323	Australia	1995	genotyp 1 [10]	kura BB
34	helikaza (ORF1)	FM872325	Australia	1993	genotyp 1 [10]	kura BB
35	helikaza (ORF1)	FN557174	Węgry	2006	genotyp 3 [41]	kura BB
36	helikaza (ORF1)	FN557176	Wielka Brytania	2006	genotyp 3 [41]	kura CL
37	helikaza (ORF1)	FN557179	Polska	2007	genotyp 3 [41]	kura BB
38	helikaza (ORF1)	HG917393	Polska	2013	genotyp 3 [90]	kura BB
39	helikaza (ORF1)	HG917395	Polska	2013	genotyp 3 [90]	kura BB
40	helikaza (ORF1)	JN679866	Korea Południowa	2011	genotyp 1 [33]	kura CL
41	helikaza (ORF1)	KF573197	USA	2013	genotyp 2 [18]	kura CL
42	helikaza (ORF1)	KF573200	USA	2013	genotyp 2 [18]	kura CL
43	helikaza (ORF1)	KJ495793	USA	2013	genotyp 2 [19]	kura CL
44	helikaza (ORF1)	KJ495794	USA	2013	genotyp 2 [19]	kura CL
45	helikaza (ORF1)	KJ495796	USA	2013	genotyp 2 [19]	kura CL
46	helikaza (ORF1)	KJ495798	USA	2013	genotyp 2 [19]	kura CL
47	helikaza (ORF1)	LT601584	Austria	2014	genotyp 1 [104]	gołąb miejski (feral pigeon)

Załącznik

48	helikaza (ORF1)	MH636883	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
49	helikaza (ORF1)	MH636884	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura BB
50	helikaza (ORF1)	MH636885	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura BB
51	helikaza (ORF1)	MH636886	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
52	helikaza (ORF1)	MH636887	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura BB
53	helikaza (ORF1)	MH636888	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
54	helikaza (ORF1)	MH636889	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CL
55	helikaza (ORF1)	MH636890	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
56	helikaza (ORF1)	MH636891	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura BB
57	helikaza (ORF1)	MH636892	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
58	helikaza (ORF1)	MH636893	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
59	helikaza (ORF1)	MH636894	Polska	2018	genotyp 2 [43]	kura BB
60	helikaza (ORF1)	MH636895	Polska	2018	genotyp 2 [43]	kura CL
61	helikaza (ORF1)	MH636896	Polska	2018	genotyp 2 [43]	kura BB
62	helikaza (ORF1)	MH636897	Polska	2018	genotyp 2 [43]	kura BB
63	helikaza (ORF1)	MH636898	Polska	2018	genotyp 2 [43]	kura BB
64	helikaza (ORF1)	MH636899	Polska	2018	genotyp 2 [43]	kura BB
65	helikaza (ORF1)	OK423501	Polska	2020	genotyp 4 [69]	kura CL
66	helikaza (ORF1)	OK423502	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura CL
67	helikaza (ORF1)	OK423503	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura CL
68	helikaza (ORF1)	OK423504	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura CL
69	helikaza (ORF1)	OK423505	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura CL
70	helikaza (ORF1)	OK423506	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
71	helikaza (ORF1)	OK423507	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
72	helikaza (ORF1)	OK423508	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
73	helikaza (ORF1)	OK423509	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
74	helikaza (ORF1)	OK423510	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB

Załącznik

75	helikaza (ORF1)	OK423511	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
76	helikaza (ORF1)	OK423512	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
77	helikaza (ORF1)	OK423513	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
78	helikaza (ORF1)	OK423514	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
79	helikaza (ORF1)	OK423515	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
80	helikaza (ORF1)	OK423516	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
81	helikaza (ORF1)	OK423517	Polska	2020	genotyp 3 [69]	kura BB
82	helikaza (ORF1)	OK423518	Polska	2020	genotyp 2 [69]	kura BB
83	helikaza (ORF1)	OK423519	Polska	2020	genotyp 4 [69]	kura CB
84	helikaza (ORF1)	OK423520	Polska	2020	genotyp 4 [69]	kura CB
85	helikaza (ORF1)	OK423521	Polska	2020	genotyp 4 [69]	kura CB
86	helikaza (ORF1)	OK423522	Polska	2020	genotyp 4 [69]	kura CB
87	helikaza (ORF1)	OK423523	Polska	2020	genotyp 4 [69]	kura CB
88	helikaza (ORF1)	OK423524	Polska	2020	genotyp 4 [69]	kura CB
89	helikaza (ORF1)	OK423525	Polska	2020	genotyp 4 [69]	kaczka (duck)
90	helikaza (ORF1)	OK423526	Polska	2020	genotyp 2 [69]	gęś (goose)
91	helikaza (ORF1)	OK423527	Polska	2019	genotyp 2 [69]	kura CL
92	helikaza (ORF1)	OK423528	Polska	2019	genotyp 4 [69]	kura CL
93	helikaza (ORF1)	OK423529	Polska	2019	genotyp 2 [69]	kura CL
94	helikaza (ORF1)	OK423530	Polska	2019	genotyp 4 [69]	kura CL
95	helikaza (ORF1)	OK423531	Polska	2019	genotyp 2 [69]	kura BB
96	helikaza (ORF1)	OK423532	Polska	2019	genotyp 4 [69]	kura CB
97	helikaza (ORF1)	OK423533	Polska	2019	genotyp 2 [69]	kaczka (duck)
98	helikaza (ORF1)	OK423534	Polska	2018	genotyp 2 [69]	głuszc (western capercaillie)
99	kapsyd (ORF2)	AY671805	Kanada	2003	genotyp 3(?) [2]	kura
100	kapsyd (ORF2)	AY870817	USA		[80]	kura

Załącznik

101	kapsyd (ORF2)	AY870822	USA		[80]	kura
102	kapsyd (ORF2)	AY870824	USA		[80]	kura
103	kapsyd (ORF2)	AY870826	USA		[80]	kura
104	kapsyd (ORF2)	AY870828	USA		[80]	kura
105	kapsyd (ORF2)	AY870830	USA		[80]	kura
106	kapsyd (ORF2)	EU919193	Hiszpania	2007	genotyp 2(?) [59]	kura
107	kapsyd (ORF2)	FM872311	Australia	1986	genotyp 1 [10]	kura BB
108	kapsyd (ORF2)	FM872314	Australia	1994	genotyp 1 [10]	kura BB
109	kapsyd (ORF2)	FM872315	Australia	1993	genotyp 1 [10]	kura BB
110	kapsyd (ORF2)	FM872317	Niemcy	2006	genotyp 3 [10]	kura BB
111	kapsyd (ORF2)	FM872318	Austria	2007	genotyp 3 [10]	kura CL
112	kapsyd (ORF2)	FM872320	Austria	2007	genotyp 3 [10]	kura BB
113	kapsyd (ORF2)	FN557167	Czechy	2005	genotyp 3 [41]	kura BB
114	kapsyd (ORF2)	GQ398040	Chiny	2009	genotyp 3 [43]**	kura BB
115	kapsyd (ORF2)	GQ398041	Chiny	2009	genotyp 3 [43]**	kura BB
116	kapsyd (ORF2)	GQ398042	Chiny	2009	genotyp 3 [43]**	kura BB
117	kapsyd (ORF2)	HG917397	Polska	2012	genotyp 3 [90]	kura BB
118	kapsyd (ORF2)	HG917398	Polska	2012	genotyp 3 [90]	kura BB
119	kapsyd (ORF2)	JQ814688	Rosja	2012	domniemany nowy genotyp/gen2(?) [73]	kura BB
120	kapsyd (ORF2)	JQ814690	Rosja	2010	domniemany nowy genotyp/gen3(?) [73]	kura BB
121	kapsyd (ORF2)	JQ814691	Kazachstan	2009	domniemany nowy genotyp/gen2(?) [73]	kura BB
122	kapsyd (ORF2)	JQ814692	Rosja	2011	domniemany nowy genotyp/gen2(?) [73]	kura BB
123	kapsyd (ORF2)	KJ914882	USA	2013	genotyp 2 [19]	kura CL

Załącznik

124	kapsyd (ORF2)	KJ914889	USA	2013	genotyp 2 [19]	kura CL
125	kapsyd (ORF2)	KP221200	Chiny	2014	genotyp 3 [102]	kura CL
126	kapsyd (ORF2)	KX168431	Chiny	2014	genotyp 3 [36]***	
127	kapsyd (ORF2)	LT601579	Austria	2013	genotyp 3 [104]	drozd śpiewak (song thrush)
128	kapsyd (ORF2)	LT601581	Austria	2014	genotyp 1 [104]	gołąb miejski (feral pigeon)
129	kapsyd (ORF2)	LT601583	Austria	2014	genotyp 1 [104]	myszolów zwyczajny (common buzzard)
130	kapsyd (ORF2)	LT615088	Austria	2014	genotyp 3(?) [104]	gołąb miejski (feral pigeon)
131	kapsyd (ORF2)	MG922671	Chiny	2007	genotyp 3 [39]	gęś (goose)
132	kapsyd (ORF2)	MH636900	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura BB
133	kapsyd (ORF2)	MH636901	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura BB
134	kapsyd (ORF2)	MH636902	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
135	kapsyd (ORF2)	MH636903	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CL
136	kapsyd (ORF2)	MH636904	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
137	kapsyd (ORF2)	MH636905	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura BB
138	kapsyd (ORF2)	MH636906	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
139	kapsyd (ORF2)	MH636907	Polska	2017	genotyp 2 [43]	kura CB
140	kapsyd (ORF2)	MH636908	Polska	2018	genotyp 1, 4 [43]	kura CL
141	kapsyd (ORF2)	MH636909	Polska	2018	genotyp 2 [43]	kura BB
142	kapsyd (ORF2)	MZ231098	Chiny	2020	domniemany nowy genotyp [40]	kura

Szarym kolorem zaznaczono sekwencje użyte do stworzenia analiz filogenetycznych (**Ryc. 13**, **Ryc. 14**).

*KC454286 – według bazy GenBank sekwencje oryginalnie pochodzą z niepublikowanej pracy Park,S.J., Sung,H.W. oraz Kwon,H.M. pt.: Complete genome sequence of avian hepatitis E virus JY-F2 strain isolated in Korea.

**GQ398040-GQ398042 – według bazy GenBank sekwencje oryginalnie pochodzą z niepublikowanej pracy Zhao,Q. oraz Zhou,E.M. pt.: Molecular analysis of Avian hepatitis E virus of strain China-09-B3.

***KX168431 – według bazy GenBank autorami są Yang,S. oraz Sun,S.

Tab. 56. Zestawienie starterów stosowanych w celu opracowania metody wykrycia materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków.

Lp.	Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' – 3')	Wielkość produktu	Źródło
1.	BHE-fwd	GCG GCG ATG TGG TTA TGC TA	523 pz helikaza	Payne i wsp., 1999 [57]
	BHE-rev	CGG CGA GCT GCA TCT CAA TA		
2.	Forw1_C-BLSV	GGT ATG GTT GAT TTT GCC ATA AAG	280 pz kapsyd	Bilic i wsp., 2009 [10]
	Rev1_C-BLSV	GCT GCN CGN ARC AGT GTC GA		
2.A	Kapsyd_F	GGT ATG GTT GA ^Y TTT GCC ATA AAG	280 pz kapsyd	Bilic i wsp., 2009[10] – modyfikacja własna
	Kapsyd_R	GC ^Y GCN CGN ARC AGT GTC GA		
3	Helicase F	TGG CGC ACY GTW TCY CAC CG	186 pz helikaza	Huang i wsp., 2002 [27]
	Helicase R	CCT CRT GGA CCG TWA TCG ACC C		
4.	BLSV-HEVf	AAT GTG CTG CGG GGT GTC AA	176 pz ORF3	Troxler i wsp., 2011 [88]
	BLSV-HEVr	CAT CTG GTA CCG TGC GAG TA		
	Probe HEV-3	FAM-CTC CCA AAC GCY CYC AGC CGG A-BHQ1		
4.A	ORF3-F	^T AT GTG CTG CGG GGT GTC AA		Troxler i wsp., 2011 [88] – modyfikacja własna (BLSV-HEVf)
5.	ORF3-F1	TTG CTC CTC ATG TTT CTG CC	162 pz ORF3	Projekt własny
	ORF3-R1	GAA GGG GTT GGT TGG ATG AA		
6.	BLS-F1B	CAT TCA TTG TGC AGC CTG TG	453 pz duży produkt w okolicy ORF3	Projekt własny
	BLS-R1B	GCT GGA TTC CGT GCT CAT TA		
7.	BLS-F2B	CCG CAC GTG AGA CTT TAA CA	486 pz duży produkt w okolicy ORF3	Projekt własny
	BLS-R2B	TCC TGA AGT GGC ATT AAC GG		

Czerwonym kolorem zaznaczono własne modyfikacje starterów.

Szarym kolorem zaznaczono pary starterów użyte w badaniach własnych.

VIII. PIŚMIENNICTWO

- [1] Acharya, S.K., Panda, S.K. (2011) Editorial: Hepatitis E: Water, water everywhere - Now a global disease. *J Hepatol* 54(1), 9–11, Doi: 10.1016/j.jhep.2010.08.008.
- [2] Agunos, A.C., Yoo, D., Youssef, S.A., Ran, D., Binnington, B., Hunter, D.B. (2006) Avian hepatitis E virus in an outbreak of hepatitis-splenomegaly syndrome and fatty liver haemorrhage syndrome in two flaxseed-fed layer flocks in Ontario. *Avian Pathology* 35(5), 404–12, Doi: 10.1080/03079450600920976.
- [3] Ahmad, I., Holla, R.P., Jameel, S. (2011) Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* 161(1), 47–58, Doi: 10.1016/j.virusres.2011.02.011.
- [4] Asif, K., O'Rourke, D., Shil, P., Noormohammadi, A.H., Marenda, M.S., Sabir, A.J. (2021) Characterisation of the whole genome sequence of an avian hepatitis E virus directly from clinical specimens reveals possible recombination events between European and USA strains. *Infection, Genetics and Evolution* 96, 105095, Doi: 10.1016/j.meegid.2021.105095.
- [5] Bányai, K., Tóth, Á.G., Ivanics, É., Glávits, R., Szentpáli-Gavallér, K., Dán, Á. (2012) Putative novel genotype of avian hepatitis E virus, Hungary, 2010. *Emerg Infect Dis* 18(8), 1365–8, Doi: 10.3201/eid1808.111669.
- [6] Barnes, H.J. (1997) Big liver and spleen disease. Calnek B.W., et al. (red.): *Diseases of poultry* 10th ed. Mosby-Wolfe, Inc., pp. 1038–40.
- [7] Bartczak, R. (2013) BLS (Big Liver and Spleen Disease) kliniczny przypadek terenowy-nowa czy stara jednostka chorobowa..? Doniesienie ustne: seminarium MSD Animal Health.
- [8] Bartczak, R. (2014) Długoterminowa obserwacja enzoocji BLS (Big Liver and Spleen Disease) na fermie rodzicielskiej brojlerów. *Polskie Drobiarstwo. Suplement „Zdrowie”*, 25–8.
- [9] Berke, T., Matson, D.O. (2000) Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 145(7), 1421–36, Doi: 10.1007/s007050070099.

- [10] Bilic, I., Jaskulska, B., Basic, A., Morrow, C.J., Hess, M. (2009) Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes. *Journal of General Virology* 90(4), 863–73, Doi: 10.1099/vir.0.007179-0.
- [11] Billam, P., Huang, F.F., Sun, Z.F., Pierson, F.W., Duncan, R.B., Elvinger, F., Guenette, D.K., Toth, T.E., Meng, X.J. (2005) Systematic Pathogenesis and Replication of Avian Hepatitis E Virus in Specific-Pathogen-Free Adult Chickens. *J Virol* 79(6), 3429–37, Doi: 10.1128/JVI.79.6.3429-3437.2005.
- [12] Billam, P., LeRoith, T., Pudupakam, R.S., Pierson, F.W., Duncan, R.B., Meng, X.J. (2009) Comparative pathogenesis in specific-pathogen-free chickens of two strains of avian hepatitis E virus recovered from a chicken with Hepatitis-Splenomegaly syndrome and from a clinically healthy chicken. *Vet Microbiol* 139(3–4), 253–61, Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.008.
- [13] Billam, P., Pierson, F.W., Li, W., LeRoith, T., Duncan, R.B., Meng, X.J. (2008) Development and validation of a negative-strand-specific reverse transcription-PCR assay for detection of a chicken strain of hepatitis E virus: Identification of nonliver replication sites. *J Clin Microbiol* 46(8), 2630–4, Doi: 10.1128/JCM.00536-08.
- [14] Billam, P., Sun, Z.F., Meng, X.J. (2007) Analysis of the complete genomic sequence of an apparently avirulent strain of avian hepatitis E virus (avian HEV) identified major genetic differences compared with the prototype pathogenic strain of avian HEV. *Journal of General Virology* 88(5), 1538–44, Doi: 10.1099/vir.0.82754-0.
- [15] Chen, T., Liu, B., Chen, Y., Wang, X., Zhang, M., Dang, X., Zhao, Q., Zhou, E.M. (2023) Development of a novel competitive ELISA based on nanobody-horseradish peroxidase fusion protein for rapid detection of antibodies against avian hepatitis E virus. *Poult Sci* 102(1), 102326, Doi: 10.1016/j.psj.2022.102326.
- [16] Cong, W., Meng, Q.F., Shan, X.F., Sun, W.W., Qin, S.Y., Zhang, X.X., Huang, S.Y., Qian, A.D. (2014) Seroprevalence and risk factors associated with hepatitis e virus infection in three species of pet birds in northwest china. *Scientific World Journal*, 1–4, Doi: 10.1155/2014/296285.

- [17] Crerar, S., Cross, G. (1994) Epidemiological and clinical investigations into big liver and spleen disease of broiler breeder hens. *Aust Vet J* 71(12), 410–3, Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb00956.x>.
- [18] Gerber, P.F., Trampel, D.W., Opriessnig, T. (2014) Identification and characterization of avian hepatitis E virus in 2013 outbreaks of hepatitis-splenomegaly syndrome in two US layer operations. *Avian Pathology* 43(4), 357–63, Doi: 10.1080/03079457.2014.935755.
- [19] Gerber, P.F., Trampel, D.W., Willingham, E.M., Billam, P., Meng, X.J., Opriessnig, T. (2015) Subclinical avian hepatitis E virus infection in layer flocks in the United States. *Veterinary Journal* 206(3), 304–11, Doi: 10.1016/j.tvjl.2015.10.014.
- [20] Gough, R.E. (2008) Caliciviridae and hepeviruses. Pattison M., McMullin P.F., Bradbury J.M., Alexander D.J. (red.): *Poultry Diseases* sixth edition. Elsevier, pp. 410 – 414.
- [21] Guo, H., Zhou, E., Sun, Z.F., Meng, X., Halbur, P.G. (2006) Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *Journal of General Virology* 87, 217–23, Doi: 10.1099/vir.0.81393-0.
- [22] Guo, H., Zhou, E.M., Sun, Z.F., Meng, X.J. (2007) Egg whites from eggs of chickens infected experimentally with avian hepatitis E virus contain infectious virus, but evidence of complete vertical transmission is lacking. *Journal of General Virology* 88, 1532–7, Doi: 10.1099/vir.0.82689-0.
- [23] Handler, J.H., Williams, W. (1988) An Egg Drop Associated with Splenomegaly in Broiler Breeders. *Avian Dis* 32, 773–8, Doi: 10.2307/1590997.
- [24] Haqshenas, G., Huang, F.F., Fenaux, M., Guenette, D.K., Pierson, F.W., Larsen, C.T., Shivaprasad, H.L., Toth, T.E., Meng, X.J. (2002) The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *Journal of General Virology* 83(9), 2201–9, Doi: 10.1099/0022-1317-83-9-2201.
- [25] Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Woolcock, P.R., Read, D.H., Meng, X.J. (2001) Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *Journal of General Virology* 82(10), 2449–62, Doi: 10.1099/0022-1317-82-10-2449.

- [26] Hsu, I.W.Y., Tsai, H.J. (2014) Avian hepatitis E virus in chickens, Taiwan, 2013. *Emerg Infect Dis* 20(1), 149–51, Doi: 10.3201/eid2001.131224.
- [27] Huang, F.F., Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Guenette, D.K., Woolcock, P.R., Larsen, C.T., Pierson, F.W., Elvinger, F., Toth, T.E., Meng, X.J. (2002) Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. *J Clin Microbiol* 40(11), 4197–202, Doi: 10.1128/JCM.40.11.4197-4202.2002.
- [28] Huang, F.F., Sun, Z.F., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Shivaprasad, H.L., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng, X.J. (2004) Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *Journal of General Virology* 85(6), 1609–18, Doi: 10.1099/vir.0.79841-0.
- [29] Iqbal, T., Rashid, U., Idrees, M., Afroz, A., Kamili, S., Purdy, M.A. (2019) A novel avian isolate of hepatitis E virus from Pakistan. *Virol J* 16(1), 1–10, Doi: 10.1186/s12985-019-1247-0.
- [30] Irza, V.N., Sprygin, A.V. (2012) Hepatitis splenomegaly syndrome, a newly identified hen viral disease in Russia. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologia [Agricultural Biology]* (4), 73–7, Doi: 10.15389/agrobiol.2012.4.73eng.
- [31] Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M., Ulrich, R.G. (2014) Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 212–29, Doi: 10.1016/j.meegid.2014.06.024.
- [32] Kelly, A.G., Netzler, N.E., White, P.A. (2016) Ancient recombination events and the origins of hepatitis E virus. *BMC Evol Biol* 16(1), 1–18, Doi: 10.1186/s12862-016-0785-y.
- [33] Kwon, H.M., Sung, H.W., Meng, X.J. (2012) Serological prevalence, genetic identification, and characterization of the first strains of avian hepatitis E virus from chickens in Korea. *Virus Genes*, Doi: 10.1007/s11262-012-0761-6.
- [34] Lee, G.H., Tan, B.H., Chi-Yuan Teo, E., Lim, S.G., Dan, Y.Y., Wee, A., Kim Aw, P.P., Zhu, Y., Hibberd, M.L., Tan, C.K., Purdy, M.A., Teo, C.G. (2016) Chronic Infection with Camelid Hepatitis e Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* 150(2), 355–7, Doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.048.

- [35] Li, H., Zhu, R., She, R., Zhang, C., Shi, R., Li, W., Du, F., Wu, Q., Hu, F., Zhang, Y., Soomro, M.H., Zheng, C. (2015) Case Report Associated with Aspergillosis and Hepatitis E Virus Coinfection in Himalayan Griffons. *Biomed Res Int*, 1–9, Doi: 10.1155/2015/287315.
- [36] Li, S., Liu, M., Cong, J., Zhou, Y., Miao, Z. (2017) Detection and Characterization of Hepatitis e Virus in Goats at Slaughterhouse in Tai'an Region, China. *Biomed Res Int* 2017(March), Doi: 10.1155/2017/3723650.
- [37] Lin, J., Norder, H., Uhlhorn, H., Belák, S., Widén, F. (2014) Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose. *Journal of General Virology* 95, 557–70, Doi: 10.1099/vir.0.059238-0.
- [38] Liu, B., Chen, Y., Zhao, L., Zhang, M., Ren, X., Zhang, Y., Zhang, B., Fan, M., Zhao, Q., Zhou, E.M. (2020) Identification and pathogenicity of a novel genotype avian hepatitis E virus from silkie fowl (*gallus gallus*). *Vet Microbiol* 245(April), 108688, Doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108688.
- [39] Liu, B., Fan, M., Zhang, B., Chen, Y., Sun, Y., Du, T., Nan, Y., Zhou, E.M., Zhao, Q. (2018) Avian hepatitis e virus infection of duck, goose, and rabbit in northwest China. *Emerg Microbes Infect* 7(1), Doi: 10.1038/s41426-018-0075-4.
- [40] Liu, K., Zhao, Y., Zhao, J., Geng, N., Meng, F., Wang, S., Li, J., Zhong, Z., Zhu, L., Liu, S., Li, N. (2022) The diagnosis and molecular epidemiology investigation of avian hepatitis E in Shandong province, China. *BMC Vet Res* 18(1), 1–7, Doi: 10.1186/s12917-021-03079-2.
- [41] Marek, A., Bilic, I., Prokofieva, I., Hess, M. (2010) Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes. *Vet Microbiol* 145(1–2), 54–61, Doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014.
- [42] Massi, P., Tosi, G., Bassi, D., Gelmetti, D., Lavazza, A., Lombardi, G., Torcoli, G. (2005) Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy. *Ital J Anim Sci* 4(3), 303–5, Doi: 10.4081/ijas.2005.303.

- [43] Matczuk, A.K., Ćwiek, K., Wieliczko, A. (2019) Avian hepatitis E virus is widespread among chickens in Poland and belongs to genotype 2. *Arch Virol* 164(2), 595–9, Doi: 10.1007/s00705-018-4089-y.
- [44] Meng, K., Liu, M., Zhang, Y., Yuan, X., Xu, H. (2022) A genetically novel avian Hepatitis E virus in China. *Virus Genes* 58(6), 589–93, Doi: 10.1007/s11262-022-01937-1.
- [45] Meng, X.J. (2010) Recent advances in Hepatitis E Virus. *J Viral Hepat* 17(3), 153–61, Doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01257.x.
- [46] Meng, X.J. (2010) Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol*, 256–65, Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.017.
- [47] Meng, X.J. (2013) Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis e virus. *Semin Liver Dis* 33(1), 41–9, Doi: 10.1055/s-0033-1338113.
- [48] Meng, X.J. (2005) Hepatitis E virus: Cross-species infection and zoonotic risk. *Clin Microbiol Newsl* 27(6), 43–8, Doi: 10.1016/J.CLINMICNEWS.2005.03.001.
- [49] Meng, X.J. (2011) From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 161(1), 23–30, Doi: 10.1016/j.virusres.2011.01.016.
- [50] Meng, X.J., Anderson, D.A., Arankalle, V.A., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Jameel, S., Okamoto, H. (2010) Create of two new genera, Orthohepevirus and Avihepevirus, and remove the current sole genus Hepevirus in the family Hepeviridae. *Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee*, 1–8.
- [51] Meng, X.J., Shivaprasad, H.L. (2013) Avian Hepatitis E Virus Infections. Swayne D.E., et al. (red.): *Diseases of Poultry* 13th ed. John Willey & Sons, pp. 494–500.
- [52] Meng, X.J., Shivaprasad, H.L. (2020) Avian Hepatitis E Virus Infections. Swayne D.E., et al. (red.): *Diseases of poultry* 14th ed. Wiley Blackwell, pp. 528–34.
- [53] Moon, H.W., Lee, B.W., Sung, H.W., Yoon, B. Il., Kwon, H.M. (2016) Identification and characterization of avian hepatitis E virus genotype 2 from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in Korea. *Virus Genes* 52(5), 738–42, Doi: 10.1007/s11262-016-1351-9.

- [54] Morrow, C.J., Samu, G., Mátrai, E., Klausz, Á., Wood, A.M., Richter, S., Jaskulska, B., Hess, M. (2008) Avian hepatitis E virus infection and possible associated clinical disease in broiler breeder flocks in Hungary. *Avian Pathology* 37(5), 527–35, Doi: 10.1080/03079450802356946.
- [55] Nerc, J., Szeleszczuk, P., Mieszczyński, T. (2013) Spadek nieśności i wzrost upadków w stadach kur - to może być BLS! *Polskie Drobiarstwo* (11), 10–2.
- [56] Osamudiamen, F.T., Akanbi, O.A., Oluwayelu, D.O., Thomas Bock, C., Klink, P. (2021) Serological evidence of avian HEV antibodies in apparently healthy chickens in southwest Nigeria. *PLoS One* 16(2 February), 1–8, Doi: 10.1371/journal.pone.0247889.
- [57] Payne, C.J., Ellis, T.M., Plant, S.L., Gregory, A.R., Wilcox, G.E. (1999) Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet Microbiol* 68(1–2), 119–25, Doi: 10.1016/S0378-1135(99)00067-X.
- [58] Payne, C.J., Plant, S.L., Ellis, T.M., Hillier, P.W., Hopkinson, W. (1993) The detection of the big liver and spleen agent in infected tissues via intravenous chick embryo inoculation. *Avian Pathology* 22(2), 245–56, Doi: 10.1080/03079459308418918.
- [59] Peralta, B., Biarnés, M., Ordóñez, G., Porta, R., Martín, M., Mateu, E., Pina, S., Meng, X.J. (2009) Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet Microbiol* 137(1–2), 31–6, Doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.010.
- [60] Perko-Mäkelä, P. (2013) Avian hepatitis E virus infection detected in Finland for the first time. Finnish Food Safety Authority Evira 2013.
- [61] Prada-Arismendy, J., Castellanos, J.E. (2011) Real time PCR. application in dengue studies. *Colomb Med* 42(2), 243–58, Doi: 10.25100/cm.v42i2.778.
- [62] Purdy, M.A., Drexler, J.F., Meng, X.J., Norder, H., Okamoto, H., Van der Poel, W.H.M., Reuter, G., de Souza, W.M., Ulrich, R.G., Smith, D.B. (2022) ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022. *Journal of General Virology* 103(9), 1–2, Doi: 10.1099/jgv.0.001778.
- [63] Purdy, M.A., Drexler, J.F., Meng, X.J., Norder, H., Okamoto, H., Van der Poel, W.H.M., Reuter, G., de Souza, W.M., Ulrich, R.G., Smith, D.B. (2022) Family: Hepeviridae. *ICTV Virus Taxonomy*. <https://ictv.global/report/chapter/hepeviridae/hepeviridae>.

- [64] Razmyar, J., Abbasi, M., Mirsalimi, S.M., Baghkheirati, A.A., Ahmadian, G., Yazdani, A. (2021) Serologic and Molecular Evidence of Widespread Infection of Avian Hepatitis E Virus in Poultry Farms of Iran. *Avian Dis* 65(4), 571–6, Doi: 10.1637/aviandiseases-D-21-00077.
- [65] Reuter, G., Boros, Á., Mátics, R., Kapusinszky, B., Delwart, E., Pankovics, P. (2016) Divergent hepatitis E virus in birds of prey, common kestrel (*Falco tinnunculus*) and red-footed falcon (*F. vespertinus*), Hungary. *Infection, Genetics and Evolution* 43, 343–6, Doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.013.
- [66] Reuter, G., Boros, Á., Mátics, R., Kapusinszky, B., Delwart, E., Pankovics, P. (2016) A novel avian-like hepatitis E virus in wild aquatic bird, little egret (*Egretta garzetta*), in Hungary. *Infection, Genetics and Evolution* 46, 74–7, Doi: 10.1016/j.meegid.2016.10.026.
- [67] Ritchie, S.J., Riddell, C. (1991) Hepatitis-splenomegaly syndrome in commercial egg-laying hens. *Canadian Veterinary Journal* 32, 500–501.
- [68] Saad, M.D., Hussein, H.A., Bashandy, M.M., Kamel, H.H., Earhart, K.C., Fryauff, D.J., Younan, M., Mohamed, A.H. (2007) Hepatitis E virus Infection in Work Horses in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution* 7(3), 368–73, Doi: 10.1016/j.meegid.2006.07.007.
- [69] Siedlecka, M., Kublicka, A., Wieliczko, A., Matczuk, A.K. (2022) Molecular detection of avian hepatitis E virus (Orthohepevirus B) in chickens, ducks, geese, and western capercaillies in Poland. *PLoS One* 17(6 Jun), 1–11, Doi: 10.1371/journal.pone.0269854.
- [70] Smith, D.B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Meng, X.J., Okamoto, H., Van der Poel, W.H.M., Purdy, M.A. (2014) Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *Journal of General Virology* 95, 2223–32, Doi: 10.1099/vir.0.068429-0.
- [71] Sokal, R.R., Rohlf, J.F. (2013) *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* 4th edition. vol. 19, W. H. Freeman and Company.
- [72] Souillard, R., Allain, V., Dufay-Lefort, A.C., Rousset, N., Amalraj, A., Spaans, A., Zbikowski, A., Piccirillo, A., Sevilla-Navarro, S., Kovács, L., Le Bouquin, S. (2024) Biosecurity implementation on large-scale poultry farms in Europe: A qualitative interview study with farmers. *Prev Vet Med* 224, Doi: 10.1016/j.prevetmed.2024.106119.

- [73] Sprygin, A. V., Nikonova, Z.B., Zinyakov, N.G. (2012) Avian hepatitis E virus identified in Russian chicken flocks exhibits high genetic divergence based on the ORF2 capsid gene. *Avian Pathology* 41(5), 459–63, Doi: 10.1080/03079457.2012.711464.
- [74] Su, Q., Li, Y., Meng, F., Cui, Z., Chang, S., Zhao, P. (2018) Hepatic rupture hemorrhage syndrome in chickens caused by a novel genotype avian hepatitis E virus. *Vet Microbiol* 222(May), 91–7, Doi: 10.1016/j.vetmic.2018.06.019.
- [75] Su, Q., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Meng, F., Cui, Z., Chang, S., Zhao, P. (2018) Characterization of the novel genotype avian hepatitis E viruses from outbreaks of hepatic rupture haemorrhage syndrome in different geographical regions of China. *Transbound Emerg Dis* 65(6), 2017–26, Doi: 10.1111/tbed.12987.
- [76] Su, Q., Zhang, Z., Zhang, Y., Cui, Z., Chang, S., Zhao, P. (2020) Complete genome analysis of avian hepatitis E virus from chicken with hepatic rupture hemorrhage syndrome. *Vet Microbiol* 242(January), 1–7, Doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108577.
- [77] Sultan, S., Osman, N. (2016) Serological evidence for the presence of infectious avian hepatitis E virus among chicken flocks in Egypt. *Egypt J Virol* 13(1), 27–33.
- [78] Sun, P., Lin, S., He, S., Zhou, E.M., Zhao, Q. (2019) Avian hepatitis E virus: With the trend of genotypes and host expansion. *Front Microbiol* 10(JULY), 1–10, Doi: 10.3389/fmicb.2019.01696.
- [79] Sun, Z.F., Huang, F.F., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng, X.J. (2003) Use of heteroduplex mobility assays (HMA) for pre-sequencing screening and identification of variant strains of swine and avian hepatitis E viruses. *Vet Microbiol* 96(2), 165–76, Doi: 10.1016/S0378-1135(03)00215-3.
- [80] Sun, Z.F., Larsen, C.T., Dunlop, A., Huang, F.F., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng, X.J. (2004) Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *Journal of General Virology* 85(3), 693–700, Doi: 10.1099/vir.0.19582-0.
- [81] Sun, Z.F., Larsen, C.T., Huang, F.F., Billam, P., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng, X.J. (2004) Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus

- (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J Clin Microbiol* 42(6), 2658–62, Doi: 10.1128/JCM.42.6.2658-2662.2004.
- [82] Szeleszczuk, P. (2023) *Vademecum ogólnej serodiagnostyki aviopatologicznej. Cz. I Jak odczytywać wyniki badań serologicznych*. Poultry Academy for Poland – Serology Handbooks. IDEXX Laboratories, Inc. IDEXX., pp. 1–45.
- [83] Szeleszczuk, P. (2023) *Vademecum ogólnej serodiagnostyki aviopatologicznej. Cz. III Zasady diagnostyki serologicznej w stadach drobiu*. Poultry Academy for Poland – Serology Handbooks. IDEXX Laboratories, Inc. IDEXX., pp. 1–60.
- [84] Szeleszczuk, P., Żbikowski, A., Dolka, I., Gawlik, P., Szewczyk, R., Mieszczyński, T. (2011) Zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu E u drobiu. *Materiały konferencyjne: I Kongresu Praktyki Weterynaryjnej*. Łódź, 2011, pp. 153–6.
- [85] Tablante, N.L., Vaillancourt, J.P., Julian, R.J. (1994) Necrotic, haemorrhagic, hepatomegalic hepatitis associated with vasculitis and amyloidosis in commercial laying hens. *Avian Pathology* 23(4), 725–32, Doi: 10.1080/03079459408419041.
- [86] Teo, C.G. (2012) Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis e. *Epidemiol Infect* 140(5), 767–87, Doi: 10.1017/S0950268811002925.
- [87] Todd, D., Mawhinney, K.A., Mcalinden, V.A., Douglas, A.J. (1993) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Serological Diagnosis of Big Liver and Spleen Disease. *Avian Dis* 37(3), 811–6.
- [88] Troxler, S., Marek, A., Prokofieva, I., Bilic, I., Hess, M. (2011) TaqMan real-time reverse transcription-PCR assay for universal detection and quantification of avian hepatitis E virus from clinical samples in the presence of a heterologous internal control RNA. *J Clin Microbiol* 49(4), 1339–46, Doi: 10.1128/JCM.01626-10.
- [89] Troxler, S., Pać, K., Prokofieva, I., Chodakowska, B., Furmanek, D., Hess, M. (2013) Circulation of avian hepatitis E virus within a rearing and broiler breeder farm. *Materiały XVIII Kongresu World Veterinary Poultry Association (WVPA)*, p. 536.
- [90] Troxler, S., Pać, K., Prokofieva, I., Liebhart, D., Chodakowska, B., Furmanek, D., Hess, M. (2014) Subclinical circulation of avian hepatitis E virus within a multiple-age rearing and

- broiler breeder farm indicates persistence and vertical transmission of the virus. *Avian Pathology* 43(4), 310–8, Doi: 10.1080/03079457.2014.924616.
- [91] Vasickova, P., Psikal, I., Kralik, P., Widen, F., Hubalek, Z., Pavlik, I. (2007) Hepatitis E virus: A review. *Vet Med (Praha)* 52(9), 365–84, Doi: 10.17221/1999-VETMED.
- [92] Vitral, C.L., Pinto, M.A., Lewis-Ximenez, L.L., Khudyakov, Y.E., Dos Santos, D.R., Gaspar, A.M.C. (2005) Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(2), 117–22, Doi: 10.1590/S0074-02762005000200003.
- [93] Walters, S.J., Campbell, M.J., Machin, D. (2021) *Medical Statistics: A Textbook for the Health Sciences*, 5th Edition. Wiley Blackwell.
- [94] Wang, B., Meng, X.J. (2021) Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection. *Curr Opin Microbiol* 59, 8–15, Doi: 10.1016/j.mib.2020.07.004.
- [95] Wang, G., He, Y., Yan, X., Sun, Y., Yi, L., Tu, C., He, B. (2023) Virome Profiling of Chickens with Hepatomegaly Rupture Syndrome Reveals Coinfection of Multiple Viruses. *Viruses* 15(6), 1–12, Doi: 10.3390/v15061249.
- [96] Wieliczko, A., Matczuk, A.K., Ćwiek, K. (2019) Choroba dużej wątroby i śledziony w stadach kur - aktualna sytuacja epidemiologiczna w Polsce. *Polskie Drobiarstwo. Suplement „Zdrowie”*, 41–3.
- [97] Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Tsang, A.K.L., Joseph, M., Wong, E.Y.M., Tang, Y., Sivakumar, S., Xie, J., Bai, R., Wernery, R., Wernery, U., Yuen, K.Y. (2014) New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis* 20(6), 1044–8, Doi: 10.3201/eid2006.140140.
- [98] World Health Organization. (2015) Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015. *Weekly Epidemiological Record* 90(18), 185–200.
- [99] Yan, H., Chi, Z., Zhao, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Chang, S., Zhao, P. (2022) Application of ORF3 Subunit Vaccine for Avian Hepatitis E Virus. *Vet Sci* 9(12), Doi: 10.3390/vetsci9120676.

- [100] Yan, H., Sun, W., Wang, J., Gao, Q., Zhang, Y., Wang, Y., Chang, S., Zhao, P. (2023) Combined inhibitory effect of interferon and antiserum on avian hepatitis E virus. *Poult Sci* 102(5), 102591, Doi: 10.1016/j.psj.2023.102591.
- [101] Yang, C., Wang, L., Shen, H., Zheng, Y., Gauger, P.C., Chen, Q., Zhang, J., Yoon, K.J., Harmon, K.M., Main, R.G., Li, G. (2018) Detection and genomic characterization of new avian-like hepatitis E virus in a sparrow in the United States. *Arch Virol* 163(10), 2861–4, Doi: 10.1007/s00705-018-3925-4.
- [102] Yang, S., Wang, L., Sun, S. (2016) Natural Infection with Avian Hepatitis E Virus and Marek's Disease Virus in Brown Layer Chickens in China. *Avian Dis* 60(3), 698–704, Doi: 10.1637/11386-013016-Reg.1.
- [103] Zhang, W., Shen, Q., Mou, J., Yang, Z.B., Yuan, C.L., Cui, L., Zhu, J.G., Hua, X.G., Xu, C.M., Hu, J. (2008) Cross-species infection of hepatitis E virus in a zoo-like location, including birds. *Epidemiol Infect* 136, 1020–6, Doi: 10.1017/s095026880700965x.
- [104] Zhang, X., Bilic, I., Troxler, S., Hess, M. (2017) Evidence of genotypes 1 and 3 of avian hepatitis E virus in wild birds. *Virus Res* 228, 75–8, Doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.028.
- [105] Zhang, X.L., Li, W.F., Yuan, S., Guo, J.Y., Li, Z.L., Chi, S.H., Huang, W.J., Li, X.W., Huang, S.J., Shao, J.W. (2019) Meta-transcriptomic analysis reveals a new subtype of genotype 3 avian hepatitis e virus in chicken flocks with high mortality in Guangdong, China. *BMC Vet Res* 15(1), 1–8, Doi: 10.1186/s12917-019-1884-y.
- [106] Zhang, X.X., Zhang, N.Z., Zhou, D.H., Tian, W.P., Xu, Y.T., Zhu, X.Q. (2014) Seroprevalence of hepatitis E virus in four species of parrots in China. *Pak Vet J* 34(1), 130–2.
- [107] Zhang, Y., Zhao, H., Chi, Z., Cui, Z., Chang, S., Wang, Y., Zhao, P. (2022) Isolation, identification and genome analysis of an avian hepatitis E virus from white-feathered broilers in China. *Poult Sci* 101(3), 101633, Doi: 10.1016/j.psj.2021.101633.
- [108] Zhao, Q., Sun, Y., Zhao, J., Hu, S., Zhao, F., Chen, F., Clavijo, A., Zhou, E.M., Xiao, Y. (2013) Development and application of an indirect ELISA for detection of antibodies against avian hepatitis E virus. *J Virol Methods* 187(1), 32–6, Doi: 10.1016/j.jviromet.2012.08.026.

- [109] Zhao, Q., Xie, S., Sun, Y., Chen, Y., Gao, J., Li, H., Wang, X., Syed, S.F., Liu, B., Wang, L., Zhang, G., Zhou, E.M. (2015) Development and evaluation of a SYBR Green real-time RT-PCR assay for detection of avian hepatitis E virus. *BMC Vet Res* 11:195, Doi: 10.1186/s12917-015-0507-5.
- [110] Zhao, Q., Zhou, E.M., Dong, S.W., Qiu, H.K., Zhang, L., Hu, S. Bin., Zhao, F.F., Jiang, S.J., Sun, Y.N. (2010) Analysis of Avian Hepatitis E virus from chickens, China. *Emerg Infect Dis* 16(9), 1469–72, Doi: 10.3201/eid1609.100626.

IX. SPIS TABEL I RYCIN

Spis zamieszczonych rycin

Ryc. 1. Synonimy używane na określenie infekcji wirusem aHEV (rycina własna) na podstawie piśmiennictwa [2,12,27,57,67].....	21
Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne hepewirusów. Źródło: Meng, 2010 [46].	25
Ryc. 3. Podział izolatów aHEV (rycina własna) na podstawie danych piśmiennictwa [5,10,26,29,41,44,62,63,66].	27
Ryc. 4. Schemat budowy genomu wirusa zapalenia wątroby typu E – HEV (hepatitis E virus) [32,62,63].....	28
Ryc. 5. Ukształtowanie się nieśności w stadach zdrowych oraz zakażonych wirusem aHEV źródło: Nerc i wsp. 2013 [55].....	35
Ryc. 6. Podział Polski na regiony w celu analizy wyników ELISA dla anty-aHEV w wybranych stadach CB w latach 2010, 2014 oraz 2019.....	48
Ryc. 7. Etapy amplifikacji Real-Time RT-PCR przy użyciu starterów mających na celu wykrycie materiału genetycznego kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków.....	52
Ryc. 8. Przykładowy wykres krzywej topnienia w badaniach Real-Time RT-PCR w kierunku wykrycia genu kodującego białko kapsydu – kontrola negatywna i dwie kontrole pozytywne (rozcieńczenie 1:1 i 1:10).....	53
Ryc. 9. Kształtowanie się średniego miana geometrycznego (Gmean) w dwóch stadach BB (K1 i K2) w trakcie okresu nieśności.....	61
Ryc. 10. Przykładowy wynik elektroforezy w żelu agarozowym z uwidocznionymi prążkami na wysokości 186 pz, odpowiadającymi wielkości produktu poszukiwanego genu kodującego helikazę.....	69
Ryc. 11. Przykładowy wynik elektroforezy w żelu agarozowym z uwidocznionymi prążkami na wysokości 280 pz, odpowiadającymi wielkości produktu poszukiwanego genu kodującego białko kapsydu.	72
Ryc. 12. Przykładowy wykres krzywej topnienia w badaniach Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu.	75
Ryc. 13. Analiza filogenetyczna na podstawie własnych sekwencji nukleotydów kodujących helikazę (fragment ORF1) aHEV oraz izolatów zdeponowanych w GenBank.	82
Ryc. 14. Analiza filogenetyczna na podstawie własnych sekwencji nukleotydów kodujących białko kapsydu (ORF2) aHEV oraz izolatów zdeponowanych w GenBank.....	84

Spis zamieszczonych tabel

Tab. 1. Taksonomia rodziny Hepeviridae (według Smith i wsp., (2014)[70], z uwzględnieniem genotypów aHEV zaproponowanych przez Billic i wsp., (2009)[10] i zmodyfikowanych w najnowszym ICTV[63] przez Purdy i wsp. (2022)[62] oraz nowo odkrytych jeszcze nieprzypisanych gatunków przez Lin i wsp. (2014)[37], Li i wsp. (2015)[35], Reuter i wsp. (2016)[65,66], Zhang i wsp. (2017)[104], Yang i wsp. (2018)[101], a także Wang i wsp. (2021)[94]).....	23
Tab. 2. Zasięg gospodarzy i infekcje międzygatunkowe wirusem zapalenia wątroby typu E (HEV) w warunkach naturalnych i eksperymentalnych na podstawie piśmiennictwa [31,34,39,46,68].	31
Tab. 3. Zestawienie wybranych sekwencji starterów stosowanych w celu wykrycia materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków.	33
Tab. 4. Zestawienie najczęstszych objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych w różnych zespołach chorobowych wywoływanych przez aHEV [23,27,49,74,75,78,85,95].	36
Tab. 5. Zestawienie zbiorcze z liczby stad BB, LB i CL, wieku ptaków oraz liczby zbadanych surowic metodą ELISA w latach 2010 – 2018.....	41
Tab. 6. Zestawienie zbiorcze z liczby zbadanych stad CB i surowic metodą ELISA w latach 2010, 2014 oraz 2019.....	43
Tab. 7. Zestawienie zbiorcze lokalizacji i liczby zbadanych stad CB w latach 2010, 2014, 2019 z podziałem według województw.....	43
Tab. 8. Zestawienie zbiorcze ilości próbek (narządy wewnętrzne i żółć) pobranych od ptaków ze stad BB i CL w latach 2011 – 2019 do badań metodą RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR.	44
Tab. 9. Zawiesina użyta do inokulacji zarodków (pochodząca od zakażonych kur BB). ..	45
Tab. 10. Współczynnik serokonwersji w przebiegu wirusowych chorób kur ustalony dla par surowic. Źródło: Szeleszczuk, 2023 [83]	46
Tab. 11. Zestawienie par starterów zastosowanych w celu wykrycia materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków.	50
Tab. 12. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA dla przeciwciał anti-aHEV (liczba i procent stad oraz surowic pozytywnych) w stadach BB, LB, CL w latach 2010 – 2018.	57
Tab. 13. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA anti-aHEV (Gmean, CV, Min, Max) w stadach BB, LB, CL w latach 2010 – 2018.....	58

Tab. 14. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA dla anty-aHEV (Gmean, CV, procent stad i surowic pozytywnych) w stadach BB, LB, CL w różnych grupach wiekowych w latach 2010 – 2018.....	59
Tab. 15. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA anty-aHEV (Gmean, CV, procent stad i surowic pozytywnych) w stadach BB w różnych grupach wiekowych w latach 2010 – 2018.	60
Tab. 16. Kształtowanie się wyników ELISA dla anty-aHEV w dwóch stadach BB (K1 i K2) w czasie (2011 rok).....	60
Tab. 17. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA dla anty-aHEV (liczba i procent stad oraz surowic pozytywnych) w stadach CB w latach 2010, 2014 oraz 2019.	62
Tab. 18. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA dla anty-aHEV (Gmean, EWW, CV, procent surowic i stad pozytywnych) w stadach CB w latach 2010, 2014 oraz 2019.....	62
Tab. 19. Zestawienie zbiorcze przedstawiające procent (%) oraz liczbę (n) zbadanych stad CB pozytywnych w ELISA dla anty-aHEV w latach 2010, 2014 oraz 2019 z podziałem według województw.	63
Tab. 20. Zestawienie zbiorcze przedstawiające procent (%) oraz liczbę (n) surowic pozytywnych w ELISA dla anty-aHEV w badanych stadach CB w latach 2010, 2014 oraz 2019 z podziałem według województw.....	63
Tab. 21. Zestawienie zbiorcze wyników ELISA anty-aHEV (Gmean, EWW, CV, procent surowic i stad pozytywnych) w stadach CB względem wyodrębnionych regionów.....	64
Tab. 22. Współczynnik korelacji Persona między Gmean, procentem surowic i stad pozytywnych oraz CV, a EWW.	65
Tab. 23. Zestawienie wyników ELISA dla anty-aHEV stad BB i pochodzących od nich stad CB w 2014 roku.	65
Tab. 24. Zestawienie zbiorcze wyników badań RT-PCR w kierunku występowania genu kodującego helikazę w stadach BB i CL w latach 2011 – 2019.	66
Tab. 25. Zestawienie zbiorcze procenta (%) wyników pozytywnych badań RT-PCR w dla genu kodującego helikazę w stadach BB i CL w poszczególnych latach.	67
Tab. 26. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego helikazę w stadach BB i CL według wieku stada.	68
Tab. 27. Zestawienie zbiorcze wyników badań RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w latach 2011 – 2019.	70
Tab. 28. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w poszczególnych latach.	70

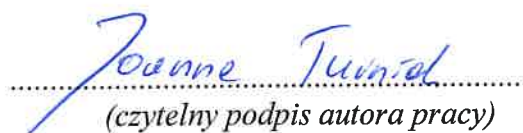
Tab. 29. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL z podziałem według wieku stad.	71
Tab. 30. Zestawienie zbiorcze wyników badań Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w latach 2011 – 2019.	73
Tab. 31. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w poszczególnych latach.	73
Tab. 32. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL z podziałem według wieku.	74
Tab. 33. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych w RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w próbkach tkanek i żółci pochodzących od stad BB i CL w latach 2011 – 2019.	75
Tab. 34. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych w RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w próbkach tkanek i żółci pochodzących od stad BB i CL w latach 2011 – 2019.	76
Tab. 35. Zestawienie zbiorcze wyników badań w kierunku genu kodującego helikazę (przy użyciu RT-PCR) oraz białko kapsydu (przy użyciu RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR) u zakażonych zarodków kurzych.	76
Tab. 36. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych metodą RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w tkankach pochodzących od zakażonych wirusem aHEV zarodków kurzych.	77
Tab. 37. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w tkankach od zarodków kurzych zakażonych wirusem aHEV.	77
Tab. 38. Zestawienie zbiorcze wyników RT-PCR w kierunku genu kodującego helikazę oraz białko kapsydu w wymazach z kloaki i tchawicy od kur pochodzących z ogniska BLS w 2012 r.	78
Tab. 39. Zestawienie wyników pozytywnych w RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w wymazach z kloaki i tchawicy od kur pochodzących z ogniska BLS w 2012 r.	78
Tab. 40. Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych metodą RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w tkankach i żółci pochodzących od stad BB i CL w latach 2011 – 2019 oraz od zakażonych zarodków kurzych (materiałem z roku 2013 r.).	79

Tab. 41. Zestawienie wyników pozytywnych w RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w próbkach z tkanek i żółci pochodzących od stad BB i CL w latach 2011-2019, od zakażonych zarodków kurzych (materiałem tkankowym z 2013) oraz w wymazach z kloaki i tchawicy od kur z ogniska BLS w 2012 r.	79
Tab. 42. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego helikazę w zależności od rodzaju badanego materiału.	80
Tab. 43. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w zależności od rodzaju badanego materiału.	80
Tab. 44. Zestawienie zbiorcze wyników pozytywnych (%) w Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w zależności od rodzaju badanego materiału.	80
Tab. 45. Porównanie wyników ELISA (% surowic pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.	85
Tab. 46. Porównanie wyników ELISA (% surowic pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.	86
Tab. 47. Porównanie wyników ELISA (% surowic pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.	86
Tab. 48. Porównanie wyników ELISA (% stad pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.	87
Tab. 49. Porównanie wyników ELISA (% stad pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.	87
Tab. 50. Porównanie wyników ELISA (% stad pozytywnych) z wynikami otrzymanymi metodą Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (% pozytywnych) za pomocą testu chi-kwadrat.	88
Tab. 51. Wyniki ELISA przebadanych stad BB, LB i CL z lat 2010 – 2018.	106
Tab. 52. Wyniki ELISA stad CB w latach 2010, 2014 oraz 2019.	117
Tab. 53. Wyniki badań molekularnych w kierunku wykrycia genu kodującego helikazę (fragment ORF1) aHEV stad BB (n=45) i CL (n=3).	122
Tab. 54. Wyniki badań molekularnych w kierunku wykrycia genu kodującego białko kapsydu (ORF2) aHEV stad BB (n=45) i CL (n=3).	131

Spis tabel i rycin

Tab. 55. Sekwencje użyte do analizy filogenetycznej	140
Tab. 56. Zestawienie starterów stosowanych w celu opracowania metody wykrycia materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków.	146

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW
w tym w Archiwum Prac Dyplomowych SGGW


(czytelny podpis autora pracy)