

opi. dec. 11.12.2024v.

SEKRETARIAT  
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej  
/ mgr Małgorzata Malinowska /  
starszy specjalista

**Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Instytut Medycyny Weterynaryjnej**

Lek. wet. Krzysztof Adamczyk

**Zakażenia rotawirusowe  
u gołębi domowych  
(*Columba livia domestica*, Linnaeus, 1758)  
w Polsce**

Rotavirus infections in domestic pigeons  
(*Columba livia domestica*, Linnaeus, 1758) in Poland

Praca doktorska

Doctoral thesis

Wykonana pod kierunkiem promotora:

dr hab. Aleksandry Ledwoń

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

oraz promotora pomocniczego

dr hab. Dennisa Rubbenstroth'a

Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Germany

Warszawa, 2024



### 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 28.11.2024

Czytelny podpis promotora Alexandre Ledron

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez 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 20.11.24

Czytelny podpis autora rozprawy Krzysztof Adamczyk





## *Podziękowania*

*Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania wszystkim osobom i instytucjom, które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy doktorskiej.*

*Przede wszystkim dziękuję Panu Profesorowi dr hab. Piotrowi Szeleszczukowi, mojemu mentorowi w dziedzinie chorób gołębi, za wzięcie mnie pod swoje skrzydła i pokazanie, że można latać wysoko jeszcze w trakcie studiów, co zaowocowało przyjęciem mnie na doktorat w Zakładzie Chorób Ptaków SGGW. Nieoceniony okazał się Pana udział w umożliwieniu mi rozwoju naukowego między innymi poprzez organizację spotkań ze światowymi specjalistami w dziedzinie chorób gołębi, pomoc w organizacji stażu oraz wprowadzenie do zaszczytnego grona kolumbopatologów.*

*Powstanie tej pracy doktorskiej nie byłoby możliwe dzięki zaangażowaniu i opiece Pani dr hab. Aleksandrze Ledwoń. Dzięki cierpliwości i nieustępliwości Pani Doktor zwłaszcza na ostatnich etapach tworzenia tej pracy doprowadziła do jej powstania.*

*Serdeczne podziękowania składam promotorowi pomocniczemu dr hab. Dennisowi Rubbenstroth'owi, niekwestionowanemu autorytetowi w dziedzinie rotawirusy gołębi, który okazał mi nieocenioną pomoc w planowaniu i wykonywaniu badań oraz pisaniu publikacji.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do Pana Grzegorza Adamczyka za udostępnienie gołębi, które posłużyły do pobrania materiału do badań. Pańska pomoc była nieoceniona i stanowiła fundament dla moich badań.*

*Dziękuję również Panu Adamowi Cebuli, Panu Dominikowi Dudkowi oraz wszystkim hodowcom gołębi pocztowych z Oddziału Warszawa Zachód, którzy umożliwili przeprowadzenie badań i aktywnie wzięli w nich udział. Wasze zaangażowanie i wsparcie były kluczowe dla sukcesu tego projektu.*

*Chciałbym także wyrazić wdzięczność Panu Janowi Kawalerowi i Panu Krzysztofowi Kawalerowi z Polskiego Związku Hodowców Gołębi Poczтовых za umożliwienie realizacji badań oraz udział w nich. Wasza otwartość i współpraca miały ogromne znaczenie dla postępów mojej pracy.*

*Dziękuję mojej żonie i bliskim za wspieranie mnie i wiarę w moje możliwości.*

*Dziękuję Wam wszystkim za zaufanie, wsparcie i cenny wkład w rozwój nauki. Wasza pomoc była nieoceniona i pozwoliła na osiągnięcie wyników, które mam nadzieję, będą miały wartość zarówno dla społeczności naukowej, jak i dla hodowców gołębi pocztowych.*



## Streszczenie

### **Zakażenia rotawirusowe u gołębi domowych (*Columba livia domestica*, Linnaeus, 1758) w Polsce**

Gołębi rotawirus A jest obecnie uznawany za czynnik etiologiczny choroby młodych gołębi (CMG), która powoduje znaczne straty w hodowlach, głównie gołębi pocztowych. Choć rotawirusy były stwierdzane u gołębi już w latach osiemdziesiątych XX wieku, ich rola jako przyczyny CMG została potwierdzona dopiero w 2016 roku w Australii. W pierwszej części prowadzonych badań przeanalizowano pierwsze rozpoznane przypadki rotawirozy u gołębi w Polsce z 2017 i 2018 roku. U ptaków tych zostały wykonane sekcje zwłok, badania histopatologiczne i molekularne, w celu potwierdzenia zakażenia. Następnie, za pomocą technik biologii molekularnej zbadano archiwalne próbki wątrób pobrane w trakcie badań sekcyjnych gołębi w latach 2011- 2020. Próbki pochodziły od 117 gołębi z 74 gołębników. Materiał genetyczny rotawirusa A (Rotavirus A - RVA) wykryto u 24 gołębi (20,5%) a pierwsza dodatnia próbka pochodziła z 2014 roku. Dalsze badania miały na celu prześledzenie rozprzestrzeniania się zakażeń RVA podczas lotów młodych gołębi pocztowych, które przeprowadzono w jednym z oddziałów Okręgu Warszawa Polskiego Związku Hodowców Gołębi Pocztowych (PZHGP). Analiza próbek kałomoczu zebranych z koszy transportowych wykazała, że liczba zakażeń RVA wzrastała do czwartego lotu ( $p=0,049$ ), po czym istotnie malała do szóstego lotu ( $p=0,001$ ), co wskazuje na rozwój odporności u gołębi. Spośród 76 hodowli z których gołębie uczestniczyły w lotach, co najmniej jeden dodatni wynik uzyskano u ptaków z 46 (60,5%) hodowli, a 11 hodowców (14,4%) zgłosiło wystąpienie objawów choroby u młodych gołębi, takich jak zwracanie z wola, biegunka i zaleganie treści w wolu, które pojawiły się 1-7 dni po locie. Wyniki potwierdzają, że kluczową przyczyną rozwoju zakażeń RVA podczas sezonu lotowego jest kontakt z zakażonymi ptakami. Badane gołębie nie były zaszczepione przeciwko RVA. Zakażenia rotawirusowe stanowią poważne wyzwanie dla hodowców i lekarzy weterynarii, szczególnie w kontekście treningów, lotów i wystaw gołębi, gdzie najczęściej dochodzi do zakażenia ptaków. Testy RT-qPCR okazały się skuteczne w monitorowaniu zakażeń klinicznych i subklinicznych RVA u gołębi pocztowych.

Słowa kluczowe: choroba młodych gołębi (CMG), rotawirus gołębi typu A (RVA), wirusowe choroby gołębi



## Summary

### **Rotavirus infections in domestic pigeons (*Columba livia domestica*, Linnaeus, 1758) in Poland**

Pigeon rotavirus A is now recognized as the etiological factor of Young Pigeon Disease (YPD), which causes significant losses in pigeon breeding, particularly among racing pigeons. Although rotaviruses were detected in pigeons as early as the 1980s, their role as the cause of YPD was confirmed in 2016 in Australia. In the first part of the study, the first recognized cases of rotavirus infection in pigeons in Poland from 2017 and 2018 were analyzed. Post-mortem examinations, histopathological, and molecular studies were conducted to confirm the infection. Subsequently, archival liver samples collected during post-mortem examinations of pigeons between 2011 and 2020 were screened by molecular method. The samples were from 117 pigeons from 74 lofts. Rotavirus A (RVA) genetic material was detected in 24 samples (20.5%), with the first positive sample dating back to 2014. Further research aimed to trace the spread of RVA infections during young racing pigeon flights in one of the districts of Warsaw Division of the Polish Pigeon Racing Association (PZHGP). The analysis of faecal-urine samples collected from transport baskets showed that the number of RVA infections increased until the fourth flight ( $p=0,049$ ), after which it significantly decreased by sixth flight ( $p=0,001$ ), suggesting the development of immunity in the birds. Among the 76 lofts from which birds participated in the flights, at least one positive result was obtained from pigeons from 46 (60.5%) lofts, and 11 breeders (14.4%) reported clinical signs of the disease in young pigeons, such as vomiting, diarrhea, and crop stasis which appeared 1-7 days after the flight. The results confirm that key factor in the development of RVA infection during the racing season is contact with infected birds. The studied pigeons were not vaccinated against RVA. Rotavirus infections pose a serious challenge for breeders and veterinarians, especially in the context of training, flights, and pigeon shows, where infections are most likely to occur in birds under stress. Monitoring infections using RT-qPCR tests has proven effective in diagnosing both clinical and subclinical infections in racing pigeons.

Key words: young pigeon disease, pigeon type-rotavirus A (RVA), pigeon viral diseases



<b>Spis treści</b>	
<i>Podziękowania</i> .....	5
<b>Wykaz użytych skrótów</b> .....	13
<b>Wstęp</b> .....	14
<b>Cele i zakres pracy</b> .....	18
<b>Hipotezy badawcze</b> .....	19
<b>Material i metody</b> .....	20
Material .....	20
<i>Material sekcyjny</i> .....	20
<i>Próbki kałomoczu</i> .....	20
Metody .....	22
<i>Ekstrakcja RNA z próbek wątroby</i> .....	22
<i>Ekstrakcja RNA z próbek kałomoczu</i> .....	22
<i>RVA- RT-qPCR</i> .....	22
<i>Sekwencjonowanie i analiza filogenetyczna</i> .....	23
<i>Analiza statystyczna</i> .....	23
<i>Badanie histopatologiczne</i> .....	23
<b>Syntetyczne omówienie publikacji</b> .....	24
<i>Publikacja I</i> .....	24
<i>Publikacja II</i> .....	30
<b>Dyskusja</b> .....	35
<b>Podsumowanie</b> .....	38
<b>Wnioski</b> .....	39
<b>Pełne treści artykułów stanowiących cykl pracy rozprawy doktorskiej</b> .....	48
<i>Publikacja I</i> .....	48
<i>Publikacja II</i> .....	59

Dysertacja obejmuje dwie powiązane ze sobą tematycznie publikacje:

1. **Adamczyk K.**, Rubbenstroth D., Ledwoń A., Sapieryński R., Szeleszczuk P., 2024, The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland, *Journal of Veterinary Research*, 68(1), 55-61.doi: 10.2478/jvetres-2024-0006.  
140 pkt MNiSW, IF=1,3
2. **Adamczyk K.**, Ledwoń A., Czopowicz M., Szeleszczuk P., 2024, The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season, *BMC Veterinary Research*, 20(1), 305. doi: 10.1186/s12917-024-04144-2.  
140 pkt MNiSW, IF=2,3

Łączna liczba punktów wg listy MNiSW: 280

Łączna wartość współczynnika IF: 3,6



## Wykaz użytych skrótów

**CI** – przedział ufności (ang. confidence interval)

**CMG** – choroba młodych gołębi (ang. Young Pigeon Disease – YPD)

**CoRVA** – rotavirus A gołębi (ang. Columboid Rotavirus A)

**Cq** – moment wejścia reakcji w fazę logarytmicznego przyrostu ilości produktu (ang. quantification cycle)

**egfp** – białko o wzmożonej zielonej fluorescencji (ang. enhanced green fluorescent protein)

**FCI** – Międzynarodowa Federacja Miłośników Gołębi Pocztowych (franc. Federation Colombophile Internationale)

**FFPE** – Próbki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (ang. formalin-fixed paraffin-embedded)

**i in.** – i inni

**n** – liczba badanych gołębi

**NSP** – białko niestrukturalne (ang. non-structural protein)

**p** – wartość prawdopodobieństwa (ang. p-value, probability value)

**PBS** – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. Phosphate Buffered Saline)

**PZHGP** – Polski Związek Hodowców Gołębi Pocztowych

**RCF** – względna siła odśrodkowa (ang. Relative Centrifugal Force)

**RNA** – kwas rybonukleinowy (ang. Ribonucleic Acid)

**RS** – współczynnik korelacji Spearmana (ang. Spearman's Rank Correlation Coefficient)

**RT-qPCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją i ilościowym oznaczeniem (ang. Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction)

**RVA** – Rotavirus A

**VP** – białko wirusowe (ang. Viral Protein)

**μl** – mikrolitr

**μm** – mikrometr

## Wstęp

### *Choroba młodych gołębi*

Choroba młodych gołębi (CMG) – ang. Young Pigeon Disease (YPD) stanowi poważny problem w hodowli gołębi domowych (*Columba livia domestica*, Linnaeus, 1758) i jest znana od ponad trzech dekad (Duchatel i Szeleszczuk, 2011; Gough i in., 1992). Choroba ta, wcześniej opisywana pod różnymi nazwami i przypisywana różnym patogenom, była przedmiotem wielu badań i spekulacji (Raue i in., 2005). Dopiero w 2016 roku z jednego, z typowych przypadków CMG w Australii wyizolowano rotawirusa A (RVA) (McCowan i in., 2018) a w 2020 roku, po przeprowadzeniu szczegółowych analiz i potwierdzeniu postulatów Henle’a-Kocha, udało się zidentyfikować gołębią odmianę RVA genotyp G18P(17) (Rubbenstroth i in., 2020; Schmidt i in., 2021). Wcześniej, pomimo obecności rotawirusów u gołębi, nie wiązano ich z CMG (Blakey i in., 2019; Minamoto i in., 1988). W tym czasie podejrzewano inne patogeny, takie jak gołębie adenowirusy, gołębi circovirus typu 1 oraz bakterie *Escherichia coli* (Dhama i in., 2015; Meßmer i in., 2022).

Rotawirus A (RVA) należy do rodziny *Reoviridae* i rodzaju *Rotavirus* (Hu i in., 2012). Genom rotawirusa A składa się z 11 segmentów dwuniciowego RNA, które kodują szereg białek, zarówno strukturalnych, jak i niestrukturalnych. Białka strukturalne (VP1 do VP4, VP6 i VP7) są kluczowe dla budowy wirusa, podczas gdy białka niestrukturalne (NSP1 do NSP6) są zaangażowane w cykl replikacji wirusa i interakcje z gospodarzem (Hu i in., 2012).

Chorobę młodych gołębi, której czynnikiem etiologicznym okazał się RVA opisano w różnych regionach świata, w tym w Australii, Europie i USA (Hunnam i in., 2019; Rubbenstroth i in., 2019). W większości przypadków, gołębi RVA był przyczyną poważnych zakażeń ogólnoustrojowych, w których przebiegu obserwowano martwicę wątroby (McCowan i in., 2018). Zakażenie RVA niezwykle szybko rozprzestrzenia się w gołębniku, co prowadzi do wysokiej zachorowalności gołębi, która może sięgać 100% oraz śmiertelności, od 0 do ponad 50% (Rubbenstroth i in., 2019). Opisano także przypadek przebiegający ze śmiertelnością 75% (Hansen i in., 2020). Kliniczne objawy rotawirozy obejmują apatię, anoreksję, zielonkawą biegunkę, biliwerdinurię, wymioty oraz zatrzymanie treści w wolu (Meßmer i in., 2022). Choroba zazwyczaj trwa około tygodnia, a gołębie, które przeżyły zakażenie, potrzebują do trzech tygodni, aby odzyskać masę ciała z okresu przed zachorowaniem (Rubbenstroth i in., 2020). Typowe dla CMG zmiany sekcyjne to

powiększenie wątroby, umiarkowanie powiększona, blade lub plamista śledziona (McCovan i in., 2018; Schmidt i in., 2021), zazwyczaj powiększone i czasami blade nerki. W wolu często zalegała wodnista treść, a zawartość jelit niektórych gołębi była zielona i wodnista (McCovan i in. 2018; Rubbenstroth i in., 2020). W badaniu histopatologicznym stwierdzano zapalenie i martwicę wątroby oraz rozrost przewodów żółciowych (McCovan i in., 2018). W śledzionie obserwowano wielogniskowy rozrost grudek chłonnych w obrębie miazgi białej, ubytek limfocytów, rozrost komórek siateczki i erytrofagocytozę (Blakey i in., 2019).

Polska jest jednym ze światowych liderów w hodowli gołębi, co potwierdzają dane z Międzynarodowej Federacji Miłośników Gołębi Poczтовых (FCI). Według informacji podanych przez FCI, w Polsce rocznie wykluwa się około 4 miliony młodych gołębi poczтовых, a ponad 40 000 hodowców jest zrzeszonych w różnych klubach – dane na rok 2024 (Polski Związek Gołębi Poczтовых, 2024).

W przypadku gołębi ozdobnych, około 3000 hodowców należy do Polskiego Stowarzyszenia Hodowców Gołębi Rasowych i Drobного Inwentarza, a w 2022 roku wydano około 200 000 obrączek (Polski Związek Hodowli Gołębi Rasowych i Drobного Inwentarza, 2024). Mimo to, wiele posiadaczy gołębi ozdobnych nie przynależy do żadnej z organizacji.

Transport gołębi poczтовых na miejsce startu oraz organizowanie wystaw, sprzyjają rozprzestrzenianiu się patogenów, w tym rotawirusa A typu gołębiego, ze względu na skupianie w jednym miejscu dużej liczby ptaków pochodzących z różnych hodowli (Basham i in., 2022; Dhama i in., 2015).

### *Loty młodych gołębi poczтовых*

Loty młodych gołębi poczowych wymagają precyzyjnego planowania i zarządzania. Kluczową jest zdolność gołębi poczowych do znajdowania drogi powrotu do miejsca, w którym się wykluły, a więc do gołębnika macierzystego. W celu przygotowania gołębi do lotów konkursowych, hodowcy samodzielnie lub w małych grupach organizują loty treningowe. Podczas treningów gołębie są wywożone na coraz większe odległości od gołębnika i uwalniane. Ten proces pozwala ptakom na stopniowe przystosowywanie się do dłuższych lotów, minimalizując jednocześnie stres związany z coraz większymi wyzwaniem. Treningi mają także na celu rozwijanie umiejętności orientacji w terenie, wytrzymałości oraz zdolności do szybkiego powrotu do gołębnika. Etap ten w Polsce trwa

zazwyczaj od lipca do połowy sierpnia. Po zakończeniu treningów indywidualnych hodowcy uczestniczą w lotach treningowych organizowanych przez okręgi PZHGP są to trzy loty o jednakowej długości, mające na celu zapoznanie gołębi z transportem w większych grupach oraz zmniejszenie ryzyka braku powrotu do gołębnika. Loty te stanowią ważny etap, w którym ptaki uczą się adaptacji do warunków panujących podczas lotów konkursowych. Na dzień przed planowanym lotem gołębie są poddawane szczegółowej ocenie stanu zdrowia oraz kondycji. Hodowcy dbają o to, aby ptaki były odpowiednio nawodnione i miały dostęp do lekkostrawnego pokarmu. W dniu poprzedzającym lot, pomiędzy 17:00 a 19:00, gołębie są umieszczane w specjalnych koszach transportowych. Kosze te zapewniają gołębom maksymalny komfort i bezpieczeństwo podczas transportu do miejsca startu.

Transport odbywa się w specjalnych pojazdach przystosowanych do przewozu gołębi, które mogą pomieścić nawet do 2000 gołębi umieszczonych w 160 koszach. W zależności od liczby ptaków i odległości miejsca startu od gołębników, może być konieczne wykorzystanie kilku pojazdów. Podczas transportu gołębie są pojone, a przy dłuższych trasach również karmione, co jest standardową praktyką mającą na celu utrzymanie ich w dobrej kondycji. Jednakże proces karmienia i pojenia zwiększa ryzyko zakażeń drogą fekalno-oralną, co może wpłynąć na zdrowie ptaków i wyniki lotów. W momencie rozpoczęcia lotu, gołębie są wypuszczane z koszy, a im krócej trwa ich lot do gołębników, tym większy sukces hodowców, którzy rywalizują o nagrody w kategoriach, takich jak: loty krótkodystansowe, średniodystansowe, dalekodystansowe oraz ogólna klasyfikacja sezonu, która uwzględnia wyniki z wszystkich lotów.

Sezon konkursów lotowych dla młodych gołębi pocztowych rozpoczyna się w połowie sierpnia i trwa do końca września. W tym okresie organizowane są loty konkursowe na coraz dłuższym dystansie, co stanowi stopniowe zwiększanie wyzwań dla młodych ptaków (PZHGP, 2024). W związku z tym, że każdy dodatkowy stres, którym są poddawane ptaki może znacząco wpłynąć na ich wyniki podczas lotów konkursowych, pobieranie próbek w tym okresie powinno być jak najmniej obciążające. Idealnym zatem materiałem do badań są próbki kałomoczu, pobrane z koszy transportowych po opuszczeniu ich przez gołębie.

Praca zarówno lekarza weterynarii jak i naukowca chcącego badać gołębie pocztowe w trakcie lotów wymaga zarówno wiedzy merytorycznej jak i budowania dobrych relacji

z hodowcami, aby byli skłonni podzielić się informacjami dotyczącymi zdrowotności stad, jak i zgodzili się na pobranie próbek do badań.

## **Cele i zakres pracy**

Cele pracy:

1. Opis i diagnostyka pierwszych przypadków rotawirusy u gołębi pocztowych w Polsce.
2. Ocena występowania zakażeń rotawirusem A (RVA) u gołębi w latach 2011-2020.
3. Badanie przebiegu zakażeń RVA u młodych gołębi w sezonie lotowym.
4. Ocena zastosowania metody RT-qPCR w diagnostyce zakażeń RVA w próbkach kałomoczu gołębi pobranych z koszy transportowych.

Zakres pracy obejmował dwa etapy:

**Etap I. Analiza przypadków rotawirusy u gołębi pocztowych obejmująca wywiad, badania sekcyjne, histopatologiczne i molekularne, w tym badanie obecności RNA wirusa RVA w zarchiwizowanych próbkach wątrób gołębi pobranych w latach 2011-2020. (cel nr 1 i 2)**

### **Publikacja I:**

Adamczyk K., Rubbenstroth D., Ledwoń A., Sapieryński R., Szeleszczuk P., 2024, The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. *Journal of Veterinary Research*, 68(1), 55-61. IF=1,3

**Etap II. Zbadanie przebiegu zakażeń RVA w trakcie sezonu lotów młodych gołębi pocztowych oraz ocena efektywności RT-qPCR w wykrywaniu RNA ekstrahowanego z kałomoczu gołębi, w diagnostyce klinicznych i subklinicznych zakażeń RVA. (cel nr 3 i 4)**

### **Publikacja II:**

Adamczyk K., Ledwoń A., Czopowicz M., Szeleszczuk P., 2024, The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season. *BMC Veterinary Research*. 20(1), 305. IF=2,3

## **Hipotezy badawcze**

1. W Polsce RVA jest czynnikiem etiologicznym CMG, powodującym istotne straty w populacjach gołębi domowych, a jego rozprzestrzenianie się jest szczególnie intensywne w trakcie sezonu lotowego.
2. RVA gołębi mógł być przyczyną choroby i śmierci tych ptaków w poprzednich latach, kiedy jeszcze nie był zidentyfikowany jako czynnik etiogeniczny CMG.
3. Poprzez badania metodą RT-qPCR, RNA izolowanego z kałomoczu gołębi, jest możliwe skuteczne monitorowanie i diagnozowanie zarówno klinicznych, jak i subklinicznych zakażeń RVA w trakcie sezonu lotowego.

## **Material i metody**

### **Material**

#### *Material sekcyjny*

W pierwszej części badań opisanej w **publikacji nr 1**, wykonano badania ukierunkowane na rotawirozę u czterech padłych gołębi pocztowych pochodzących z trzech różnych gołębników, dostarczonych przez hodowców w lipcu 2017 i sierpniu 2018 roku. Wszystkie te gołębie były w wieku około czterech miesięcy. Narządy od trzech ptaków z tej grupy pobrano do badania histopatologicznego. Pobrano próbki: serca, wątroby, nerek, śledziony, dwunastnicy oraz trzustki i utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie.

Do badań molekularnych w trakcie sekcji pobrano próbki wątrób od wszystkich czterech gołębi.

Materiałem do badań w kierunku RVA również były wątroby, pobrane od gołębi sekcjonowanych w latach 2011–2020. Próbki pochodziły od 117 ptaków w tym 66 gołębi ozdobnych i 51 gołębi pocztowych. Badane gołębie pochodziły z 74 hodowli.

Od 111 ptaków fragmenty narządów, w tym wątrób, pobrane do badań molekularnych przechowywano w temperaturze -33 do -20°C. Od sześciu gołębi dokonano ekstrakcji RNA z fragmentów wątroby zatopionych w bloczkach parafinowych. Próbki pochodziły głównie z województwa mazowieckiego (n = 89), ale także z województw warmińsko-mazurskiego (n = 9), pomorskiego (n = 4), łódzkiego (n = 2), śląskiego (n = 1) i wielkopolskiego (n = 1). U jedenastu osobników region pochodzenia był nieznany.

#### *Próbki kałomoczu*

W kolejnej części badań będącej przedmiotem **publikacji nr 2**, materiałem badawczym były próbki kałomoczu w liczbie 361, pochodzące od młodych gołębi pocztowych, pobierane z koszy transportowych po opuszczeniu ich przez ptaki. Materiał do badań pobierano 6-krotnie w sezonie lotowym trwającym od sierpnia do września 2019 roku, z lotów treningowych: 8 i 15 sierpnia oraz konkursowych: 11, 18, 25 sierpnia i 1 września. Próbki z tych lotów były badane pod kątem obecności materiału genetycznego CoRVA. Gołębie od poszczególnych hodowców były zazwyczaj umieszczane w oddzielnych koszach, jednak ze względu na ograniczoną ilość miejsca, w niektórych



koszach umieszczano gołębie z różnych gołębników. Zwykle w jednym koszu znajdowało się do 20 gołębi. W lotach uczestniczyły gołębie od 76 hodowców z województwa mazowieckiego, a liczba hodowców uczestniczących w poszczególnych lotach wzrosła z 12 w pierwszym locie, do 62 w szóstym locie. Przed lotami hodowcy byli proszeni o wypełnienie ankiet dotyczących stanu zdrowia stada, obejmujących informacje o szczepieniach przeciwko RVA, wystąpienia CMG przed lub w trakcie lotów, wieku chorych gołębi oraz występowania objawów klinicznych typowych dla zakażenia RVA, takich jak nagłe zgony, biegunka, wymioty, zaleganie w wolu, brak apetytu, utrata masy ciała, jak również nietypowych objawów, takich jak wielomocz, objawy oddechowe czy objawy neurologiczne. Na podstawie wymienionych objawów utworzono punktację kliniczną, która miała na celu ocenę prawdopodobieństwa, że raportowana choroba była spowodowana zakażeniem RVA. Za każde wystąpienie typowych objawów dodawano jeden punkt, natomiast za nietypowe objawy odejmowano jeden punkt. Punktacja ta wahała się od -3 do 6, w zależności od liczby typowych i nietypowych objawów klinicznych. Hodowcy byli również proszeni o dostarczenie informacji na temat wskaźników śmiertelności i zachorowalności oraz daty wystąpienia pierwszych objawów klinicznych. W sumie od 52 hodowców otrzymano przynajmniej raz wypełnioną ankietę. W przypadkach, gdy hodowca zaobserwował objawy kliniczne u gołębi, z tego gołębnika pobierano dodatkowe próbki do analizy.

Do przeprowadzenia badań nie była wymagana zgoda lokalnej komisji etycznej, ponieważ odchody pozyskane w doświadczeniu zostały wydalone przez ptaki naturalnie. Hodowcy, będący właścicielami gołębi, od których pobrano próbki, wyrazili ustną zgodę na przeprowadzenie badań.

## Metody

### *Ekstrakcja RNA z próbek wątroby*

Całkowity RNA został wyekstrahowany z fragmentów zamrożonych próbek wątroby o masie około 25 mg, przy użyciu zestawu NucleoMag VET (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy) i systemu KingFisher Flex Purification (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA z próbek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) wyekstrahowano przy użyciu zestawu miRNeasy FFPE (Qiagen, Hilden, Niemcy). Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producentów. W celu potwierdzenia wydajności ekstrakcji RNA oraz reakcji RT-qPCR, do każdej próbki dodano zdefiniowaną liczbę kopii *in vitro* transkrybowanego RNA genu *egfp*.

### *Ekstrakcja RNA z próbek kałomoczu*

Pobierano do 25 g kału z jednego kosza transportowego i umieszczano w probówkach wirówkowych o pojemności 50 ml (Sarstedt, Niemcy). Następnie dodawano dwukrotną objętość buforu PBS (Eurx, Polska) w stosunku do objętości próbki, zazwyczaj około 50 ml. Próbki worteksowano przez około 1 minutę, a następnie wirowano przez 15 minut przy 3779 RCF. Po wirowaniu, 100 µL supernatantu pobierano do izolacji RNA przy użyciu zestawu Total RNA mini (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z instrukcjami producenta.

### *RVA- RT-qPCR*

Wykrywanie RVA w próbkach wątroby i kału przeprowadzono za pomocą testu RT-qPCR (McCowan i in., 2018) zmodyfikowanego przez Rubbenstroth'a i in. (2019), specyficznego dla genu kodującego białko VP6 RVA. Reakcję RT-qPCR przeprowadzano przy użyciu starterów CoRVA\_VP6\_868+ i CoRVA\_VP6\_943- oraz sondy TaqMan CoRVA\_VP6\_898\_P. Pięć µl RNA wyekstrahowanego z próbek wątroby, łączono z 2 µl mieszanki starterów, denaturowano w temperaturze 95°C przez 5 minut, a następnie dodawano 18 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej odczynnik AgPath-ID One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, USA). Reakcja była przeprowadzana w cyklach: 45°C przez 10 minut, 95°C przez 10 minut oraz 40 cykli: 95°C przez 15 sekund, 60°C przez 30 sekund i 72°C przez 30 sekund. Jeżeli reakcja łańcuchowej polimerazy wchodziła w fazę logarytmicznego przyrostu ilości produktu (Cq) w cyklu 20 i wcześniejszych, wyniki były uznawane za wskazujące na ostre zakażenie RVA, a jeśli w cyklach od 31 do 35, wyniki były klasyfikowane jako słabo dodatnie i nie były brane pod uwagę.

### *Sekwencjonowanie i analiza filogenetyczna*

Częściowe sekwencje genu VP6 zostały wygenerowane dla wszystkich próbek RNA z wątrób, z wartością Cq poniżej 30. Fragment o długości 438 par zasad segmentu VP6 amplifikowano przy użyciu konwencjonalnej metody RT-PCR, a produkty o oczekiwanej długości były wyekstrahowane z żelu przy użyciu zestawu Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Sekwencjonowanie metodą Sangera przeprowadzono w Eurofins Genomics (Ebersberg, Niemcy), a sekwencje zostały przesłane do GenBanku. Analiza filogenetyczna została przeprowadzona przy użyciu algorytmu neighbour-joining i modelu odległości Jukes–Cantor w oprogramowaniu Geneious Prime 2021.0.1 (Biomatters Ltd., Auckland, Nowa Zelandia).

### *Analiza statystyczna*

Analizie statystycznej poddano dane z części badań zawartej w publikacji nr 2, dotyczącej badania przebiegu zakażeń RVA podczas lotów młodych gołębi. Zmienne liczbowe były przedstawiane jako mediany i zakresy (lub przedziały międzykwartylowe na wykresach), a porównania między grupami niepowiązanymi wykonano przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Korelację między zmiennymi liczbowymi określono przy użyciu RS. Zmienne katagoryczne przedstawiano jako liczby i procenty, a porównania proporcji między grupami przeprowadzono przy użyciu testu G największej wiarygodności lub testu dokładnego Fishera, jeśli oczekiwana liczba w tabeli kontyngencji była mniejsza niż 5. Test  $\chi^2$  dla trendów zastosowano do porównania proporcji między kolejnymi punktami czasowymi. CI 95% dla proporcji obliczono metodą Wilsona. Wszystkie testy były dwustronne, a poziom istotności ustalono na 0,05. Całą analizę statystyczną przeprowadzono w oprogramowaniu TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

### *Badanie histopatologiczne*

Próbki tkanek pobrane podczas sekcji zwłok utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie, zatopiono w wosku parafinowym i pocięto na skrawki o grubości 5  $\mu\text{m}$ . Do badania histopatologicznego zastosowano barwienie hematoksyliną i eozyną zgodnie ze standardowymi procedurami.

## Syntetyczne omówienie publikacji

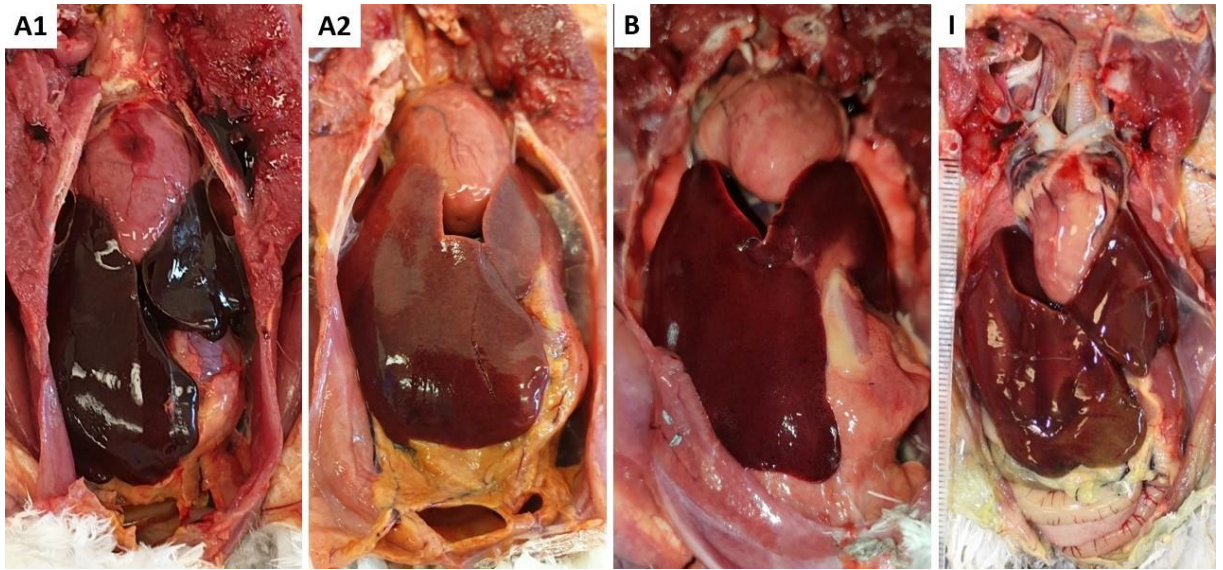
### *Publikacja I*

**Adamczyk K.**, Rubbenstroth D., Ledwoń A., Sapierzyński R., Szeleszczuk P., 2024, The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. *Journal of Veterinary Research*, 68, 55-61.

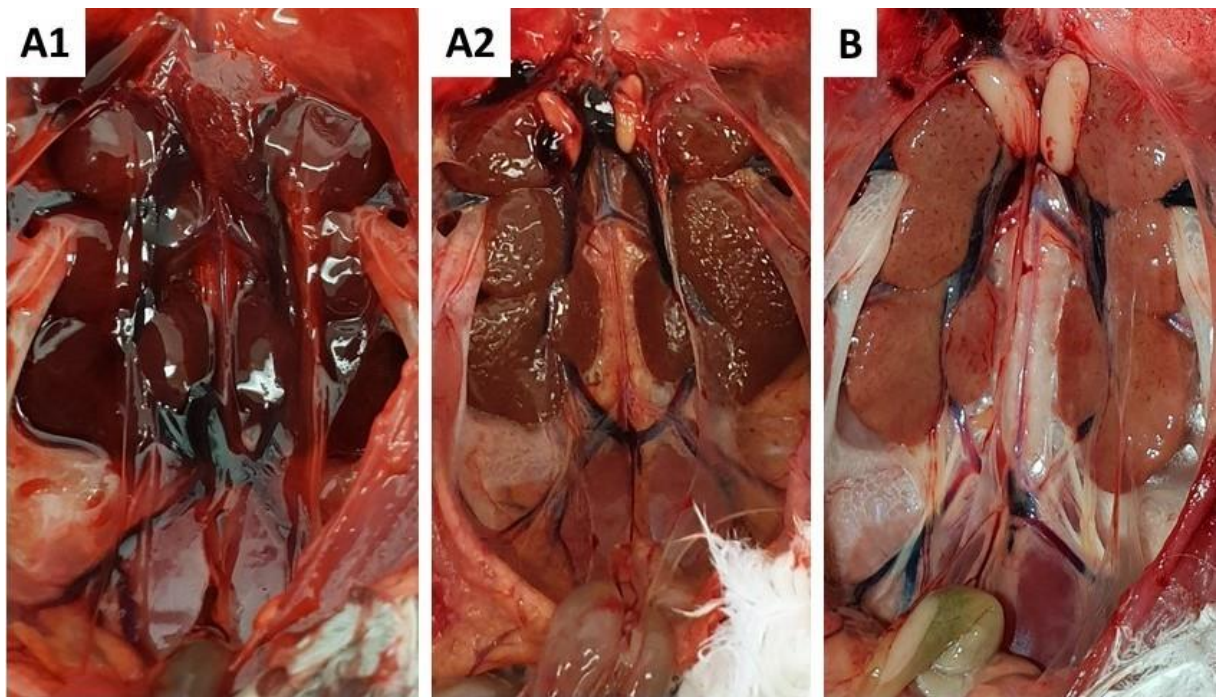
#### **Cele pracy:**

- opis pierwszych przypadków rotawirusy jako choroby młodych gołębi w Polsce,
- ocena występowania zakażeń RVA u gołębi w latach 2011-2020.

Szczegółowe badania sekcyjne zwłok czterech gołębi RVA dodatnich, pochodzących z trzech różnych ognisk choroby młodych gołębi, wykazały obecność zmian w wątrobie, nerkach, śledzionie, sercu oraz przewodzie pokarmowym. Wątroba u badanych ptaków była umiarkowanie powiększona i przekrwiona lub powiększona i płamista (Ryc. 1). Nerki były powiększone, w jednym przypadku przekrwione i w dwóch blade (Ryc. 2). Śledziona była blada i u dwóch gołębi nieznacznie powiększona (Ryc. 3). U dwóch gołębi stwierdzono rozległe, żółtawe przebarwienia na mięśniu sercowym, sugerujące obecność zmian martwiczych. Dodatkowo u badanych gołębi: w wolu stwierdzono obecność karmy z wodą i żółcią, a w jelitach znajdowała się zielona, śluzowata lub wodnista treść. U trzech gołębi ujście kloaki było zanieczyszczone śluzowatymi odchodami.

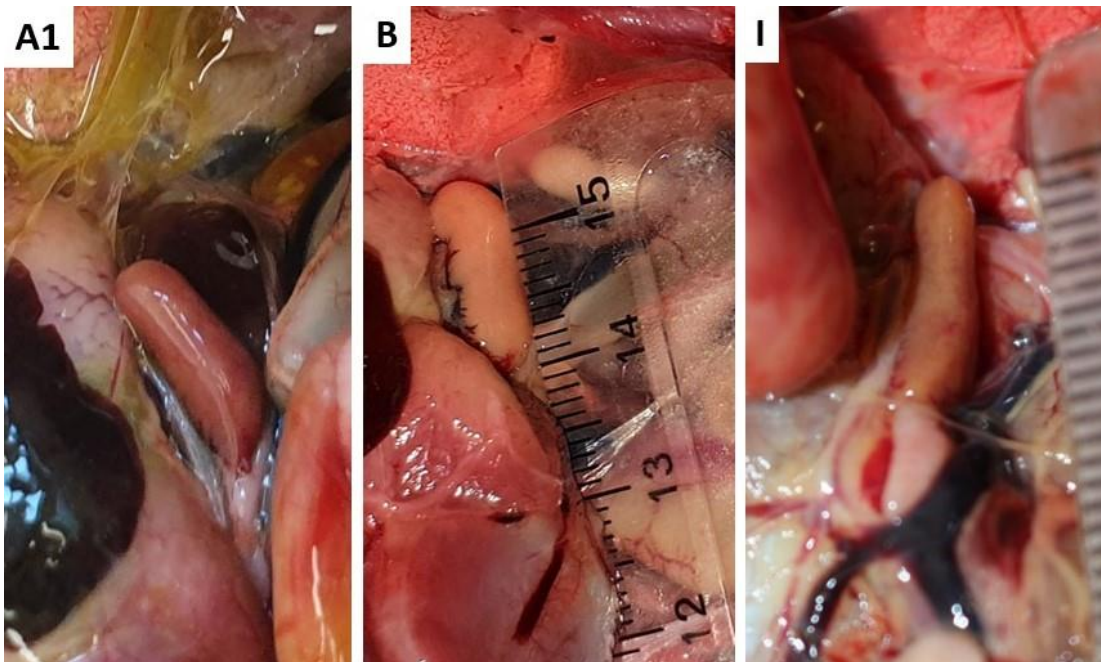


**Ryc. 1.** Zmiany makroskopowe w wątrobie i sercu u czterech gołębi RVA dodatnich (A1, A2, B i I), pochodzących z trzech ognisk choroby (A z województwa łódzkiego, B z województwa śląskiego i I z województwa mazowieckiego). Przekrwienie wątroby (A1 i B); powiększenie i plamistość wątroby oraz martwica mięśnia sercowego (A2, B i I).



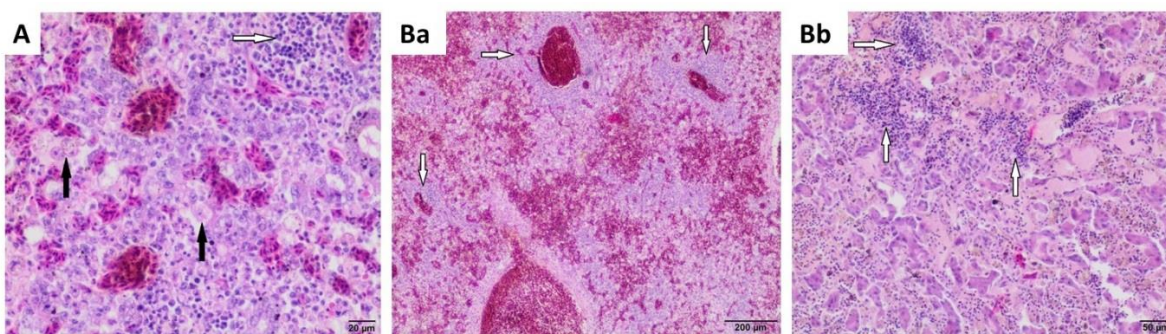
**Ryc. 2.** Zmiany makroskopowe w nerkach u trzech wybranych gołębi RVA dodatnich (A1, A2 i B), pochodzących z trzech ognisk choroby (A z województwa łódzkiego, B z województwa śląskiego i I z województwa mazowieckiego). Obrzęk nerek (A1, A2); bladość i nieznaczny obrzęk nerek (B).





**Ryc. 3.** Zmiany makroskopowe w śledzionach trzech wybranych gołębi RVA dodatnich (A1, B i I) z trzech ognisk choroby (A z województwa łódzkiego, B z województwa śląskiego i I z województwa mazowieckiego). Śledziona była blade i lekko lub umiarkowanie powiększona (A1, B i I).

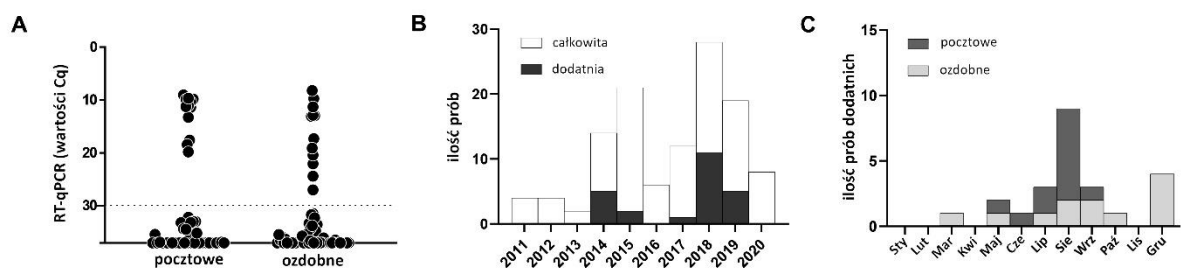
Mikroskopowa analiza próbek pobranych od trzech gołębi RVA dodatnich wykazała w wątrobie ogniskowe nacieki komórek jednojądrowych, martwicę, przekrwienie i wylewy krwawe, a także stłuszczenie i zastój żółci (Ryc. 3). W nerkach stwierdzono przekrwienie, wylewy krwawe, nacieki heterofili oraz akumulację komórek w nabłonku. U jednego gołębia stwierdzono obecność barwnika żółciowego w wieńcowej tkance tłuszczowej, przekrwienie mięśnia sercowego i ogniskową martwicę.



**Ryc. 4.** Zmiany mikroskopowe w wątrobie dwóch wybranych RVA dodatnich gołębi (A i B) z dwóch ognisk choroby (A w województwie łódzkim i B w województwie śląskim). Preparaty barwione hematoksyliną i eozyną. Silne przekrwienie i ogniskowe, głównie okołonaczyniowe nacieki zapalne złożone z komórek jednojądrowych (białe strzałki), składające się z limfocytów, komórek plazmatycznych i histiocytów, zmiany zwyrodnieniowe i martwica hepatocytów (czarne strzałki) – powiększenie 100× (A); silne przekrwienie, wylewy krwi, masywna krwotoczna martwica mięszu wątroby oraz okołonaczyniowy nacieki zapalny (białe strzałki) – powiększenie 40× (Ba); silne przekrwienie, wylewy krwawe i okołonaczyniowe nacieki zapalne z komórek jednojądrzastych

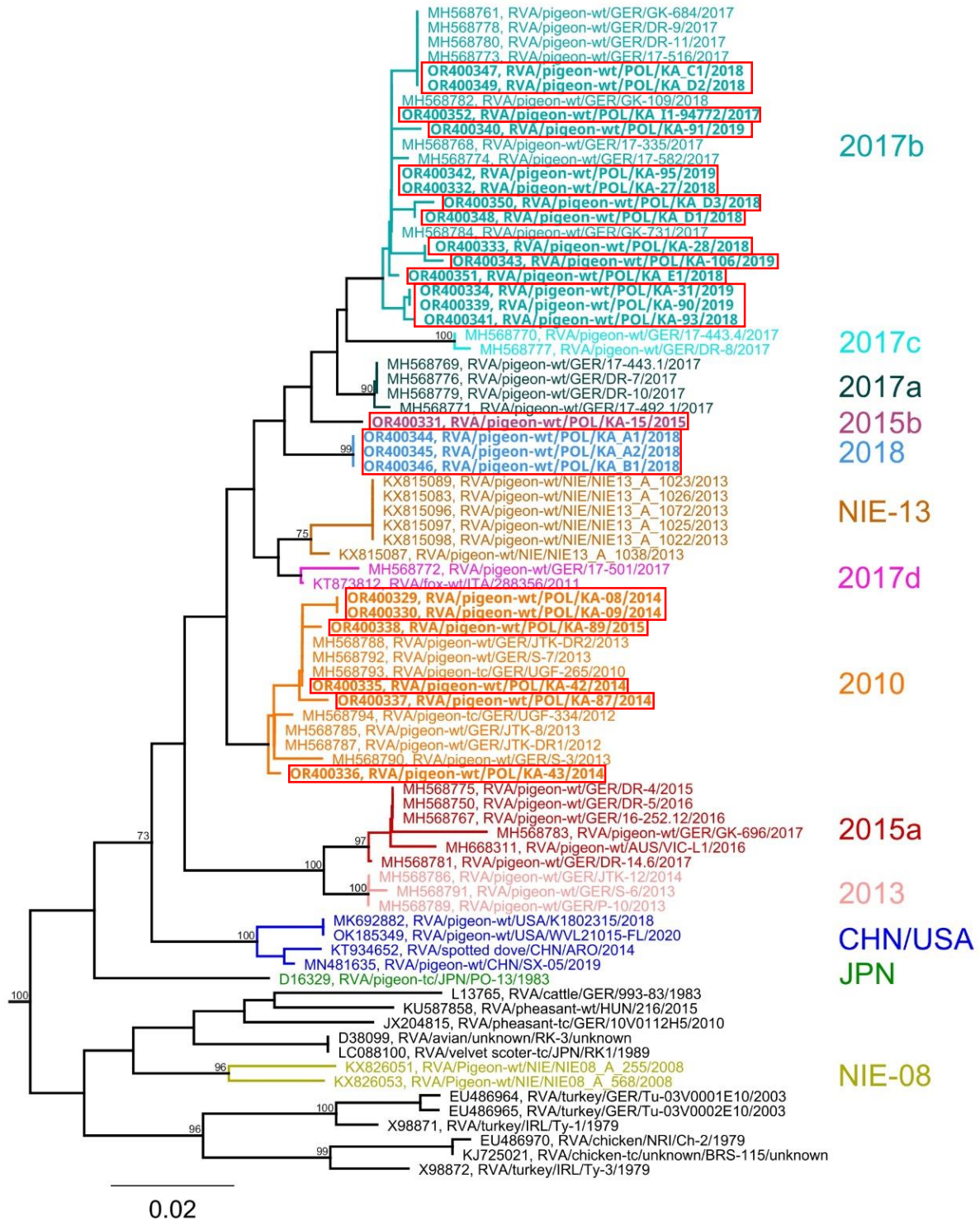
(białe strzałki), składające się z limfocytów, komórek plazmatycznych i histiocytów – powiększenie 200× (Bb).

W badaniu próbek wątrób pobranych od gołębi sekcjonowanych w latach 2011–2020, przy użyciu testu RT-qPCR specyficznego dla genu kodującego białko VP6, RNA RVA wykryto w 57 z 117 próbek (48,7%). W tym w 24 próbkach (20,5%) wartość C<sub>q</sub> była niższa niż 30, co wskazuje na ostrą CMG lub niedawne zakażenie RVA. Dodatkowo wyniki uzyskano w 12 z 51 próbek od gołębi pocztowych (23,5%) i w 12 z 66 próbek od gołębi ozdobnych (18,2%). Próbki RVA dodatnie pochodziły z lat 2014, 2015 oraz 2017–2019. W przypadku gołębi pocztowych zakażenia RVA wykryto między majem a wrześniem, z najwyższą liczbą przypadków w sierpniu, natomiast u gołębi ozdobnych dodatnie próbki były bardziej równomiernie rozłożone w ciągu roku, z najwyższą liczbą przypadków w grudniu (Ryc. 5).



**Ryc. 5.** Wykrywanie RNA genu kodującego białko VP6 rotawirusa A (RVA) w próbkach wątroby gołębi za pomocą RT-qPCR. Skalibrowane wartości cyklu kwantyfikacji (C<sub>q</sub>) dla poszczególnych próbek wątroby od gołębi pocztowych (n = 51) i gołębi ozdobnych (n = 66). Skalibrowane wartości C<sub>q</sub> poniżej 30 (oznaczone linią przerywaną) wskazują na ostrą CMG lub niedawne zakażenie RVA (wynik dodatni), natomiast skalibrowane wartości C<sub>q</sub> powyżej 30 mogą wskazywać na pozostałości po wcześniejszym zakażeniu (A). Liczba przebadanych próbek i próbek RVA dodatnich z lat 2011–2020 (B). Liczba próbek RVA dodatnich od gołębi pocztowych (n = 12) i gołębi ozdobnych (n = 12) według miesiąca pobrania próbek z lat 2011–2020 (C).

Analiza filogenetyczna częściowych sekwencji VP6 wykazała, że wszystkie sekwencje stwierdzone u gołębi pochodzących z polskich hodowli należą do genotypu I4 RVA specyficznego dla gołębi. Sześć sekwencji z lat 2014 i 2015 tworzyło klaster z sekwencjami wykrytymi w Niemczech w latach 2010–2014, natomiast 14 polskich sekwencji z lat 2017–2019 znalazło się w grupie razem z niemieckimi sekwencjami z tych samych lat (Ryc. 6).



**Ryc. 6.** Analiza filogenetyczna częściowych sekwencji genu VP6 rotawirusa A genotypu 14 pochodzących od gołębi, drobiu domowego i innych gatunków. Sekwencje o długości 392 par zasad pochodzące od polskich gołębi zostały przeanalizowane łącznie z sekwencjami uzyskanymi z GenBanku. Wartości bootstrap powyżej 70 są zaznaczone na głównych gałęziach drzewa. Kolory wskazują różne podklasy gołębie, jakie opublikowano w pracy Rubbenstroth'a i in. (2019). Podklasy są oznaczone rokiem pierwszego wykrycia w populacjach gołębi w Europie lub krajem pozaeuropejskim, w którym zostały wykryte. Sekwencje wygenerowane w trakcie tego badania znajdują się w czerwonych prostokątach.



CoRVA został niedawno uznany za czynnik wywołujący "klasyczną" CMG. Choć przypadki tej choroby były zgłaszane w całej Europie, dane dotyczące wirusa pochodziły głównie z Niemiec. Badanie potwierdziło obecność RVA w Polsce w archiwalnych próbkach wątroby z lat 2014–2015 oraz 2017–2019. Sezon lotów młodych gołębi w Polsce trwa od połowy sierpnia do końca września, a wyścigi dorosłych gołębi odbywają się od końca kwietnia do końca lipca. Najwięcej RVA dodatnich próbek od gołębi pocztowych zebrano w okresie od kwietnia do września, a w przypadku gołębi ozdobnych najwyższą liczbę przypadków odnotowano w grudniu, kiedy odbywają się wystawy. Kliniczne objawy wywołane przez RVA występują głównie podczas lotów i wystaw, gdy gołębie są najbardziej narażone na zakażenia, co stanowi poważne wyzwanie dla hodowców i lekarzy weterynarii opiekujących się stadami w tym trudnym dla ptaków okresie.

## *Publikacja II*

**Adamczyk K.**, Ledwoń A., Czopowicz M., Szeleszczuk P., 2024, The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season, *BMC Veterinary Research*, 20, 305.

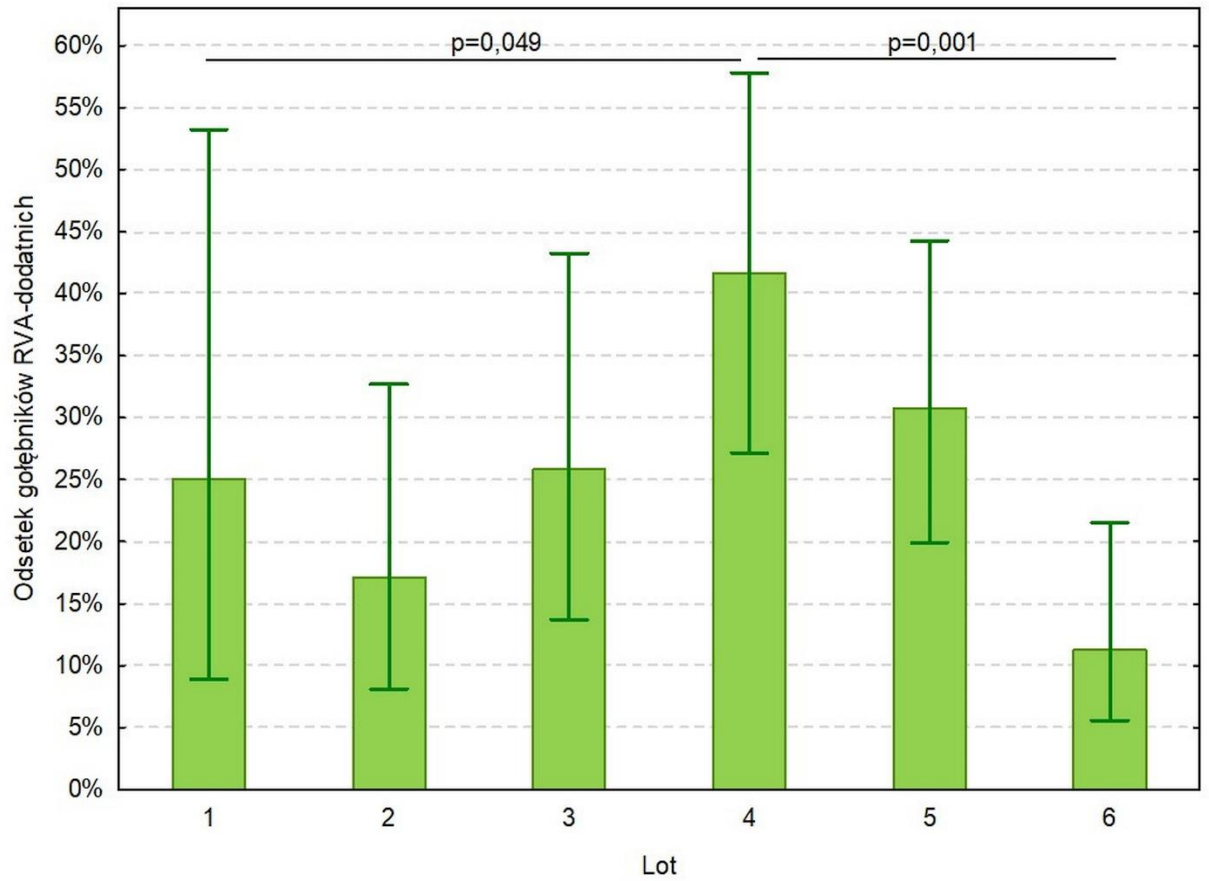
### **Cele pracy:**

- badanie przebiegu zakażeń RVA u młodych gołębi w sezonie lotowym.
- ocena zastosowania metody RT-qPCR w diagnostyce zakażeń RVA w próbkach kałomoczu gołębi pobranych z koszy transportowych.

W badaniu próbek kałomoczu pobranych od młodych gołębi pocztowych podczas sezonu lotowego, skupiono się na analizie transmisji zakażeń RVA w trakcie treningów i lotów konkursowych. Celem badań było poznanie dynamiki rozprzestrzeniania się choroby w warunkach terenowych oraz ocena skuteczności zastosowanych testów diagnostycznych w wykrywaniu zakażeń klinicznych i subklinicznych RVA u młodych gołębi pocztowych.

Do badania pobierano próbki kałomoczu z koszy transportowych, w których przewożono gołębie na miejsce startu. Z próbek tych izolowano RNA, które użyto do RT-qPCR w kierunku RVA. Analiza obejmowała sześć lotów, co pozwoliło na obserwację zmian odsetka zakażeń w czasie.

Badania wykazały, że odsetek zakażeń RVA wzrastał do czwartego lotu, po czym zaczynał spadać (Ryc. 7). Sugeruje to, że podczas pierwszych lotów gołębie wykazywały większą podatność na zakażenia, jednak w miarę trwania sezonu lotowego mogła rozwinąć się u nich odporność. W przypadkach, gdzie wartości C<sub>q</sub> w teście qRT-PCR były poniżej 20, hodowcy często decydowali się na rezygnację z udziału w kolejnych lotach lub zgłaszali występowanie choroby w stadzie. Z kolei wartości C<sub>q</sub> w przedziale od 20 do 30 były związane z brakiem objawów klinicznych choroby, co sugeruje, że gołębie były zakażone subklinicznie.



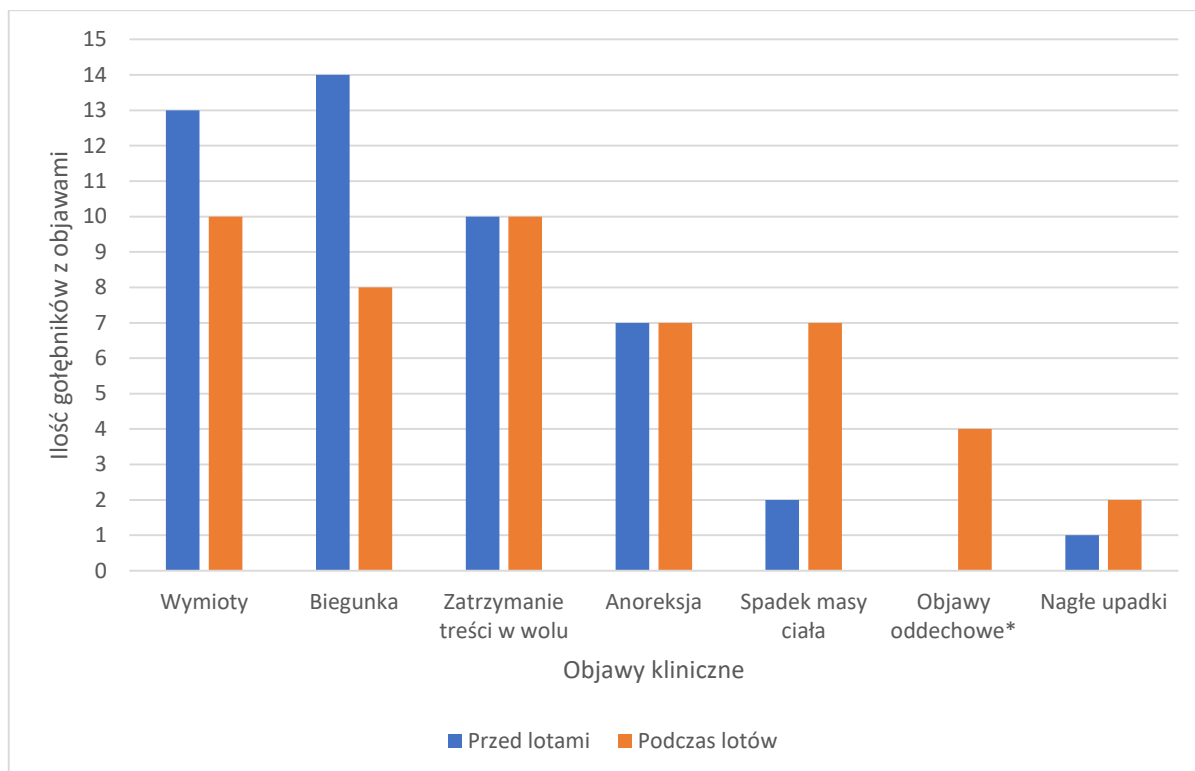
**Ryc. 7.** Procentowy udział dodatnich wyników RT-qPCR na obecność RVA w próbkach odchodów zebranych z koszy poszczególnych hodowców w kolejnych lotach. Słupki błędę wskazują 95% CI.

**Tabela 1.** Podsumowanie wyników RT-qPCR na obecność RVA w próbkach odchodów zebranych z koszy, w których transportowano gołębie z poszczególnych gołębników w kolejnych lotach, liczba hodowców którzy zgłosili objawy kliniczne CMG podczas lotów oraz brak udziału gołębi w kolejnym locie po wykryciu RVA.

Numer lotu	Ilość gołębników biorących udział w lotach	Gołębniki z dodatnim wynikiem RVA qRT-PCR		Ilość wyników z Cq poniżej 20	Zgłoszone objawy CMG przed lub po locie	Liczba hodowców biorących udział w kolejnym locie po wykryciu RVA
		Ilość	Proporcja (CI 95%) [%]			
1	12	3	25 (9 – 53)	1/3	1	1
2	35	6	17 (8 – 33)	1/6	0	2
3	31	8	26 (14 – 43)	3/8	3	3
4	36	15	42 (27 – 58)	4/15	6	6
5	52	16	31 (20 – 44)	1/16	1	2
6	62	7	11 (6 – 22)	0/7	0	3

CI 95%

Dodatknie wyniki testu RVA RT-qPCR stwierdzono u gołębi pochodzących od 61% hodowców uczestniczących w badaniu, co wskazuje na szerokie rozprzestrzenienie się wirusa w populacji gołębi pocztowych (Tabela 1). Objawy kliniczne, takie jak zwracanie z wola, biegunka i zaleganie pokarmu w wolu, były najczęściej zgłaszane przez hodowców u RVA dodatnich gołębi, co potwierdzało obecność aktywnego zakażenia (Ryc. 8).



**Ryc. 8.** Objawy kliniczne zaobserwowane w gołębnikach dotkniętych CMG przed i w trakcie lotów. Gwiazdka wskazuje objaw nietypowy dla CMG.

Badania wykazały, że podczas treningów i lotów konkursowych gołębie były narażone na kontakt z RVA, co miało bezpośredni wpływ na ich zdrowie i wyniki w lotach. Zauważono również, że po czterech lotach liczba nowych przypadków choroby znacząco spadła, co może wskazywać na rozwój odporności u gołębi w miarę trwania sezonu lotowego. Test RT-qPCR okazał się przydatnym narzędziem w diagnozowaniu i różnicowaniu klinicznych i subklinicznych zakażeń RVA u gołębi pocztowych, co może pomóc lekarzom weterynarii i hodowcom w ocenie charakteru zakażenia i podejmowaniu kroków mających na celu minimalizację ryzyka rozprzestrzeniania się choroby.

**Tabela 2.** Podsumowanie wyników qRT-PCR na obecność rotawirusa A (RVA) w próbkach kałomoczu zebranych z koszy z gołębiami należącymi do jednego hodowcy oraz koszy z gołębiami pochodzącymi od różnych hodowców w kolejnych lotach.

Lot	Całkowita liczba koszy	Liczba		RVA-dodatnie (CI 95%)				wartość p
		koszy z gołębiami jednego hodowcy	współdzielonych koszy	koszy z gołębiami jednego hodowcy		współdzielonych koszy		
				n	% (CI 95%)	n	% (CI 95%)	
1	36	36	0	4	11 (4 – 25)	-	-	-
2	124	122	2	10	8 (5 – 14)	0	0 (0 – 66)	0.999
3	58	37	21	11	30 (17 – 46)	3	14 (5 – 35)	0.174
4	96	93	3	30	32 (24 – 42)	1	33 (6 – 79)	0.999
5	63	48	15	14	29 (18 – 43)	5	33 (15 – 58)	0.760
6	85	67	18	7	10 (5 – 20)	1	6 (1 – 26)	0.999

CI 95% - 95% przedział ufności

Badanie dostarczyło istotnych informacji na temat przebiegu zakażeń RVA u młodych gołębi pocztowych podczas sezonu lotowego, potwierdzając skuteczność monitorowania zakażeń RVA u gołębi za pomocą testów molekularnych próbek kałomoczu, pobranych z koszy transportowych.

## Dyskusja

Rotawirus grupy A (RVA) typu gołębiego został stosunkowo niedawno zidentyfikowany jako główny czynnik wywołujący „klasyczną” chorobę młodych gołębi – CMG (McCowan i in., 2018). Pomimo, że przypadki tej choroby zgłaszano w różnych krajach Europy, dane literaturowe dotyczące jej występowania pochodziły głównie z Niemiec i Belgii (Rubbenstroth i in., 2019, Harzer i in., 2021, Meßmer i in., 2022, Schmidt i in., 2021). W powyższej pracy potwierdzono obecność RVA w pierwszych rozpoznanych przypadkach CMG u gołębi w Polsce, w latach 2017–2018 a także w archiwalnych próbkach wątrobry gołębi, pobranych w latach 2014–2015 oraz 2017–2019 (Adamczyk i in., 2024).

Szczególnie wysoką liczbę dodatnich wyników odnotowano w próbkach pobranych w okresie letnim, co pokrywa się z czasem intensywnych treningów młodych gołębi, które często po raz pierwszy mają kontakt z ptakami z innych gołębników. W przypadku gołębi ozdobnych, okres w którym wykrywano obecność RVA, był dłuższy, z najwyższą liczbą przypadków w grudniu, co mogło być związane z wystawami gołębi, które odbywają się w okresie jesienno-zimowym (Schmidt i in., 2021).

Porównania z wynikami innych badań wskazują na różnice w okresach zwiększonego ryzyka na zakażenie, które zależą od położenia geograficznego i przemieszczania gołębi. Na przykład, w badaniach przeprowadzonych przez Blakey i współpracowników (2019), przypadki RVA u gołębi pocztowych w Kalifornii miały miejsce w okresie od kwietnia do listopada, co może wynikać z dłuższego sezonu lotowego w tym regionie świata, szczególnie w przypadku lotów młodych gołębi, które trwają do grudnia. W Australii pierwsze przypadki zgłaszano od końca maja do lipca, jednak zdarzały się także i sporadyczne w październiku, grudniu i kwietniu, zazwyczaj po transporcie gołębi z innych gołębników (McCowan i in., 2018). Inne badania z Australii, prowadzone przez Hunnam i współpracowników (2019), wykazały, że najwięcej przypadków CMG odnotowano od grudnia do maja, w zależności od lokalizacji. W tych przypadkach, zwłaszcza w grudniu, zakażenie było częściej związane z zakupem nowych ptaków i wprowadzeniem ich do gołębnika niż z lotami.

Przeprowadzone przez innych autorów badania wskazują, że najważniejszymi czynnikami ryzyka w rozprzestrzenianiu się RVA są kontakty z zakażonymi ptakami podczas lotów i transportu (McCowan i in., 2018, Meßmer i in., 2022), wprowadzanie nowych ptaków do gołębników oraz stres związany z kontaktem ptaków z innymi,

nieznanymi gołębiami (Meßmer i in., 2022, Raue i in., 2005, Schmidt i in., 2021). Prowadzone podczas lotów młodych gołębi badania wykazały, że CMG zwykle pojawiała się od 1 do 7 dni po locie, co jest zgodne z danymi innych autorów, którzy opisywali objawy choroby pojawiające się 6–7 dni po locie (Hansen i in., 2020) oraz 1–4 dni po wystawie (Harzer i in., 2021).

Wyniki przeprowadzonych przez nas doświadczeń wykazały, że u gołębi pocztowych z 61% gołębników wykryto obecność RVA w kałomoczu, podczas gdy w innych badaniach (Harzer i in., 2021) tylko w 10% stad gołębi ozdobnych. To zróżnicowanie może wynikać z mniejszego kontaktu gołębi ozdobnych z obcymi ptakami poza sezonem wystawowym, co ogranicza ryzyko wprowadzenia zakażenia do gołębnika.

CoRVA był obecny w 48,7% próbek zebranych w latach 2011–2020. Jednakże wiele z tych próbek wykazywało wysokie wartości Cq, co świadczy o bardzo niewielkiej ilości wirusowego RNA. Pierwsze przypadki zakażeń RVA, gdzie wartości Cq były niskie, pojawiły się w Polsce w 2014 roku. Zarówno na podstawie badań przeprowadzonych u młodych gołębi w trakcie sezonu lotowego, jak i wyników innych autorów (McCowan i in., 2018, Rubbenstroth i in., 2019, Rubbenstroth i in., 2020) stwierdzono, że próbki o wartościach Cq powyżej 30 pochodzą od gołębi, po już wcześniej przebytej chorobie, natomiast wartości poniżej 20 wskazują na ostrą fazę zakażenia.

Najczęściej zgłaszanymi przez hodowców w Polsce objawami CMG były wymioty, biegunka, zatrzymanie pokarmu w wolu, brak apetytu oraz spadek masy ciała. W badaniach innych autorów symptomatologia różniła się w zależności od regionu i populacji gołębi. W większości publikacji najczęściej opisywanymi objawami były wymioty i biegunka (Blakey i in., 2019, Hunnam i in., 2019, Meßmer i in., 2022), podczas gdy w innych zgłaszano najczęściej brak apetytu (Hansen i in., 2020, Rubbenstroth i in., 2019). Zakażenie RVA prowadziło do różnej zachorowalności i śmiertelności w gołębnikach, przy czym odsetek zachorowań wynosił od 3% do 100%, a śmiertelność od 0% do 50%. Podobne wyniki odnotowano w innych badaniach (Hunnam i in., 2019, McCowan i in., 2018, Rubbenstroth i in., 2019, 2020), gdzie zachorowalność wynosiła do 100%, a śmiertelność od 0% do 45%. W niektórych przypadkach (Harzer i in., 2021), śmiertelność wynosiła nawet 75%, co mogło być spowodowane współwystępowaniem innych zakażeń.

W prowadzonych przez nas badaniach sekcyjnych gołębi padłych z powodu CMG stwierdzono głównie zmiany w wątrobie takie jak: przekrwienie, powiększenie, plamistość,



a w skrajnych przypadkach całkowita zmiana koloru organu na żółtawo-pomarańczowy. Nieco węższy zakres zmian w wątrobie, od ich braku do powiększenia narządu, plamistości, przekrwienia oraz kruchości narządu opisali Blakey i wsp. (2019). Interesującym odkryciem było wystąpienie zmian w mięśniu sercowym u trzech gołębi, czego nie opisywano wcześniej w kontekście zakażeń RVA. Podobnie jak w innych badaniach, stwierdzono zmiany w workach powietrznych, które mogły być spowodowane aspiracją pokarmu do układu oddechowego bezpośrednio przed śmiercią ptaków (Blakey i in., 2019, McCowan i in., 2018, Schmidt i in., 2021). W badaniu mikroskopowym stwierdzono martwicę wątroby i ogniskowe nacieki komórek jednojądrzastych, co było zgodne z wynikami wcześniejszych badań (Blakey i in., 2019).

## Podsumowanie

Rotawirus typu A (RVA) od dawna, a w Polsce co najmniej od 2014 roku powoduje straty w hodowli gołębi, choć właściwa przyczyna choroby młodych gołębi została stwierdzona dopiero w 2018 roku (McCowan i in., 2018, Rubbenstroth i in., 2019). Poza zmianami w wątrobie, jelitach i śledzionie, u chorych gołębi mogą występować również zmiany martwicowe w mięśniu sercowym. Podczas lotów treningowych i konkursowych nie sposób uniknąć narażenia gołębi na patogeny, w tym RVA. Badania pokazują, że po zaledwie czterech lotach liczba nowych przypadków choroby spada, co wskazuje na rozwój odporności. Test qRT-PCR na obecność RNA RVA w kałomoczu gołębi jest przydatnym narzędziem diagnostycznym, umożliwiającym rozróżnienie zakażeń klinicznych (Cq poniżej 20) od subklinicznych. Przebieg zakażenia jest podobny niezależnie od tego, czy gołębie od różnych hodowców są transportowane w tych samych koszach, czy w oddzielnych podczas wspólnych lotów.

W badaniach zaobserwowano znaczne różnice w zachorowalności i śmiertelności wśród gołębi z różnych hodowli. Różnice te mogą wynikać z różnych praktyk hodowlanych, w tym zarządzania stresem i zdrowiem gołębi, co podkreśla konieczność zindywidualizowanego podejścia do profilaktyki i leczenia w każdej hodowli. Obecnie są już dostępne szczepionki dla gołębi przeciwko RVA, których zastosowanie może spowodować znaczne ograniczenie zachorowań młodych gołębi i jest to zagadnienie którym zamierzam się zająć w przyszłości.

## Wnioski

1. Pierwsze przypadki rotawirusy u gołębi pocztowych w Polsce potwierdzono w latach 2017-2018. Zmiany sekcyjne występowały głównie w wątrobie, śledzionie, nerkach oraz, w niektórych przypadkach, w mięśniu sercowym.
2. Analizy archiwalne wykazują obecność rotawirusa A (RVA) w polskiej populacji gołębi już od 2014 roku. Liczba zakażeń wzrasta szczególnie w sezonie lotowym młodych gołębi.
3. W sezonie lotowym młode gołębie są narażone na intensywny kontakt z innymi ptakami, co sprzyja rozprzestrzenianiu się RVA. Zachorowalność w badanych stadach wynosiła od 3% do 100%, a śmiertelność od 0% do 50%. Odporność na zakażenie rozwijała się w trakcie sezonu, co objawiało się wzrostem zakażeń do czwartego lotu, a następnie ich spadkiem.
4. Zastosowanie RT-qPCR jest bardzo skutecznym badaniem w diagnostyce klinicznych i subklinicznych przypadków zakażeń RVA. Pobieranie próbek kałomoczu z koszy transportowych umożliwia przeprowadzenie bezstresowego badania.

## Literatura

1. Adamczyk, K.; Rubbenstroth, D.; Ledwoń, A.; Sapieryński, R.; Szeleszczuk, P. The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. *J. Vet. Res.* 2024, 68, 55-61.
2. Adamczyk, K.; Ledwoń, A.; Czopowicz, M.; Szeleszczuk, P. The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season. *BMC Vet. Res.* 2024, 20, 305.
3. Basham, R.A.; Dill-Okubo, J.; Subramaniam, K.; Waltzek, T.B.; Viadanna, P.H.O. Genome sequence of rotavirus A from a Florida Racing Pigeon (*Columba livia domestica*). *Microbiol. Resour. Announc.* 2022, 11, e0114921.
4. Blakey, J.; Crossley, B.; Rosenberger, J.K.; Rejmanek, D.; Markis, M.; Bickford, A.; Bland, M.; Woods, L.; Schivaprasad, H.L.; Goldsmith, D.; Stoute, S. Rotavirus A associated with clinical disease and hepatic necrosis in California pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Dis.* 2019, 63, 651–658.
5. Dhama, K.; Saminathan, M.; Karthik, K.; Tiwari, R.; Shabbir, M.Z.; Kumar, N.; Malik, Y.S.; Singh, R.K. Avian Rotavirus Enteritis - an Updated Review. *Vet. Q.* 2015, 35, 142–158.
6. Duchatel, J.P.; Szeleszczuk, P. Young Pigeon Disease Syndrome. *Med. Weter.* 2011, 67, 291–294.
7. Gough, R.E.; Cox, W.J.; Devoy, J. Isolation and identification of rotavirus from racing pigeons. *Vet. Rec.* 1992, 130, 273.
8. Hansen, R.D.E.; Stidworthy, M.F.; Jones, R.; Sanster, C.R.; Ressel, L. Rotavirus infection in a racing pigeon (*Columba livia*) in Great Britain during 2018. *Vet. Rec. Case Rep.* 2020, 8, 1–4.
9. Harzer, M.; Heenemann, K.; Sieg, M.; Vahlenkamp, T.; Freick, M.; Rückner, A. Prevalence of pigeon rotavirus infections: animal exhibitions as a risk factor for pigeon flocks. *Arch. Virol.* 2021, 166, 65–72.
10. Hu, L.; Crawford, S.E.; Hyser, J.M.; Estes, M.K.; Prasad, B.V.V. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Curr. Opin. Virol.* 2012, 2, 380–388.
11. Hunnam, J.C.; Sloan, S.; McCowan, C.I.; Glass, E.; Walker, C. The Racing Pigeon (*Columba livia domestica*) industry in Victoria, Australia, and epidemiology of a novel group A Rotavirus outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019, 66, 2058–2066.

12. McCowan, C.; Cramer, S.; Kocak, A.; Shan, S.; Fegan, M.; Forshaw, D.; Rubbenstroth, D.; Chen, H.; Holmes, C.; Harper, J.; Dearnley, M.; Batovska, J.; Bergfeld, J.; Walker, C.; Wang, J. A Novel Group A Rotavirus Associated with Acute Illness and Hepatic Necrosis in Pigeons (*Columba livia*), in Australia. *PLoS One* 2018, 13, e0203853.
13. Meßmer, C.; Rubbenstroth, D.; Mohr, L.; Peus, E.; Schreiber, T.; Rautenschlein, S. Pigeon Rotavirus A as the cause of systemic infection in juvenile pigeons (young pigeon disease). *Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere* 2022, 50, 293–301.
14. Minamoto, N.; Oki, K.; Tomita, M.; Kinjo, T.; Suzuki, Y. Isolation and characterization of rotavirus from feral pigeon in mammalian cell cultures. *Epidemiol. Infect.* 1988, 100, 481.
15. Polski Związek Hodowców Gołębi Poczтовых, Regulamin współzawodnictwa lotowego o mistrzostwo polski w kategoriach na 2024 rok, <https://pzhgp.pl/regulaminy/>
16. Polski Związek Hodowli Gołębi Rasowych i Drobного Inwentarza (Polish Association of Purebred Pigeon and Small Livestock Breeders): Związki i Stowarzyszenia (Associations – in Polish), <https://www.pzhgridi.pl/zwiazki.php>.
17. Raue, R.; Schmidt, V.; Freick, M.; Reinhardt, B.; Johne, R.; Kamphausen, L.; Kaleta, E.F.; Müller, H.; Krautwald-Junghanns, M.E. A Disease Complex Associated with Pigeon Circovirus Infection, Young Pigeon Disease Syndrome. *Avian Pathol.* 2005, 34, 418–425.
18. Rubbenstroth, D.; Peus, E.; Schramm, E.; Kottmann, D.; Bartels, H.; McCowan, C.; Schulze, C.; Akimkin, V.; Fischer, N.; Wylezich, C.; Hlinak, A.; Spadinger, A.; Großmann, E.; Petersen, H.; Grundhoff, A.; Rautenschlein, S.; Teske, L. Identification of a Novel Clade of Group A Rotaviruses in Fatally Diseased Domestic Pigeons in Europe. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019, 66, 552–561.
19. Rubbenstroth, D.; Ulrich, R.; Wylezich, C.; Rautenschlein, S.; Beer, M.; Mohr, L. First Experimental Proof of Rotavirus A (RVA) Genotype G18P(17) Inducing the Clinical Presentation of ‘Young Pigeon Disease Syndrome’ (YPDS) in Domestic Pigeons (*Columba livia*). *Transbound. Emerg. Dis.* 2020, 67, 1507–1516.
20. Schmidt, V.; Kümpel, M.; Cramer, K.; Sieg, M.; Harzer, M.; Rückner, A.; Heenemann, K. Pigeon rotavirus A genotype G18P(17)-associated disease outbreaks after fancy pigeon shows in Germany – a case series. *Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere* 2021, 49, 22–27.



# The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland

Krzysztof Adamczyk<sup>1✉</sup>, Dennis Rubbenstroth<sup>2</sup>, Aleksandra Ledwoń<sup>1</sup>,  
Rafał Sapieryński<sup>1</sup>, Piotr Szeleszczuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Warsaw University of Life Sciences, 02-776 Warszawa, Poland

<sup>2</sup>Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, 17493 Greifswald - Insel Riems, Germany  
krzysztof\_adamczyk@sggw.edu.pl

Received: August 11, 2023

Accepted: January 26, 2024

## Abstract

**Introduction:** Although the presence of rotaviruses in pigeon samples has been reported since the 1980s, its importance as an aetiological agent of the “classical” young pigeon disease (YPD) was not proven until 2020, when the Henle–Koch postulates were confirmed for pigeon-type rotavirus A (RVA) genotype G18P(17). **Material and Methods:** From 2011 to 2020, archived liver samples from 117 pigeons submitted by 74 individual lofts were tested for the presence of pigeon-type RVA using a VP6-specific RT-qPCR test. For four positive racing pigeons, a more detailed necropsy and histopathological analysis was performed. **Results:** Indicators of an acute RVA infection were found in 24 out of 117 (20.5%) samples tested, the earliest in 2014. Necropsies of the four selected RVA-positive pigeons showed changes mainly in the liver, spleen and kidneys similar to those described by other researchers. The histopathological examination revealed mainly hyperaemia and necrosis in the liver, as well as mononuclear cell infiltrates in these organs. **Conclusion:** Pigeon-type RVA is also a cause of YPD in Poland and is a serious challenge for racing pigeon breeders and veterinarians, especially during the training and flights of young pigeons.

**Keywords:** pigeon-type rotavirus A (RVA), racing pigeon, young pigeon disease, pigeon viral diseases.

## Introduction

Young pigeon disease (YPD) is a common problem in the breeding of domestic pigeons (*Columba livia*) and has been known for more than three decades (6, 16, 21). Various pathogens, including pigeon adenoviruses, pigeon circovirus 1 and *Escherichia coli* had been suspected to be involved (7, 21, 25) prior to the 2020 fulfilment of the Henle–Koch postulates and confirmation of a pigeon-associated clade of rotavirus A genotype G18P(17) as the causative agent of “classical” YPD (16, 23). Rotavirus A (RVA) is a double-stranded RNA virus in the *Rotavirus* genus and *Reoviridae* family. Although rotavirus infections including RVA G18P(17) had been diagnosed much earlier in pigeons, they were not clearly associated with diseases of young pigeons at that time (9, 17, 18, 26). Fatal diseases of juvenile pigeons associated with RVA have been reported in Australia, Europe and the USA (2, 3, 10, 13, 15, 22, 24). In most cases, pigeon-type RVA was able to establish systemic infection and it necrotised birds’ livers (3, 15, 16, 22,

23). Infection with RVA spreads quickly through a loft and typically causes high morbidity up to 100% and mortality ranging from none to more than 50% (3, 13, 15, 16, 22). Usually, the course of disease in affected flocks lasts around one week, and it takes up to three weeks for recovered pigeons to regain weight (23). Clinical manifestations of RVA infection included apathy, anorexia, slimy greenish diarrhoea, vomiting and a congested crop (15, 16, 22, 23). In contrast, neurological or respiratory signs were only rarely reported (15, 22, 23). Gross lesions observed at necropsy were an enlarged and diffusely mottled liver and a moderately enlarged, pale spleen. The kidneys were usually enlarged and sometimes pale. The crop was often filled with watery content and the intestine content of some pigeons was green and watery (3, 24).

Poland is one of the world-leading nations in pigeon breeding (8). According to the Federation Colombophile Internationale, based on the number of rings distributed to Polish breeders, around 4 million juvenile racing pigeons are hatched annually by over

40,000 breeders associated in clubs (8, 20). As for fancy pigeons, about 3,000 breeders are members of the Polish Association of Purebred Pigeon and Small Livestock Breeders, and approximately 200,000 rings were distributed in 2022 (19), but it is suspected that many owners of fancy pigeons are not members of any organisation. In any case, transport to racing competitions and staging exhibitions brings high numbers of juvenile birds into very close direct contact and provides an ideal environment for the spread of pathogens, including pigeon-type RVA (5, 13).

The RVA genome is composed of 11 segments of double-stranded RNA, which encode six structural proteins (VP1 to VP4, VP6, and VP7) and six nonstructural proteins (NSP1 to NSP6) (12, 14). The PCR assay targeting VP6 was shown to be the most sensitive quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) assay because it produced lower values of the cycle of quantification (C<sub>q</sub>); therefore, it was used in this study (15, 22). Here the first reported clinical cases of pigeon-type RVA infection are described which were found in young domestic pigeons in Poland, and pigeon-type RVA sequences determined from archived samples from 2011–2020 are analysed phylogenetically.

## Material and Methods

**Origin of samples.** From 2011 to 2020, archived liver samples from 117 pigeons (66 fancy and 51 racing birds) originating from 74 individual lofts were tested for the presence of pigeon-type RVA. Six of these samples were formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material, and the remaining samples had been frozen when fresh. They originated mainly from the Mazovia voivodeship (n = 89), but also from Warmia and Mazury (n = 9), Pomerania (n = 4), Łódź (n = 2), Silesia (n = 1) and Greater Poland voivodeships (n = 1). The region of origin was unknown for eleven individuals (Supplementary Table 1). A more detailed necropsy was performed on four pigeons from three lofts and a histopathological examination was carried out on three pigeons from these lofts. Clinical data was also provided by the breeders of these four pigeons. They were approximately four-month-old racing pigeons that were delivered for necropsy in July 2017 and August 2018. They originated from three different lofts from the Łódź, Silesia and Mazovia voivodeships.

**Necropsy and histopathology.** Necropsy and sample collection were performed for all pigeons according to standard avian necropsy protocols in the Department of Pathology and Veterinary Diagnostics in the Institute of Veterinary Medicine of the University of Life Sciences in Warsaw. Livers were collected in sterile tubes and stored at –20°C until extraction of nucleic acids was carried out. For histopathological examination, samples of the heart, liver, kidney, spleen, duodenum and pancreas were collected during necropsy from three pigeons submitted in 2017 and 2018 from three different

outbreaks. They were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin following standard protocols. The paraffin blocks were cut into 5 µm sections, stained with haematoxylin and eosin and examined using light microscopy.

**Extraction of RNA and detection of RVA-specific RNA.** Total RNA was extracted from comparable pea-sized sections of frozen liver samples using a NucleoMag VET kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) with a KingFisher Flex Purification System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ribonucleic acid from FFPE samples was extracted using a miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany). All procedures were performed according to the manufacturers' instructions. A defined number of copies of *in vitro*-transcribed RNA of the *egfp* enhanced green fluorescent protein gene was added to each sample during RNA extraction as an internal control to confirm the efficiency of RNA extraction and the RT-qPCR reaction (11). Screening for pigeon RVA was performed with a previously published VP6-specific RT-qPCR assay (forward primer: CoRVA\_VP6\_868+, 5'-GCCCGYAATTTTCGATTCAATACG-3'; reverse primer: CoRVA\_VP6\_943-, 5'-GTGCTGCTACTCCAGGTGTCAT-3'; TaqMan probe: CoRVA\_VP6\_898\_P, 6FAM-5'-TTCCAACCTTGTTAGGCCRCCAA-3'-BHQ1) (22) with AgPath-ID One-Step RT-PCR reagents (Thermo Fisher Scientific). Briefly, 5 µL of extracted RNA was mixed with 2 µL of primer mix (containing each primer at a concentration of 5 µM) and denatured at 95°C for 5 min. Subsequently, 18 µL of master mix containing 12.5 µL of AgPath 2× buffer, 2 µL of AgPath enzyme mix (reverse transcriptase and Taq polymerase), the RVA-specific probe at a final concentration of 0.12 µM and primers and probes for the detection of *egfp* RNA was added and the reaction was performed with the following cyclers setup: 45°C for 10 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. Standard preparations of cell culture supernatant and extracted RNA from isolates DR-7 and DR-5 (22), respectively, served as respective positive controls of RNA extraction and RT-qPCR. Cycle of quantification values were calibrated by adjusting the threshold to set the C<sub>q</sub> values of the two positive controls to constant values (+/- 0.5) in each RT-qPCR run. Values lower than 30 were considered as indicative of an acute RVA infection (22, 23).

**RVA sequencing and phylogenetic analysis.** Partial VP6 gene sequences were generated for all RVA-positive pigeons with a C<sub>q</sub> value <30. A 438-base pair (bp) fragment of the VP6 segment was amplified by conventional RT-PCR using AvRVA\_VP6\_243+ (5'-GGAYGCGAATTACGTTGAGAATG-3') and CoRVA\_VP6\_680- (5'-TTTAACTCTTCGCATTGGTAC-3') primers (22). Following gel electrophoresis, products of the expected length were extracted using Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Sanger sequencing was performed by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). Raw sequences were trimmed for quality and primer sequences to achieve



a final sequence of 392 bp. Sequences were submitted to GenBank under accession numbers OR400329 to OR400352.

Phylogenetic analysis was performed for all partial VP6 sequences generated during this study together with avian RVA VP6 sequences derived from GenBank. Following nucleotide sequence alignment using MUSCLE, a phylogenetic tree was built using the neighbour-joining algorithm and Jukes–Cantor distance model in Geneious Prime 2021.0.1 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). Avian RVA VP6 sequences of genotypes I11 and I21 were used to root the tree.

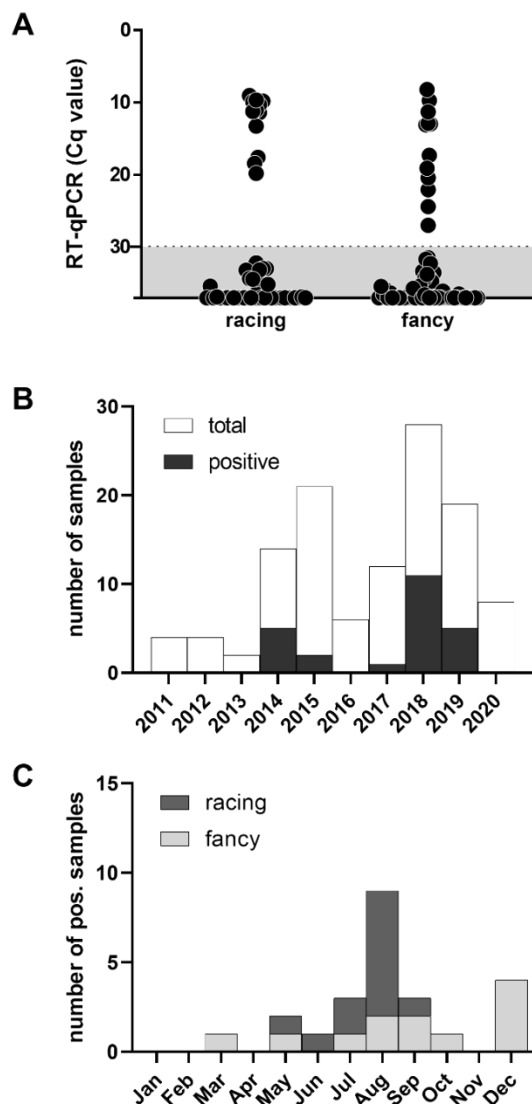
## Results

### Detection of pigeon-type RVA-specific RNA.

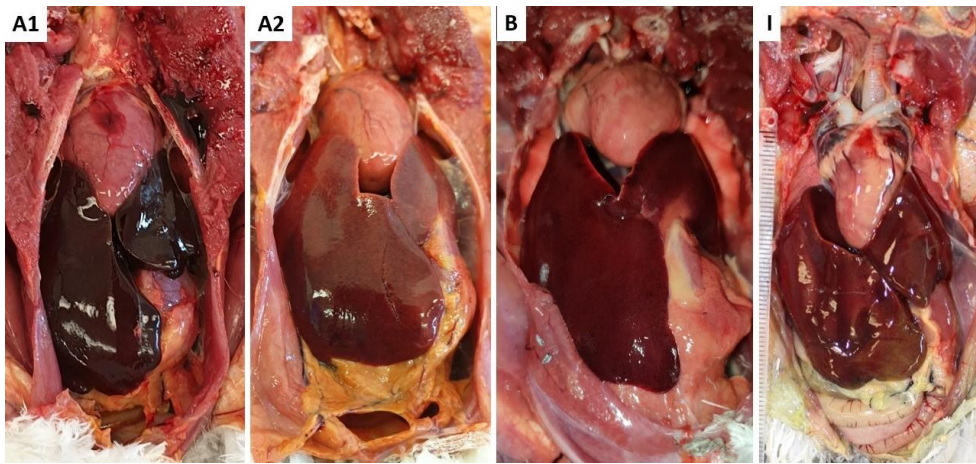
Using a VP6-specific RT-qPCR test, different levels of pigeon-type RVA RNA could be detected in 57 out of 117 samples (48.7%) (Fig. 1A, Supplementary Table 1). Based on previous experiments, only calibrated Cq values below 30 were considered indicative of an acute or recent RVA infection, whereas calibrated Cq values above 30 were considered as possibly indicating remnants of a past infection (22, 23). Such positive results were obtained for 24 out of 117 (20.5%) tested samples. Positive test results were obtained for 12 out of 51 (23.5%) samples from racing pigeons and 12 out of 66 (18.2%) samples from fancy pigeons (Fig. 1A). The positive pigeons originated from 19 out of the 74 tested lofts (25.7%). Positive samples were detected in the years 2014, 2015 and 2017 to 2019 (Fig. 1B, Supplementary Table 1). Outbreaks of RVA infection in racing pigeons were detected only between May and September, with most positive samples dating to August (Fig. 1C). The samples from fancy pigeons which were RVA positive were more evenly distributed over the year, with most positive samples submitted in December (Fig. 1C).

**Necropsy findings.** Detailed necropsy findings were available for four RVA-positive pigeons from three different outbreaks: birds A1 and A2 from the Łódź voivodeship, which were sick in 2018; bird B from the Silesia voivodeship, which was a case from 2018; and bird I from the Mazovia voivodeship, which was infected in 2017. Pigeons A1, A2, B and I had been tested positive for RVA by RT-qPCR. In two of these pigeons, the liver was moderately enlarged and congested (Fig. 2, photographs of pigeons A1 and B), and in the other two it was enlarged and mottled (Fig. 2, photographs of pigeons A2 and I). The kidneys of all four pigeons were enlarged; in one pigeon it was congested (Fig. 3, photograph of pigeon A1), and in two pigeons it was pale (Fig. 3, photographs of pigeons A2 and B). The spleen was pale and slightly or moderately enlarged in two pigeons (Fig. 4, photographs of pigeons B and I) and normal-sized and pale in one pigeon

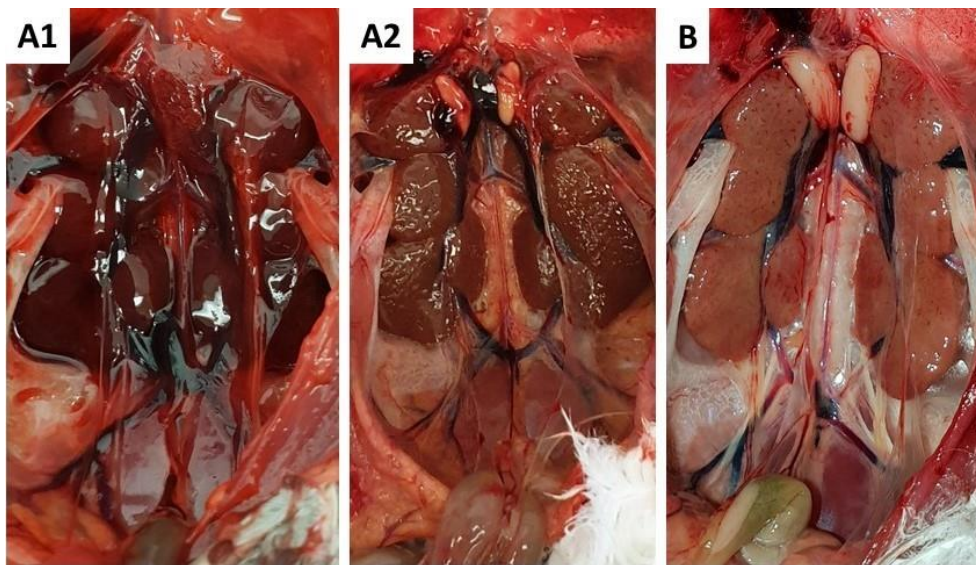
(Fig. 4, photograph of pigeon A1). The presence of food with water and bile was observed in the crop of three pigeons, and in these cases bile was also present in the proventriculus. The content of the intestines was green and mucoidal to watery in consistency. The content of the distal part of the gastrointestinal tract was dark green to brown and mucoidal. The vent and the surrounding feathers of two birds were stained with slimy faeces. In three pigeons, the air sacs showed varying degrees of opacity. Also in three pigeons, extensive areas of myocardial discoloration were found (Fig. 2, photographs of pigeons A2, B and I). The condition of the pigeons ranged from very good in two of the cases to satisfactory.



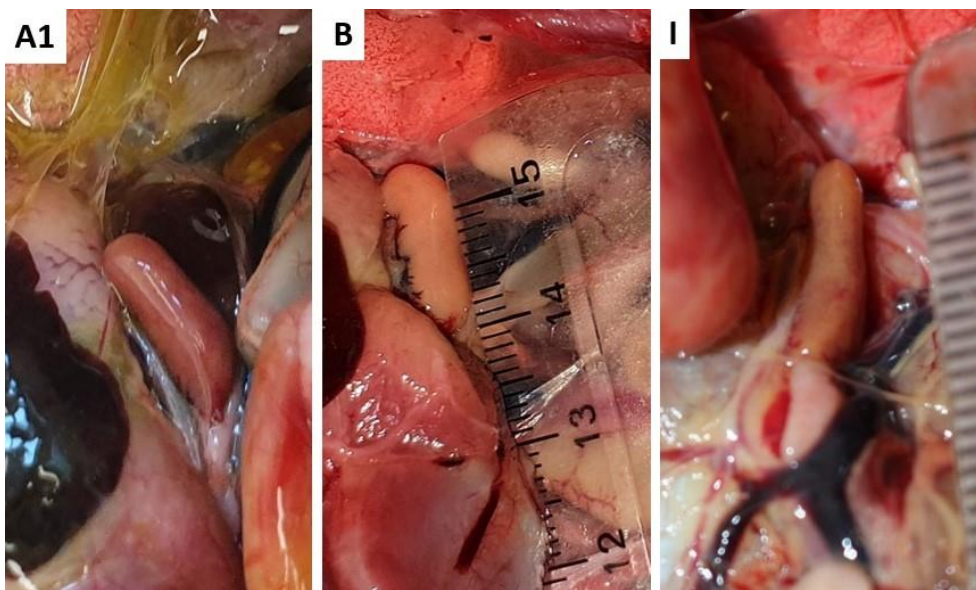
**Fig. 1.** Detection of rotavirus A (RVA) VP6 RNA in pigeon liver samples by RT-qPCR. Calibrated cycle of quantification (Cq) values of individual liver samples from racing ( $n = 51$ ) and fancy pigeons ( $n = 66$ ). Calibrated Cq values below 30 (indicated by the dotted line) indicate an acute or recent RVA infection (positive), whereas calibrated Cq values above 30 (indicated by the grey box) possibly indicate remnants of a past infection (A). Numbers of tested and RVA-positive samples from 2011–2020 (B). Numbers of RVA-positive samples from racing ( $n = 12$ ) and fancy pigeons ( $n = 12$ ) by month of sampling (C)



**Fig. 2.** Macroscopic changes in the livers and hearts of four rotavirus A-positive pigeons (A1, A2, B and I) originating from three outbreaks (A in the Łódź, B in the Silesia and I in the Mazovia voivodeships). Liver congestion (A1 and B); liver enlargement and mottling and myocardial necrosis (A2 and I)

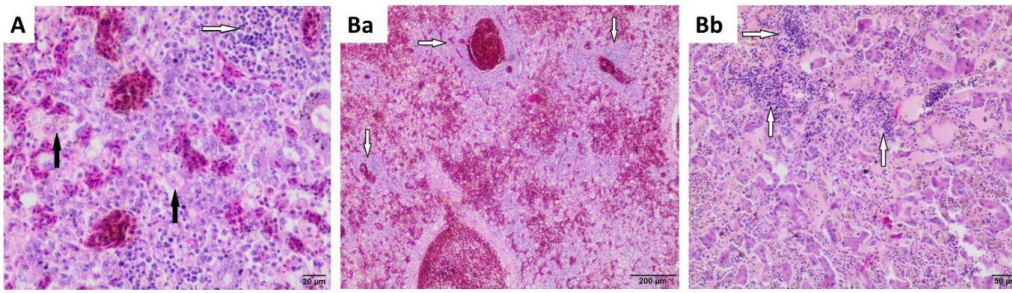


**Fig. 3.** Macroscopic changes in the kidneys from three selected rotavirus A-positive pigeons (A1, A2 and B) originating from three outbreaks (A in the Łódź, B in the Silesia and I in the Mazovia voivodeships). Kidney oedema (A1, A2 and B); simultaneous pallor (B)

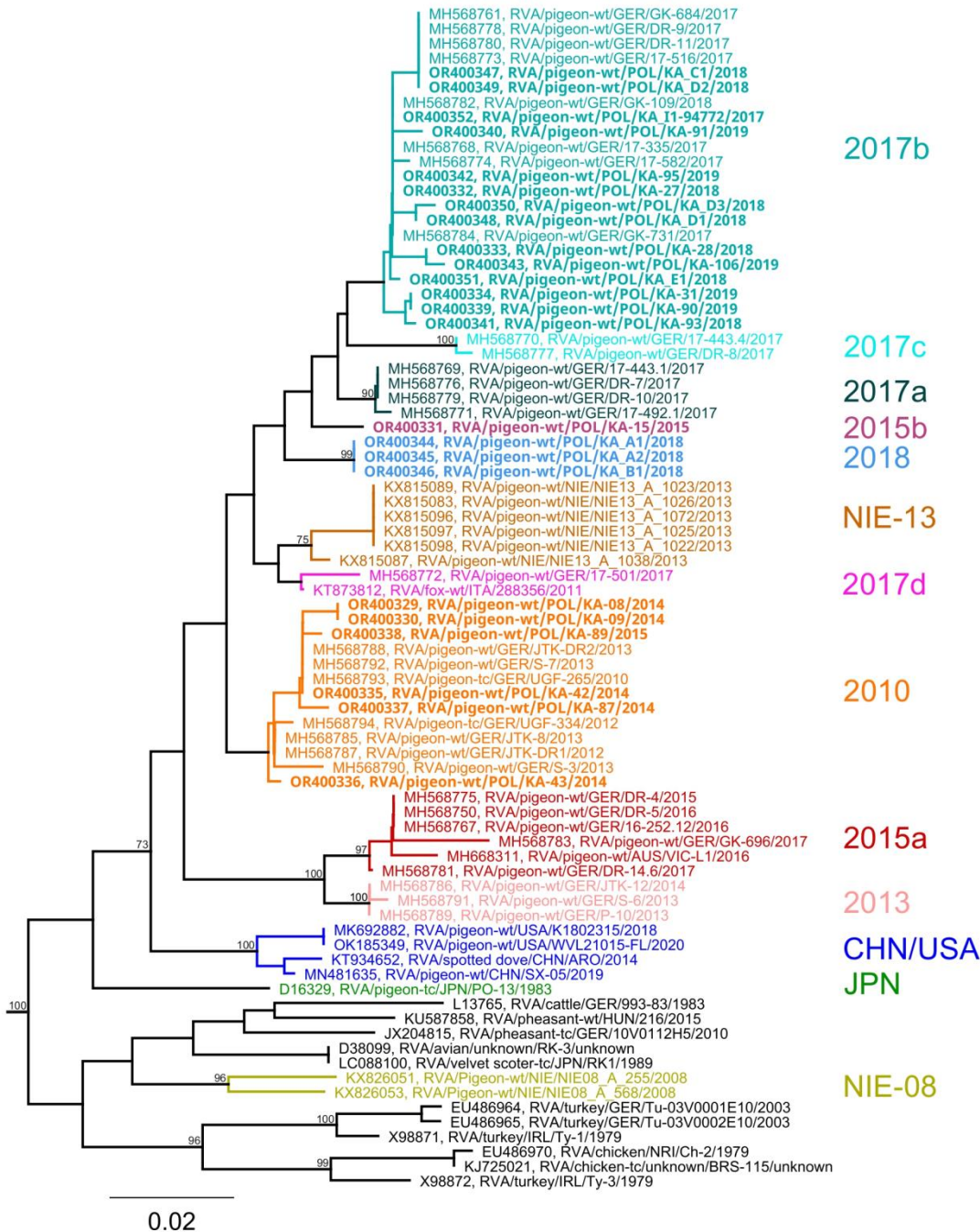


**Fig. 4.** Macroscopic changes in the spleens of three selected rotavirus A-positive pigeons (A1, B, and I) from three outbreaks (A in the Łódź, B in the Silesia and I in the Mazovia voivodeships). Spleens appearing pale and slightly to moderately enlarged (A1, B and I)





**Fig. 5.** Microscopic lesions stained with haematoxylin and eosin in the livers of two selected rotavirus A-infected pigeons (A and B) from two outbreaks (A in the Łódź and B in the Silesia voivodeships). Severe congestion, and focal, mainly perivascular mononuclear inflammatory infiltrate (white arrows), consisting of lymphocytes, plasma cells and histiocytes, degenerative and necrotic changes of hepatocytes (black arrows) – magnification 100× (A); severe congestion, haemorrhaging, massive haemorrhagic necrosis of hepatic parenchyma, and perivascular inflammatory infiltrate (white arrows) – magnification 40× (Ba); severe congestion, haemorrhaging and perivascular mononuclear inflammatory infiltrate (white arrows), consisting of lymphocytes, plasma cells and histiocytes – magnification 200× (Bb)



**Fig. 6.** Phylogenetic analysis of partial rotavirus A VP6 genotype I4 sequences from pigeons, domestic poultry, and other species. Sequences 392 base pairs long originating from Polish pigeons were analysed together with sequences obtained from GenBank. Bootstrap values above 70 are indicated at major branches. Colours indicate different pigeon-associated subclades as published by Rubbenstroth *et al.* (22). Subclades are labelled with the year of first reported detection in European pigeon populations or with the non-European country of detection. Sequences generated during this study are in bold

**Histopathology.** Microscopic analysis was performed for three RVA-positive pigeons (A1, B and I). Lesions observed in the liver were focal perivascular mononuclear infiltrates (Figs 5 A1, Ba and Bb), necrosis (Fig. 5 Ba), congestion and haemorrhaging (A1), and steatosis and bile retention (not shown). In the kidneys, congestion, haemorrhaging, heterophilic perivascular infiltrates and accumulation in the epithelium of cells were seen (not shown). In one bird (I) bile in coronal fat tissue, myocardial congestion and focal necrosis were found (not shown).

**Phylogenetic analysis of partial VP6 sequences.** Partial VP6 sequences were generated for all 24 RVA-positive pigeons. Phylogenetic analysis of partial VP6 sequences together with sequences from pigeons, domestic poultry and other species available in GenBank was performed and revealed all Polish sequences to belong to the pigeon-type RVA VP6 genotype I4 (Fig. 6). Six sequences detected in 2014 and 2015 clustered with sequences detected in Germany in 2010 to 2014 (subclade 2010, according to the nomenclature published by Rubbenstroth *et al.* (22)), whereas 14 Polish sequences from 2017 to 2019 clustered together with German sequences from the same years (subclade 2017b). Interestingly, a further sequence from 2015 and three sequences detected in 2018 formed two separate branches tentatively labelled subclades 2015b and 2018 (Fig. 6).

## Discussion

Pigeon-type RVA was recently demonstrated as the causative agent of “classical” YPD in domestic pigeons. However, while the disease has been reported throughout Europe, data on the occurrence of the virus in Europe has come so far almost exclusively from a single country, Germany (22, 24). Here we confirmed the detection of pigeon-type RVA infections in archived liver samples from Poland from the years 2014 to 2015 and 2017 to 2019.

The racing season of young pigeons in Poland runs from the middle of August to the end of September, while adult pigeon races take place from the end of April to the end of July (20). An additional risk factor, both for racing and fancy pigeons, are pigeon exhibitions, which take place in autumn and winter (19, 24). It is worth noting that RVA-positive samples from racing pigeons were collected in the period from April to September, *i.e.* during pigeon training and racing. A particularly high number of cases was observed in the summer, when training and flights of young pigeons take place. In fancy pigeons, the period in which positive results were obtained was longer, with the highest number of cases in December, when fancy pigeon exhibitions were held. The cases of RVA infection in racing pigeons described by Blakey *et al.* (3) occurred from April to November, and this larger time window may be related to differences in racing season lengths between the Polish and Californian, especially for young pigeons, the Californian season having lasted until December (4). The first cases

reported in Australia occurred from late May to July, although there have been sporadic cases also in October, December and April, usually after transport with pigeons from other lofts (15). In studies conducted by Hunnam *et al.* (13), also in Australia, cases of the disease were recorded mainly from December to May depending on the state. In these cases, especially in December, it was not so much the races that contributed to the infection as the purchase of new pigeons and their introduction into the loft (13). It should be noticed that the racing season in Australia runs from the end of May to October (1). Clinical disease induced by RVA is to be expected mainly during the racing and exhibition period, when juvenile pigeons are usually exposed to the pathogen for the first time, although isolated cases may occur in the off-season.

Post-mortem changes in the pigeons described here spanned a relatively wide range in the liver, from only hepatic congestion, through severe enlargement and diffuse mottling, to a complete change in the colour of the organ to yellowish-orange. A slightly narrower range of changes in the liver, from their absence to abnormal enlargement of the organ with darkly mottled congested and friable tissue, was described by Blakey *et al.* (3). Noteworthy, changes in the myocardium were observed in three pigeons, which had not been described prior to this in association with RVA infection. Opacity of the air sacs was also described in pigeons studied by Blakey *et al.* (3) and was probably related to aspiration of food into the respiratory system shortly before death (3, 15, 24). Liver necrosis and focal mononuclear cell infiltrates were found in two out of three histopathologically examined pigeons; this symptom was also dominant in all previously described naturally occurring cases (3, 15, 22, 24). It is worth noting that, unlike the pigeons necropsied by other authors, one of the pigeons studied by us also had necrotic changes in the heart muscle.

Pigeon-type RVA RNA was isolated from 48.7% of all samples collected from 2011 to 2020. However, high calibrated Cq values indicating low amounts of viral RNA were detected in many of these samples. Previous studies have shown that low amounts of viral RNA may remain detectable in cloacal swabs and internal organs for several weeks after an RVA outbreak in a pigeon loft (15, 22, 23). Based on this empirical data, we consider the calibrated Cq values of >30 to likely represent remnants of an infection that had occurred several weeks before sampling. Further analysis was focused on potentially acute infections, indicated by the calibrated Cq values of <30 (20.5% of all samples). The earliest of these cases were found in 2014, while in samples collected in the USA from 2000–2018, the presence of RVA was detected in 0.6% of the samples, first from 2001 (3).

## Conclusion

Pigeon-type RVA has been causing losses among domestic pigeons since a much earlier period than the

time when it was first described in association with clinical disease (16, 22). Pigeon-type RVA infections are currently a serious problem in pigeon breeding. Fortunately, countermeasures in the form of vaccination have already been established. Both autogenous vaccines and licensed vaccines are successfully used in Europe (16, 24).

**Conflict of Interests Statement:** The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

**Financial Disclosure Statement:** This study was supported by the reference activity of the Veterinary Medicine Institute, Warsaw University of Life Sciences, Poland and Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald - Insel Riems, Germany.

**Animal Rights Statement:** None required.

**Acknowledgements:** The authors would like to thank Kathrin Steffen, Anne Günther and Małgorzata Słodownik for their excellent technical assistance.

## References

1. Australia National Racing Pigeon Board Incorporated: <https://www.anrpb.org/race-programs/>.
2. Basham R.A., Dill-Okubo J., Subramaniam K., Waltzek T.B., Viadanna P.H.O.: Genome Sequence of Rotavirus A from a Florida Racing Pigeon (*Columba livia domestica*). *Microbiol Resour Announc* 2022, 11, e0114921, doi: 10.1128/mra.01149-21.
3. Blakey J., Crossley B., Rosenberger J.K., Rejmanek D., Markis M., Bickford A., Bland M., Woods L., Schivaprasad H.L., Goldsmith D., Stoute S.: Rotavirus A associated with clinical disease and hepatic necrosis in California pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Dis* 2019, 63, 651–658, doi: 10.1637/aviandiseases-D-19-00114.
4. California classic San Diego: <http://www.californiaclassicsd.com/race-schedule/>.
5. Dhama K., Saminathan M., Karthik K., Tiwari R., Shabbir M.Z., Kumar N., Malik Y.S., Singh R.K.: Avian Rotavirus Enteritis - an Updated Review. *Vet Q* 2015, 35, 142–158, doi: 10.1080/01652176.2015.1046014.
6. Duchatel J.P., Jauniaux T., Smyth J., Habsch I., Bourmonville M., Losson B., Todd D.: Effect of a Commercial Paratyphus Vaccine on the Development of Pigeon Circovirus Infection in Young Pigeons (*Columba livia domestica*). *J Avian Med Surg* 2010, 24, 107–114, doi: 10.2307/40793251.
7. Duchatel J.P., Szeleszczuk P.: Young Pigeon Disease Syndrome. *Med Weter* 2011, 67, 291–294.
8. Federation Colombophile Internationale, <https://pigeonsfci.net/membership.html>.
9. Gough R.E., Cox W.J., Devoy J.: Isolation and identification of rotavirus from racing pigeons. *Vet Rec* 1992, 130, 273, doi: 10.1136/vr.130.13.273.
10. Hansen R.D.E., Stidworthy M.F., Jones R., Sanster C.R., Ressel L.: Rotavirus infection in a racing pigeon (*Columba livia*) in Great Britain during 2018. *Vet Rec Case Rep* 2020, 8, 1–4, doi: 10.1136/vetreccr-2020-001218.
11. Hoffmann B., Depner K., Schirrmeyer H., Beer M.: A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods* 2006, 136, 200–209, doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.020.
12. Hu L., Crawford S.E., Hyser J.M., Estes M.K., Prasad B.V.V.: Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Curr Opin Virol* 2012, 2, 380–388, doi: 10.1016/j.coviro.2012.06.003.
13. Hunnam J.C., Sloan S., McCowan C.I., Glass E., Walker C.: The Racing Pigeon (*Columba livia domestica*) industry in Victoria, Australia, and epidemiology of a novel group A Rotavirus outbreak. *Transbound Emerg Dis* 2019, 66, 2058–2066, doi: 10.1111/tbed.13254.
14. Matthijssens J., Attoui H., Bányai K., Brussaard C.P.D., Danthi P., del Vas M., Dermody T.S., Duncan R., Fang Q., Johne R., Mertens P.P.C., Jaafar F.M., Patton J., Sasaya T., Suzuki N., Wei T., ICTV Report Consortium: ICTV Virus Taxonomy Profile: *Sedoreoviridae* 2022. *J Gen Virol* 2022, 103, 001782, doi: 10.1099/jgv.0.001782.
15. McCowan C., Cramer S., Kocak A., Shan S., Fegan M., Forshaw D., Rubbenstroth D., Chen H., Holmes C., Harper J., Dearnley M., Batovska J., Bergfeld J., Walker C., Wang J.: A Novel Group A Rotavirus Associated with Acute Illness and Hepatic Necrosis in Pigeons (*Columba livia*), in Australia. *PLoS One* 2018, 13, e0203853, doi: 10.1371/journal.pone.0203853.
16. Meßmer C., Rubbenstroth D., Mohr L., Peus E., Schreiber T., Rautenschlein S.: Pigeon Rotavirus A as the cause of systemic infection in juvenile pigeons (young pigeon disease). *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2022, 50, 293–301, doi: 10.1055/a-1909-2235.
17. Minamoto N., Oki K., Tomita M., Kinjo T., Suzuki Y.: Isolation and characterization of rotavirus from feral pigeon in mammalian cell cultures. *Epidemiol Infect* 1988, 100, 481, doi: 10.1017/s0950268800067212.
18. Pauly M., Oni O.O., Sausy A., Owoade A.A., Adeyefa C.A.O., Muller C.P., Hübschen J.M., Snoeck C.J.: Molecular epidemiology of Avian Rotaviruses Group A and D shed by different bird species in Nigeria. *Virol J* 2017, 14, 111, doi: 10.1186/s12985-017-0778-5.
19. Polski Związek Hodowli Gołębi Rasowych i Drobrego Inwentarza (Polish Association of Purebred Pigeon and Small Livestock Breeders): Związki i Stowarzyszenia (Associations – in Polish), <https://www.pzhgridi.pl/zwiazki.php>.
20. Polski Związek Gołębi Pocztowych (Polish Association of Racing Pigeons): <https://pzhgp.pl/adresy-oddzialow/>.
21. Raue R., Schmidt V., Freick M., Reinhardt B., Johne R., Kamphausen L., Kaleta E.F., Müller H., Krautwald-Junghans M.E.: A Disease Complex Associated with Pigeon Circovirus Infection, Young Pigeon Disease Syndrome. *Avian Pathol* 2005, 34, 418–425, doi: 10.1080/03079450500267825.
22. Rubbenstroth D., Peus E., Schramm E., Kottmann D., Bartels H., McCowan C., Schulze C., Akimkin V., Fischer N., Wylezich C., Hlinak A., Spadinger A., Großmann E., Petersen H., Grundhoff A., Rautenschlein S., Teske L.: Identification of a Novel Clade of Group A Rotaviruses in Fatally Diseased Domestic Pigeons in Europe. *Transbound Emerg Dis* 2019, 66, 552–561, doi: 10.1111/tbed.13065.
23. Rubbenstroth D., Ulrich R., Wylezich C., Rautenschlein S., Beer M., Mohr L.: First Experimental Proof of Rotavirus A (RVA) Genotype G18P(17) Inducing the Clinical Presentation of ‘Young Pigeon Disease Syndrome’ (YPDS) in Domestic Pigeons (*Columba livia*). *Transbound Emerg Dis* 2020, 67, 1507–1516, doi: 10.1111/tbed.13485.
24. Schmidt V., Kämpel M., Cramer K., Sieg M., Harzer M., Rückner A., Heenemann K.: Pigeon rotavirus A genotype G18P(17)-associated disease outbreaks after fancy pigeon shows in Germany – a case series. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2021, 49, 22–27, doi: 10.1055/a-1339-0366.
25. Stenzel T., Koncicki A.: The epidemiology, molecular characterization and clinical pathology of circovirus infections in pigeons – current knowledge. *Vet Q* 2017, 37, 166–174, doi: 10.1080/01652176.2017.1325972.
26. Vindevoogel H., Dagenais L., Lansival B., Pastoret P.P.: Incidence of rotavirus, adenovirus and herpesvirus infections in pigeons. *Vet Rec* 1981, 109, 285, doi: 10.1136/vr.109.13.285.



Krzysztof Adamczyk,

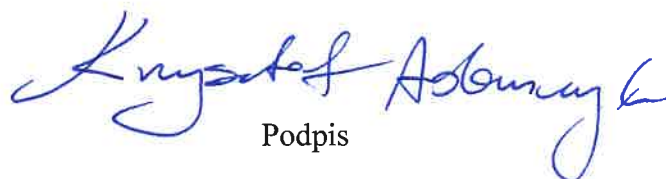
Warszawa, 18.11.2024

Krzysztof\_Adamczyk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Adamczyk K., Rubbenstroth D., Ledwoń A., Sapieryński R., Szeleszczuk P., 2024, The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. J Vet Res. Mar 23;68(1):55-61 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii, skatalogowaniu próbek, wykonaniu badań, analizie danych i napisaniu manuskryptu, co stanowi 70% pracy.

  
Podpis



Dennis Rubbenstroth

Riems, 18.11.2024

Dennis.Rubbenstroth@fli.de

Tel: +49 1520 9899451

**Disciplinary Council  
of Veterinary Medicine  
Warsaw University of Life Sciences**

**Statement of Co-authorship**

I hereby declare that in the paper: Adameczyk K., Rubbenstroth D., Ledwoń A., Sapieryński R., Szeleszczuk P., 2024, The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. J Vet Res. Mar 23;68(1):55-61, my individual contribution to its creation involved conducting part of the molecular studies, and co-authoring the manuscript, which constitutes 15% of the work.



Signature



Aleksandra Ledwoń,

Warszawa, 18.11.2024

Aleksandra\_Ledwon@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Adamczyk K., Rubbenstroth D., Ledwoń A., Sapierzyński R., Szeleszczuk P., 2024, The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. J Vet Res. Mar 23;68(1):55-61 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu niektórych sekcji gołębi, pobraniu próbek, wykonaniu części badań molekularnych i współtworzeniu manuskryptu, co stanowi 5% pracy.



Podpis

Rafał Sapieryński,

Warszawa, 18.11.2024

Rafal\_Sapierzynski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoly Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Adamczyk K., Rubbenstroth D., Ledwoń A., Sapieryński R., Szeleszczuk P., 2024, The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. J Vet Res. Mar 23;68(1):55-61 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współtworzeniu manuskryptu, co stanowi 5% pracy.

Podpis



Piotr Szeleszczuk,

Warszawa, 18.11.2024

Piotr\_Szeleszczuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Adamczyk K., Rubbenstroth D., Ledwoń A., Sapieryński R., Szeleszczuk P., 2024, The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. J Vet Res. Mar 23;68(1):55-61 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 5% pracy.

Podpis

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, cursive letters, positioned below the word 'Podpis'.



RESEARCH

Open Access



# The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season

Krzysztof Adamczyk<sup>1\*</sup>, Aleksandra Ledwoń<sup>1</sup>, Michał Czopowicz<sup>2</sup> and Piotr Szeleszczuk<sup>1</sup>

## Abstract

**Background** Pigeon Rotavirus A (RVA) infection has been confirmed in pigeons in the last decade as a cause of Young Pigeon Disease (YPD). Although YPD has been known for many years to date, no studies have been conducted to track the spread of RVA infection in pigeons during the racing season. The presented research aims to determine the course of RVA infection during the flights of young racing pigeons in the summer season, in one of the districts in the Mazovian Voivodeship in Poland.

**Results** Faecal samples of pigeons collected from transport baskets in vehicles transporting pigeons to the starting point were tested. The quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was used to detect the genetic material of RVA. Samples taken during 6 flights were analysed. The study showed a percentage increase in infections up to the fourth flight of pigeons, and then their decrease. With Cq values below 20, breeders did not participate in the next flight and/or reported disease in the flock. With positive Cq values of 20 to 30, clinical signs of disease were not reported. Of the 76 breeders participating in the races, at least one positive result was found in 46 (60.5%). Including the occurrence of the disease during the racing season was reported by 11 breeders (14.4%). The main clinical signs in sick pigeons were vomiting, diarrhea and stowed crop. The tested pigeons were not vaccinated against RVA.

**Conclusions** During training and racing of pigeons, it is not possible to avoid exposing them to pathogens, including RVA, regardless of whether pigeons from different breeders are placed in the same baskets or are in separate baskets. However, after four flights the number of new cases of the disease decreases which indicates the development of immunity. The qRT-PCR test is useful in the diagnosis and differentiation of clinical (Cq below 20) and subclinical RVA infections in racing pigeons.

**Keywords** Young pigeon disease, Pigeon rotavirus, Pigeon, Rotavirus A, Pigeon races

## Background

Pigeon rotavirus A (RVA) has been diagnosed as a pathogenic agent for pigeons only recently [1–3], although young pigeon disease (YPD), of which RVA turned out to be a primary cause, has been known for many years [4, 5]. RVA infections have been diagnosed in both racing and fancy pigeons mainly in Europe [1, 6–8], Australia [2, 5, 9], the United States of America [10, 11], and Nigeria [12]. Young pigeons aged from 4 weeks to 6 months [2, 5] are susceptible to the disease. Clinical signs of YPD are mainly: regurgitation and vomiting, retention of

\*Correspondence:

Krzysztof Adamczyk  
Krzysztof\_Adamczyk@sggw.edu.pl

<sup>1</sup> Department of Pathology and Veterinary Diagnostics Warsaw, University of Life Sciences, Nowoursynowska 159C, Warsaw 02-776, Poland

<sup>2</sup> Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159C, Warsaw 02-776, Poland



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

contents in the crop (stowed crop), biliverdinuria and diarrhea. Mortality reaches 45% [2], and in ornamental pigeons even 75% [13]. Affected birds usually died within 12 to 24 h from onset of vomiting, with deaths continuing for about seven days [2]. Gross pathological lesions were: mildly enlarged, diffusely mottled or congested livers and sometimes enlarged, friable and mottled spleens and in some cases pale kidneys [2, 7]. For racing pigeon breeders, rotavirus is important mainly during the young pigeon racing season, when it significantly affects their performance, including the number of pigeons that do not return to the loft [4, 5]. Young racing pigeons become infected mainly during transport to the places where they are released for the race [2]. Transport to the starting point usually takes place in special trailers or semi-trailers of trucks with well-ventilated baskets made of generously perforated sheet metal or wire, tightly fitting to each other. The birds are placed in the transport cabin the day before the flight, usually on Saturday. The transportation occurs overnight, and the birds start their flight the next morning. The birds are given water during transport. Feeding is not conducted during the young pigeons flights due to the shorter distances they are transported. Therefore, the most likely route of infection of young pigeons during transport is water contaminated with faeces.

The aim of the study is to track the spread of YPD during training flights and races by transporting pigeons together to the start site.

## Materials and methods

### Samples and questionnaires

In the young pigeons racing season, from August to September, faecal samples were collected from the transport baskets after the pigeons left them during two training flights and five competition flights (races). The samples were tested for the presence of pigeon RVA genetic

material except race five (7th flight). Samples from training flights on August 8 and 15 and races on August 11, 18, 25 and September 1, were analysed. Pigeons from individual breeders were usually placed in separate baskets. However, due to lack of space, pigeons from different lofts were combined in some baskets. Up to 20 pigeons were usually placed in one basket. Pigeons belonging to 76 breeders from the Mazovian Voivodship took part in the flights. The number of breeders participating in individual flights increased from 12 breeders in the first flight to 62 breeders in the sixth flight (Table 1). Before the flights, breeders were asked to fill in questionnaires regarding the flock health status: vaccination against RVA, presence of YPD before or during the flights, age of affected pigeons, and the presence of clinical signs typical of RVA infection, such as sudden deaths, diarrhea, vomiting, stowed crop, anorexia, weight loss [1, 2, 5] as well as atypical of this disease such as: polyuria, respiratory signs or nervous signs. Based on the aforementioned signs, a numerical score indicating that the presenting disease could be caused by RVA infection was developed (henceforward referred to as clinical score)—1 point was added for each typical clinical sign, while 1 point was subtracted for each atypical sign. Therefore, the score ranged from -3 to 6. In addition, mortality and morbidity rates, and information about the date when clinical signs first occurred were requested from the owners. In total, 52 breeders returned a completed questionnaire at least once. If the breeder observed clinical signs in the pigeons in the breeding, an additional sample was collected from the loft.

### RNA extraction and quantitative RT-PCR

From one transport basket, up to 25 g of faeces were collected into 50 ml centrifuge tubes (Sarstedt, Germany). A volume of 1 × PBS Buffer (Eurr, Poland) equal to twice the sample volume (usually about 50 ml) was then added.

**Table 1** A summary of results of qRT-PCR for the presence of rotavirus A (RVA) in faecal samples collected from baskets of individual lofts in subsequent flights, reported clinical signs, and the lack of participation of pigeons in the next flight after RVA detection

Flight number	No. of lofts taking part in the flight	Lofts with positive RVA qRT-PCR results		No. of Cq results below 20	Reported YPD signs during or after flight	No. of breeder participating in the next flight after RVA detection
		No	Proportion (CI 95%) [%]			
1	12	3	25 (9 – 53)	1/3	1	1
2	35	6	17 (8 – 33)	1/6	0	2
3	31	8	26 (14 – 43)	3/8	3	3
4	36	15	42 (27 – 58)	4/15	6	6
5	52	16	31 (20 – 44)	1/16	1	2
6	62	7	11 (6 – 22)	0/7	0	3

CI 95% 95% confidence interval

After vortexing for approximately 1 min, the samples were centrifuged for 15 min at 3779 RCF. After centrifugation, 100  $\mu$ l of the supernatant was collected for RNA isolation using the Total RNA mini kit (A&A Biotechnology, Poland) according to the manufacturer's instruction.

Detection of pigeon RVA was performed by a previously published VP6-specific qRT-PCR assay [2] modified by Rubbenstroth et al. [3] with AgPath-ID One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, USA). VP6-specific qRT-PCR was performed using CoRVA\_VP6\_868+ and CoRVA\_VP6\_943-primers and probe 3-CorVA\_VP6\_898\_P [3]. Threshold cycle (Cq) scores below 30 were considered positive, scores from 31 to 35 were considered weakly positive [3] and were not taken into account.

### Statistical analysis

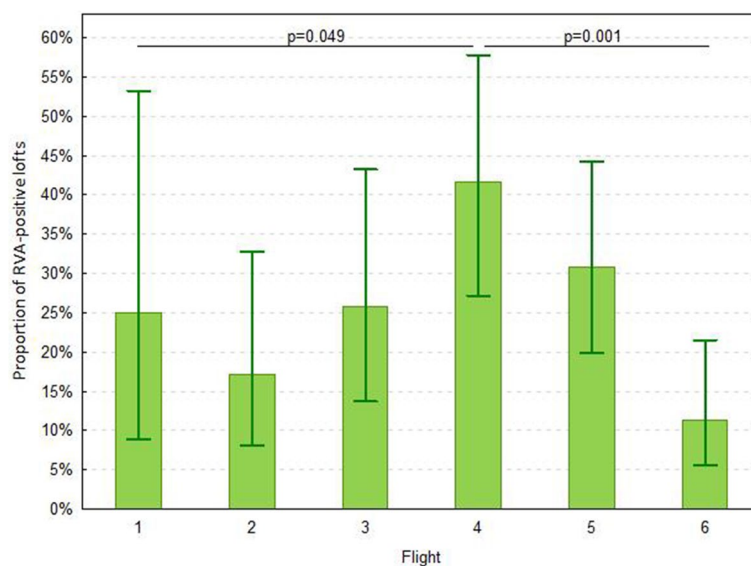
Numerical variables were presented as the median and range (or interquartile range in figures), and compared between unpaired groups using the Mann–Whitney U test. Correlation between numerical variables was determined using Spearman's rank correlation coefficient ( $R_s$ ). Categorical variables were expressed as the count and percentage in a group. Proportions were compared between unpaired groups using the maximum likelihood G test or Fisher exact test if the expected count in the contingency table was  $< 5$ . The  $\chi^2$  test for trends was used for comparing proportions between subsequent time points. The 95% confidence intervals (CI 95%) for proportions were calculated using Wilson score method. All tests were two-tailed and a significance level ( $\alpha$ ) was set

at 0.05. Statistical analysis was performed in TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

## Results

### qRT-PCR test results

At least one positive result of qRT-PCR for RVA was found in 46 of 76 lofts owned by different breeders participating in the races (61%, CI 95%: 49% – 71%). The proportion of positive results significantly increased until the fourth flight ( $p=0.049$ ) (Table 1, Fig. 1), and then significantly decreased until the sixth flight ( $p=0.001$ ). The decrease was observed even though the number of shared baskets was even higher than in previous flights (Table 2). Eleven breeders reported on the occurrence of YPD during the races, while 17 breeders with a positive RVA result in a given race did not participate in the next race. In pigeons from 12 breeders, an earlier negative result was followed by a positive RVA result. Depending on the flight date, the period between these results was 3–7 days. Pigeons from lofts with post-flight disease cases showed clinical signs 1–7 days after the flight in which the basket sample was positive. Additional loft samples were collected from the 10 lofts where the breeders reported clinical signs. In four cases, the qRT-PCR yielded a Cq below 20, in four cases between 20 and 30, and in two cases the result was negative. In one case the loft sample was negative, but the transport basket sample was positive. There was no significant difference in the proportion of RVA-positive results for baskets populated with pigeons of a single breeders and baskets populated with pigeons of several different breeders (Table 2).



**Fig. 1** Proportion of positive results of qRT-PCR results for the presence of rotavirus A (RVA) in faecal samples collected from baskets of individual breeders in subsequent flights. Whiskers indicate the 95% confidence interval

**Table 2** A summary of results of qRT-PCR for the presence of rotavirus A (RVA) in faecal samples collected from baskets with pigeons belonging to one breeder (single-breeder baskets) and baskets with pigeons from various breeders (shared baskets) in subsequent flights

Flight	Total number of baskets	Number of		RVA-positive (CI 95%)				p-value
		single-breeder baskets	shared baskets	single-breeder baskets		shared baskets		
				n	% (CI 95%)	n	% (CI 95%)	
1	36	36	0	4	11 (4 – 25)	-	-	-
2	124	122	2	10	8 (5 – 14)	0	0 (0 – 66)	0.999
3	58	37	21	11	30 (17 – 46)	3	14 (5 – 35)	0.174
4	96	93	3	30	32 (24 – 42)	1	33 (6 – 79)	0.999
5	63	48	15	14	29 (18 – 43)	5	33 (15 – 58)	0.760
6	85	67	18	7	10 (5 – 20)	1	6 (1 – 26)	0.999

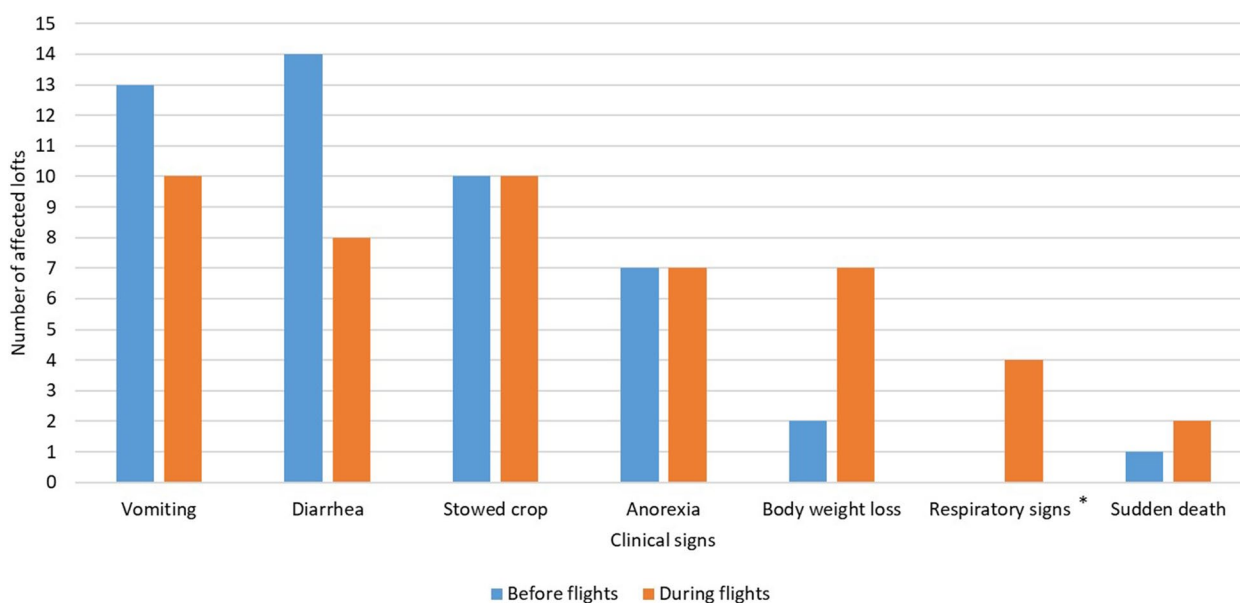
CI 95% 95% confidence interval

**Results of the questionnaire analysis**

Of 52 breeders who returned questionnaires, 27 reported illness before or during the flights (52%, CI 95%: 39% – 65%). One breeder observed YPD clinical signs twice, before and during the flights. The most commonly observed clinical signs were vomiting, diarrhea, and stowed crop (Fig. 2). The scores of clinical signs varied depending on the time of onset of the disease. In pigeons ill before the flights, the score was usually 3/6, while in pigeons ill during the flights it was 2/6 (Fig. 3). The tested pigeons were not vaccinated against RVA.

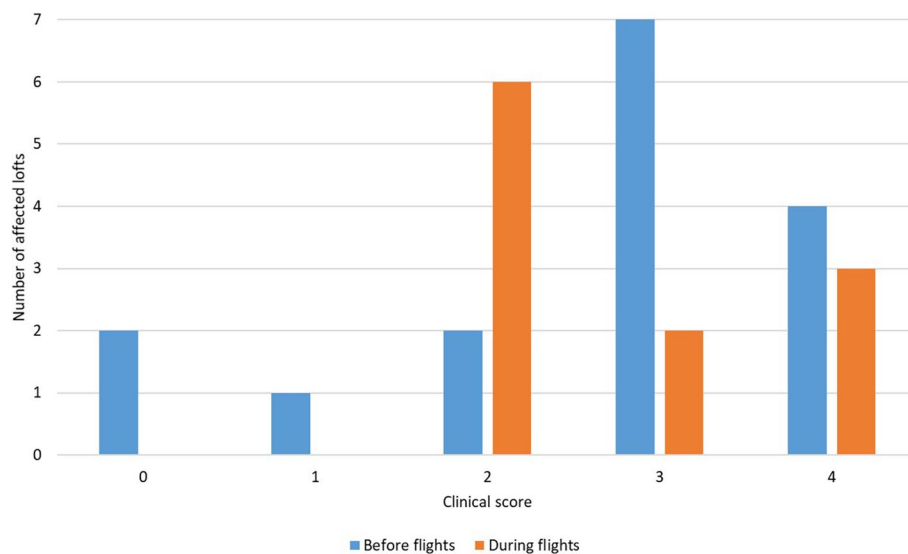
**Comparison of qRT-PCR results with questionnaire data**

Cq values in the qRT-PCR test were significantly lower in pigeons with a clinical score >0 (median 19, range 13 – 30) than in pigeons with no clinical signs (median 28, range 16 – 30; *p*=0.002). However, clinical score was not correlated with qRT-PCR-Cq (*R*<sub>s</sub> = -0.02; *p*=0.949). In sixteen lofts (21%) in which pigeons took part in flights, breeders had previously reported a disease similar to YPD. In four cases, the qRT-PCR results of these pigeons were negative during the whole study period. In five cases, pigeons were withdrawn from the subsequent flight after the positive qRT-PCR result. In 7 cases, pigeons took part in the next flight despite the positive qRT-PCR result. Only one breeder in this group reported



**Fig. 2** Clinical signs observed in loft affected by Young Pigeon Disease (YPD), before and during flights. Asterisk indicates the sign atypical of YPD





**Fig. 3** Clinical score observed in lofts affected by Young Pigeon Disease, before and during flights

the flock becoming ill during flight. Of the 31 breeders who did not report a previous case and were found to be positive for RVA, 15 did not participate in the subsequent flight after testing positive, while 16 did. The incidence of YPD during the season was significantly higher in these flocks in which YPD before the season did not occur (32%; CI 95%: 19% – 50%; 10 / 31) compared to the flocks in which YPD occurred before the season (7%; CI 95%: 1% – 30%; 1 / 15;  $p=0.039$ ).

## Discussion

A number of factors influence the development of RVA infection in pigeons during the racing season. The most important are the contact with infected birds during transport, the introduction of infected birds into the loft [2, 5], and the stress induced by the contact with other unknown pigeons [4, 5, 14]. As a consequence of YPD outbreaks, racing pigeon fanciers often report sudden loss of racing performance and increased loss of animals during flights [4, 5]. In our study, the faeces of pigeons from 61% of lofts were positive, while in the study by Harzer et al. [13], RVA test was positive in swabs from only 10% of fancy pigeon flocks. These differences are likely due to the decreased contact of fancy pigeons with pigeons from other lofts outside the exhibition season, as the introduction of the disease takes place largely through newly acquired birds to the loft. In our case, only 14% of breeders reported pigeon disease during flights and 21% before flights, while in previous studies, as many as three fourths of breeders reported pigeon disease after the exhibition [13]. This discrepancy may result from a longer period of exposure of pigeons

to infection at exhibitions, which may last up to several days. In our study, the most objective method of infection monitoring was the examination of faecal samples using the molecular method and the observation whether the pigeon breeder with a positive result took part in the next flight or reported sick birds. The questionnaires were not always filled in by breeders. Also, the absence in the next flight did not always have to be associated with the disease of the birds. Nevertheless, information on 27 YPD cases was obtained.

The present study determined whether the birds participating in the flights were already infected with the virus and, if the breeder reported it, at when the disease occurred. In some cases, when pigeons participated multiple times, positive results could be found after previously negative results. In cases reported by other authors, symptoms of YPD were observed six to seven days following the race [1] and 1 to 4 days after visiting a show [13]. Disease in the flocks of pigeons we studied usually occurred 1–7 days after the flight. According to the information obtained from breeders, the morbidity and mortality in lofts with confirmed RVA infection during flights was 43%-100% and 3%-50%, respectively. In fancy pigeon flocks studied by other authors, the morbidity ranged from 8 to 100%, while the mortality rate ranged from 0 to 75% [13], also the same authors found positive RVA RT-PCR results in pigeons of a breeder who did not observe symptoms of the disease in the loft [13]. In the cases we studied, some breeders were also positive despite the absence of clinical signs, but the reliable indicator was the Cq values, which, reaching values below 20, almost guaranteed the occurrence of clinical signs. The clinical

signs most commonly reported by breeders are vomiting, diarrhea, stowed crop, anorexia, and weight loss, respectively. Vomiting, regurgitation and diarrhea are the symptoms described by some authors [5, 9, 10,], while in other studies [1, 3], anorexia was the most frequently reported symptom. Morbidity and mortality in lofts participating in the described flights ranged from 3 to 100% and from 0 to 50%, respectively. In studies conducted by other authors, it was:  $\leq 100\%$  and 0–45% [2, 3, 8, 9]. In one of the cases described by Harzer et al. mortality was even 75%, however, it is possible that such high mortality in this flock could be caused by co-infections [13].

## Conclusions

During training and flights of pigeons, it is impossible to avoid their exposure to pathogens, including rotavirus A. Our research shows that after just four flights, the percentage of new cases of the disease decreases, which indicates the development of immunity. Testing for the presence of RVA RNA in pigeon faeces using the qRT-PCR test is useful in the diagnosis and differentiation of clinical (Cq below 20) and subclinical RVA infections in racing pigeons. Moreover, the course of RVA infection in racing pigeons is similar, regardless of whether pigeons from different breeders are placed in the same baskets or in separate baskets during the same flight.

## Acknowledgements

We would like to express special thanks to Dr. Dennis Rubbenstroth PhD, from the Friedrich-Loeffler-Institut, Germany, for help with study design. We would like also to thank the Polish Association of Racing Pigeon Breeders and the pigeon fanciers from the Mazovian district for allowing us to collect samples and sharing information about the health of their pigeons.

## Authors' contributions

Conceptualization and methodology: K.A., P.S.; sampling, molecular testing: K.A. writing—original draft preparation: K.A., A.L.; data analysis: K.A., A.L., M.C.; statistical analysis: M.C., supervision: A.L., P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Funding

This research received no external funding.

## Availability of data and materials

No datasets were generated or analysed during the current study.

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

A verbal consent was obtained from the owners. The feces were excreted naturally by birds. The study did not include any additional manipulations while collecting the feces therefore the study does not need an ethical approval.

### Consent for publication

No applicable.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 12 March 2024 Accepted: 18 June 2024

Published online: 09 July 2024

## References

- Hansen RDE, Stidworthy MF, Jones R, Sanster CR, Ressel L. Rotavirus infection in a racing pigeon (*Columba livia*) in Great Britain during 2018. *Vet Record Case Rep.* 2020;8:1–4. <https://doi.org/10.1136/vetre-ccr-2020-001218>.
- McCowan C, Cramer S, Kocak A, Shan S, Fegan M, Forshaw D, Rubbenstroth D, et al. Novel group A rotavirus associated with acute illness and hepatic necrosis in pigeons (*Columba livia*), in Australia. *PLoS One.* 2018;13:e0203853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203853>.
- Rubbenstroth D, Peus E, Schramm E, Kottmann D, Bartels H, McCowan C, et al. Identification of a novel clade of group A rotaviruses in fatally diseased domestic pigeons in Europe. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66:552–61. <https://doi.org/10.1111/tbed.13065>.
- Raue R, Schmidt V, Freick M, Reinhardt B, John R, Kamphausen L, et al. Disease complex associated with pigeon circovirus infection young pigeon disease syndrome. *Avian Pathol.* 2005;34:418–25. <https://doi.org/10.1080/03079450500267825>.
- Meißner C, Rubbenstroth D, Mohr L, Peus E, Schreiber T, Rautenschlein S. Pigeon Rotavirus A as the cause of systemic infection in juvenile pigeons (young pigeon disease). *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2022;50:293–301. <https://doi.org/10.1055/a-1909-2235>.
- Gough RE, Cox WJ, Devoy J. Isolation and identification of rotavirus from racing pigeons. *Vet Rec.* 1992;130:273. <https://doi.org/10.1136/vr.130.13.273>.
- Adamczyk K, Rubbenstroth D, Ledwoń A, Sapieryżński R, Szeleszczuk P. The first confirmed cases of pigeon rotavirus A (RVA) infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Poland. *J Vet Res.* 2024. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2024-0006>.
- Rubbenstroth D, Ulrich R, Wylezich C, Rautenschlein S, Beer M, Mohr L. First experimental proof of rotavirus A (RVA) genotype G18P[17] inducing the clinical presentation of 'Young Pigeon Disease Syndrome' (YPDS) in domestic pigeons (*Columba livia*). *Transbound Emerg Dis.* 2020;67:1507–16. <https://doi.org/10.1111/tbed.13485>.
- Hunnam JC, Sloan S, McCowan CI, Glass E, Walker C. The Racing Pigeon (*Columba livia domestica*) industry in Victoria, Australia, and epidemiology of a novel group A Rotavirus outbreak. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66:2058–66. <https://doi.org/10.1111/tbed.13254>.
- Blakey J, Crossley B, Rosenberger JK, Rejmanek D, Markis M, Bickford A, et al. A associated with clinical disease and hepatic necrosis in California pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Dis.* 2019;63:651–8. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-19-00114>.
- Basham RA, Dill-Okubo J, Subramaniam K, Waltzek TB, Viadanna PHO. Genome sequence of rotavirus a from a Florida Racing Pigeon (*Columba livia domestica*). *Microbiol Resour Announc.* 2022;11:e0114921. <https://doi.org/10.1128/mra.01149-21>.
- Pauly M, Oni OO, Sausy A, Owoadé AA, Adeyefa CAO, Muller CP, et al. Molecular epidemiology of Avian Rotaviruses Group A and D shed by different bird species in Nigeria. *Virology.* 2017;14:111. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0778-5>.
- Harzer M, Heenemann K, Sieg M, Vahlenkamp T, Freick M, Rückner A. Prevalence of pigeon rotavirus infections: animal exhibitions as a risk factor for pigeon flocks. *Arch Virol.* 2021;166:65–72. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04834-w>.
- Schmidt V, Kumpel M, Cramer K, Sieg M, Harzer M, Rückner A, Heenemann K. Pigeon rotavirus A genotype G18P[17]-associated disease outbreaks after fancy pigeon shows in Germany- a case series. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2021;49:22–7. <https://doi.org/10.1055/a-1339-0366>. Epub 2021 Feb 15. PMID: 33588462.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Krzysztof Adamczyk,

Warszawa, 18.11.2024

Krzysztof\_Adamczyk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Adamczyk K., Ledwoń A., Czopowicz M., Szeleszczuk P., 2024, The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season. BMC Vet Res. Jul 9;20(1):305 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii, pobraniu próbek, wykonaniu badań, analizie danych i napisaniu manuskryptu, co stanowi 80% pracy.



Podpis

Aleksandra Ledwoń,

Warszawa, 18.11.2024

Aleksandra\_Ledwon@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Adamczyk K., Ledwoń A., Czopowicz M., Szeleszczuk P., 2024, The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season. BMC Vet Res. Jul 9;20(1):305 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie części wyników i współtworzeniu manuskryptu, co stanowi 8% pracy.



Podpis

Warszawa, 18.11.2024

prof. dr hab. Michał Czopowicz  
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
SGGW w Warszawie  
michal\_czopowicz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Adamczyk K., Ledwoń A., Czopowicz M., Szeleszczuk P., 2024, The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season. BMC Vet Res. Jul 9;20(1):305 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie części wyników i współtworzeniu manuskryptu, co stanowi 8% pracy.



Podpis

Piotr Szeleszczuk,

Warszawa, 18.11.2024

Piotr\_Szeleszczuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Adamczyk K., Ledwoń A., Czopowicz M., Szeleszczuk P., 2024, The course of Rotavirus A (RVA) infection in young racing pigeons during the racing season. BMC Vet Res. Jul 9;20(1):305 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 4% pracy.

Podpis

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, cursive letters, positioned below the 'Podpis' label.

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW

*Krzysztof Adamczyk*  
(czytelny podpis autora pracy)