

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Zakład Chorób Drobiu



Anna Sawicka-Durkalec

**Charakterystyka molekularna i ocena występowania
Mycoplasma spp. u ptaków wolno żyjących i gołębi**

**Molecular characteristics and prevalence of *Mycoplasma* spp.
in wild birds and pigeons**

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. Grzegorz Tomczyk, profesor instytutu

Zakład Chorób Drobiu

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Promotor pomocniczy:

dr hab. Jolanta G. Rola, profesor instytutu

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Puławy, 2022

Recenzenci:

prof. dr hab. Andrzej Gawel

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Spis treści

Wykaz skrótów	6
Streszczenie	8
1. Wstęp	12
1.1. Wprowadzenie	12
1.2. Charakterystyka rodzaju <i>Mycoplasma</i>	13
1.2.1. Taksonomia	13
1.2.2. Systematyka molekularna	13
1.2.3. Cechy morfologiczne - budowa komórki	15
1.2.4. Wielkość i skład genomu <i>Mycoplasma</i>	17
1.2.5. Gatunki mykoplazm występujące u ptaków	18
1.2.6. Transmisja – drogi rozprzestrzeniania się mykoplazm	21
1.2.7. Czynniki biorące udział w procesie kolonizacji organizmu gospodarza przez <i>Mycoplasma</i> spp.	23
1.2.8. Cechy mykoplazm predysponujące je do adaptacji do nowego gospodarza	25
1.2.9. Czynniki mające wpływ na występowanie <i>Mycoplasma</i> spp. u poszczególnych gatunków ptaków	27
1.2.10. Metody stosowane do wykrywania zakażeń <i>Mycoplasma</i> spp.	27
2. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	30
2.1. Praca przeglądowa	31
2.2. Cel i zakres pracy doktorskiej	32
2.3. Metodyka badań	33
2.3.1. Materiał do badań	33
2.4. Przebieg badań	34
2.4.1. Praca 2.1	34
2.4.2. Praca 2.2	34
2.4.3. Praca 2.3	35
2.4.4. Analiza statystyczna i graficzna prezentacja wyników	36
2.4.5. Wyniki	37
3. Wnioski	41
4. Piśmiennictwo	42
5. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	53

Wykaz skrótów

ATCC	amerykańska kolekcja kultur komórkowych (ang. <i>American Type Culture Collection</i>)
CRD	przewlekła choroba układu oddechowego (ang. <i>chronic respiratory disease</i>)
DGGE	elektroforeza w gradiencie stężeń czynnika denaturującego (ang. <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EAA	anomalie wierzchołka skorupy jaja (ang. <i>eggshell apex abnormalities</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
G + C	para zasad azotowych guanina-cytozyna
GTR	model substytucji nukleotydów zakładający odwracalność ewolucji (ang. <i>general time reversible model</i>)
HI	test hamowania hemaglutynacji (ang. <i>hemagglutination inhibition test</i>)
<i>in ovo</i>	(łac.) przez jajo
ICSP	Międzynarodowy Komitet ds. Systematyki Prokaryota (ang. <i>International Committee on Systematics of Prokaryotes</i>)
ISR	region międzygenowy 16S-23 rRNA (ang. <i>intergenic spacer region</i>)
kpz	jednostka długości cząsteczki kwasu nukleinowego odpowiadająca 1000 par zasad
Lpd	dehydrogenaza dihydrolipoilowa (ang. <i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>)
MALDI-TOF MS	technika spektrometrii mas przeznaczona m. in. do identyfikacji mikroorganizmów wykorzystująca desorpcję/ionizację laserową wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu jonów (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry</i>)
ML	metoda największej wiarygodności (ang. <i>maximum likelihood</i>)
MSP	główne profile widmowe (ang. <i>main spectrum profiles</i>)
NH ₃	amoniak
OIE	Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (ang. <i>World Organisation for Animal Health</i> ; franc. <i>Office International des Epizooties</i>)
PPLO	mikroorganizmy wywołujące objawy podobne do pleuropneumonii (ang. <i>pleuropneumonia-like organisms</i>)

PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
RCF	względna siła odśrodkowa wyrażona w g (ang. <i>relative centrifugal force</i>)
real-time PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
SPA	test aglutynacji płytkowej (ang. <i>serum plate agglutination test</i>)

Streszczenie

Bakterie z rodzaju *Mycoplasma* to szeroko rozprzestrzenione w przyrodzie najmniejsze samoreplikujące się organizmy priokariotyczne. Znaczna większość poznanych do tej pory gatunków mykoplazm jest zaliczana do drobnoustrojów komensalnych lub oportunistycznych. Mykoplazmy zazwyczaj wykazują dużą specyficzność w odniesieniu do gospodarza, jednak niektóre gatunki mogą być izolowane od kilku różnych gospodarzy. Mykoplazmy wykazują tropizm tkankowy i układowy, chociaż różne szczepy jednego gatunku mogą wykazywać predylekcję do różnych tkanek organizmu. Poziom patogenności lub zdolności do rozprzestrzeniania się są właściwościami, które mogą być różne dla poszczególnych szczepów jednego gatunku mykoplazmy. Ustalenie cech odpowiedzialnych za patogenność oraz występowanie danego gatunku mykoplazm u określonego gospodarza jest przedmiotem wielu badań, jednak wiedza na ten temat jest w dalszym ciągu niewystarczająca.

Celem podjętych badań była ocena występowania *Mycoplasma* spp. w populacji ptaków wolno żyjących i gołębi z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. Badania próbek pochodzących od 1170 ptaków wolno żyjących różnych gatunków oraz 179 gołębi hodowlanych pozwoliły na wyodrębnienie gatunków ptaków, u których prewalencja *Mycoplasma* spp. osiągnęła szczególnie wysoki poziom. Wykazano, że gołębie są jednym z gatunków charakteryzujących się wysoką prewalencją zakażeń *Mycoplasma* spp. Zastosowanie metod opracowanych do wykrywania swoistych dla gołębi gatunków mykoplazm pozwoliło na analizę wpływu obecności poszczególnych gatunków mykoplazm na stan zdrowia gołębi. Stwierdzono, że zakażenie poszczególnymi gatunkami mykoplazm może być zależne od stanu zdrowia ptaków lub typu użytkowego. Przeprowadzono ocenę częstości występowania materiału genetycznego *Mycoplasma* spp. pomiędzy typami użytkowymi gołębi. Wyniki analizy statystycznej wykazały, że występowanie mikroorganizmów należących do rodzaju *Mycoplasma* nie jest związane z kondycją zdrowotną gołębi, jednak u gołębi pocztowych może się przyczyniać do wystąpienia objawów chorobowych. W przeprowadzonych badaniach określono prewalencję zakażeń *Mycoplasma* spp. u 55 różnych gatunków ptaków wolno żyjących. Analizy statystyczne uzyskanych wyników potwierdziły istotne różnice w występowaniu *Mycoplasma* spp. u ptaków wolno żyjących w zależności od rodzaju ich diety (mięsożerne, roślinożerne, wszystkożerne), typu siedliska bytowania (lądowe i wodne) oraz trybu życia (ptaki migrujące i osiadłe). W badaniach wykazano, że *Mycoplasma* spp. znacznie częściej występuje u ptaków mięsożernych,

zamieszkujących siedliska podmokłe lub wodne oraz u ptaków migrujących. Analiza filogenetyczna wybranych próbek nie wykazała zależności pomiędzy wykrytymi, niezidentyfikowanymi gatunkami *Mycoplasma* sp. a gatunkami ptaków od których były one izolowane. Wyniki oceny wpływu czynników środowiskowych na występowanie *Mycoplasma* spp. i przeprowadzenie analizy filogenetycznej posłużyły do podjęcia dalszych badań dotyczących występowania *Mycoplasma* spp. u gęsi wolno żyjących. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką prewalencję *Mycoplasma* spp. u tych ptaków. Użycie metod PCR specyficznych dla poszczególnych gatunków mykoplazm swoistych dla drobiu wodnego potwierdziło wysoką prewalencję *M. anserisalpingitidis*, która jest patogenna dla gęsi hodowlanych. Analiza filogenetyczna sekwencji uzyskanych od gęsi wolno żyjących na terenie kraju wykazała bliskie pokrewieństwo z sekwencjami izolatów z innych państw, co oznacza, że dzikie gęsi mogą być wektorem i rezerwuarem *M. anserisalpingitidis*. W próbkach pochodzących od ptaków wolno żyjących i gołębi z terenu kraju nie stwierdzono obecności materiału genetycznego *M. gallisepticum* i *M. synoviae*, które są uznawane za dwa najistotniejsze z epitopatologicznego punktu widzenia gatunki mykoplazm występujących u drobiu hodowlanego.

Summary

Bacteria of the *Mycoplasma* genus are the smallest self-replicating prokaryotic organisms found widely distributed in the environment. The great majority of species of the genus are classified as commensal or opportunistic microorganisms. Mycoplasmas typically exhibit strong host specificity; however, some species may be isolated from several different hosts. These are bacteria with tropism for tissue types and organ systems, although different strains of a single species may show affinities for different host organism tissue types. The strength of a mycoplasma bacterium's pathogenicity or its contagiousness are characteristics which may vary from one individual strain in the genus to another. Establishing the factors for the pathogenicity of a particular mycoplasma species or the factors governing its incidence in a particular host has been the aim of many research works, but still insufficient knowledge has been amassed on the subject.

The research aimed to assess the occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild bird and domestic pigeon populations using molecular biology methods. Testing samples collected from 1170 wild birds and 179 pigeons allowed us to identify the bird species in which the prevalence of *Mycoplasma* spp. was particularly high. It was shown that pigeons are one such species with a high prevalence of these bacteria. The use of methods developed to detect pigeon-specific mycoplasmas facilitated analysis of the impact of individual mycoplasma species on pigeon health. This study also evaluated how the occurrence of *Mycoplasma* spp. differed between breeding types of pigeons. The results showed statistically that the occurrence of mycoplasmas is not associated with the health status of pigeons but may contribute to the emergence of disease symptoms in racing ones. Furthermore, it was found that which individual mycoplasma species an infection with these bacteria is composed of may depend on the health status of the birds or their breeding types. In another study, *Mycoplasma* spp. prevalence was determined in 55 different species of wild birds. Statistical analysis of the results confirmed significant differences in the prevalence of *Mycoplasma* spp. in wild birds depending on their diet (carnivorous, herbivorous, or omnivorous), habitat (terrestrial or aquatic), and lifestyle (migratory or sedentary). It was shown that *Mycoplasma* spp. are more prevalent in carnivorous birds, those inhabiting wetlands, and migratory ones. Phylogenetic analysis of selected samples did not reveal any relationship between the unidentified *Mycoplasma* spp. detected and the species of birds from which they were isolated. The greater prevalence of *Mycoplasma* spp. in aquatic than terrestrial bird species and the results of the phylogenetic analysis prompted us to further investigate the occurrence of these

bacteria in wild geese. Our results confirmed the high prevalence of *Mycoplasma* spp. in these birds in Poland. The use of species-specific PCR methods for detecting mycoplasmas colonizing only waterfowl confirmed the high prevalence of *M. anserisalpingitidis*, which is pathogenic to farmed geese. Phylogenetic analysis showed close similarity between the sequences obtained and those of isolates from other countries, indicating that wild geese may be vectors and reservoirs of *M. anserisalpingitidis*. No genetic material of *M. gallisepticum* or *M. synoviae*, which are considered the most epidemiologically relevant mycoplasma species for commercial poultry, was detected in a mononational sample set from wild birds or pigeons.

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Mykoplazmy po raz pierwszy zostały zidentyfikowane przez Nocard i Roux (1898) u bydła z zapaleniem płuc. Początkowo określano je jako *pleuropneumonia-like organisms* (PPLOs) – termin ten został przyjęty w celu odróżnienia mikroorganizmów należących do tej grupy od czynnika etiologicznego wywołującego pleuropneumonię u bydła. W taksonomii nazwa rodzaju *Mycoplasma* (grec. *mykes* - grzyb i *plasma* - forma) została nadana w 1929 roku przez Nowaka na podstawie charakterystyki i oceny morfologii tych mikroorganizmów izolowanych od bydła. W związku z rosnącą liczbą wykrywanych nowych szczepów drobnoustrojów należących do grupy pleuropneumonii, izolowanych zarówno od ludzi jak i od różnych gatunków zwierząt, w 1957 roku została opracowana powszechnie uznawana nomenklatura i klasyfikacja mykoplazm (Freundt i Order, 1957). Pierwsze przypadki mykoplazmozy u drobiu zostały udokumentowane na początku XX wieku, jednak istnieją rozbieżności w określeniu dokładnych dat wykrycia u poszczególnych gatunków drobiu hodowlanego. Choroba wywoływana przez mykoplazmy, określana jako przewlekła choroba układu oddechowego (CRD), została opisana w 1943 roku (Delaplane i Stuart, 1943). Warto zauważyć, że w 1945 roku Van Herick i Eaton (1945) opisali przypadek wyizolowania organizmu podobnego do drobnoustroju wywołującego pleuropneumonię, który ich zdaniem występował jako zanieczyszczenie biologiczne w zarodkach kurcząt używanych w prowadzonych przez nich doświadczeniach. W 1952 roku Markham i Wong wykazali, że PPLOs są czynnikami wywołującymi zapalenie zatok u indyków i przewlekłe choroby układu oddechowego u kurcząt (Markham i Wong, 1952). Z kolei Chu (1958) wyizolował PPLO od ptaków z innymi infekcjami, a także od ptaków nie wykazujących żadnych objawów klinicznych. Odkrycie to doprowadziło badaczy do wniosku, że w drogach oddechowych ptaków może występować więcej niż jeden gatunek z grupy pleuropneumonia, z czego tylko jeden gatunek był patogenny, a pozostałe komensalne. W celu zweryfikowania tej hipotezy zbadano właściwości biologiczne i serologiczne 40 szczepów mykoplazm wyizolowanych z dróg oddechowych kur i indyków. Wyniki badań opisanych przez Edwarda i wsp. (1956) jasno dowodzą, że badane szczepy należały do co najmniej trzech różnych gatunków określanych jako PPLOs. W kolejnej pracy Edward i Kanarek (1960) po raz pierwszy zidentyfikowali i opisali trzy gatunki mykoplazm: *M. gallisepticum*, *M. gallinarum* i *M. iners*. Dotychczas u ptaków zostało zidentyfikowanych ponad 20

gatunków mykoplazm, wśród których znajdują się gatunki będące zarówno patogenami jak i komensalami.

1.2. Charakterystyka rodzaju *Mycoplasma*

1.2.1. Taksonomia

Mykoplazmy są najmniejszymi znanymi bakteriami wielkością zbliżone do minimalnej wielkości niezbędnej do niezależnego wzrostu i rozmnażania się poza organizmem żywiciela (Razin i wsp., 1998). Rodzaj *Mycoplasma* należy do królestwa Bakterii, gromady Tenericutes, klasy Mollicutes, rzędu Mycoplasmatales i rodziny Mycoplasmataceae (May i wsp., 2014). Do rodzaju *Mycoplasma* należy obecnie 235 gatunków i trzeba zauważyć, że liczba ta ciągle wzrasta (Parte i wsp., 2020). Znaczna część gatunków mykoplazm została zidentyfikowana między 1960 a 1990 rokiem, jednak w przypadku większości z nich znane są jedynie podstawowe informacje niezbędne do opisu nowego gatunku. Aktualna taksonomia i identyfikacja nowych gatunków klasy Mollicutes opiera się głównie na ich klasyfikacji na podstawie cech fenotypowych. W 2007 roku, do kryteriów niezbędnych do klasyfikacji gatunków mikroorganizmów należących do klasy Mollicutes, została dodana analiza sekwencji genu 16S rRNA, która jest ostatecznym wskaźnikiem pozycji taksonomicznej nowego gatunku. Wykorzystanie metody analizy filogenetycznej genu 16S rRNA upraszcza wybór innych testów fenotypowych (biochemicznych i serologicznych) odpowiednich do ostatecznej identyfikacji izolatów do poziomu gatunku (Brown i wsp., 2007). Obecnie taksonomia rodzaju *Mycoplasma* to złożona kwestia, która stała się przedmiotem debaty z uwagi na ostatnio zaproponowane zmiany w nomenklaturze (Gupta i wsp., 2018), które zostały kategorycznie odrzucone przez Międzynarodowy Komitet ds. Systematyki Prokaryota (ang. *International Committee on Systematics of Prokaryotes*, ICSP) (Balish i wsp., 2019).

1.2.2. Systematyka molekularna

Systematyka molekularna mykoplazm została ustalona na bazie sekwencjonowania genu 16S rRNA i porównania filogenetycznego 26 gatunków z rodzaju *Mycoplasma*, bakterii pokrewnych pochodzących z tej samej klasy oraz bakterii należących do typu Firmicutes (May i wsp., 2014). Badania te pozwoliły ustalić, że klasa Mollicutes jest podzielona na pięć głównych grup: *spiroplasma*, *pneumoniae*, *hominis*, *anaeroplasmata* i *asteroleplasmata* (Weisburg i wsp., 1989). W kolejnych latach potwierdzono, że klasa Mollicutes reprezentuje monofiletyczną grupę bakterii, która

wywodzi się od wspólnych przodków spokrewnionych z bakteriami Gram-dodatnimi i wydzieliła się około 605 milionów lat temu (Maniloff, 2002). Konstrukcja otrzymanego drzewa filogenetycznego wykazała, że rodzaj *Mycoplasma* nie jest monofiletyczny, a gatunki *Mycoplasma* należą do trzech grup: hominis, pneumoniae i spiroplasma. Grupa hominis obejmuje jedynie gatunki należące do rodzaju *Mycoplasma*. Do grupy spiroplasma należą rodzaje *Spiroplasma* i *Mesoplasma*, a do grupy pneumoniae – rodzaj *Ureoplasma* (May i wsp., 2014).

W oparciu o dane dotyczące genu 16S rRNA, które zostały zgromadzone w trakcie badań filogenetycznych blisko spokrewnionych gatunków, zaproponowano użycie arbitralnej wartości międzygatunkowego podobieństwa sekwencji na poziomie 97%, jako minimalnego poziomu wskazującego na odrębny gatunek (Pettersson i wsp., 2000). Badania oparte na rozszerzonej analizie sekwencji genów 16S rRNA rodziny Mycoplasmataceae generalnie potwierdzają tę tezę. Niemniej jednak, kilka blisko spokrewnionych gatunków mykoplazm o podobieństwie genów 16S rRNA większym niż 97% wykazało różnice serologiczne i genetyczne, które pozwoliły na wyodrębnienie ich jako odrębnych gatunków, pomimo wysokiego procentowego podobieństwa ich genów 16S rRNA (Volokhov i wsp., 2012). Możliwość zastosowania genu 16S rRNA i innych markerów genetycznych do identyfikacji mykoplazm była przedmiotem dyskusji ICSP, Podkomitetu ds. taksonomii Mollicutes. Uznano, że dostarczają one użytecznych informacji genetycznych w uzupełnieniu do obecnie zalecanych testów fenotypowych (Brown i wsp., 2007). Volokhov i wsp. (2012) w swoich badaniach wykazali, że region międzygenowy (ISR) i gen *rpoB* mogą być użytecznymi, komplementarnymi markerami filogenetycznymi do wnioskowania o relacjach filogenetycznych między gatunkami w obrębie rodziny Mycoplasmataceae.

Przeprowadzenie badań z wykorzystaniem ISR może być użyteczne w opisie nowego gatunku lub przy opracowywaniu specyficznych dla danego gatunku reakcji PCR (Ramírez i wsp., 2008). Pomimo, że sekwencja całego ampliconu ISR jest akceptowalnym typem sekwencji do konstrukcji drzew filogenetycznych, to z uwagi na różnice w długości ISR pomiędzy różnymi gatunkami mykoplazm, a także potencjalny polimorfizm wewnątrzgatunkowy, nie zaleca się określania pokrewieństwa filogenetycznego mykoplazm, bazując wyłącznie na sekwencjach tego markera (Volokhov i wsp., 2012). Z uwagi na wcześniej opisane cechy, trudne jest ustalenie arbitralnej wartości podobieństwa dla ISR, jednak zaproponowana w literaturze wartość to około 95-98% w zależności od pozycji filogenetycznej danego izolatu (Volokhov

i wsp., 2012). Badanie z wykorzystaniem ISR może okazać się przydatne w przypadku innych technik wykrywania mutacji, takich jak: elektroforeza w żelu w gradiencie denaturującym, polimorfizm konformacji pojedynczej nici lub analiza krzywej topnienia o wysokiej rozdzielczości (Ramírez i wsp., 2011).

Kolejnym kluczowym genem służącym do analizy filogenetycznej i identyfikacji bakterii, szczególnie w przypadku badania blisko spokrewnionych izolatów jest gen *rpoB*, kodujący podjednostkę β polimerazy RNA. Sekwencjonowanie genu *rpoB* pozwala na oszacowanie zawartości procentowej par zasad guanina-cytozyna (G + C), wartości hybrydyzacji DNA-DNA oraz oszacowanie średniej identyczności nukleotydów (procent całkowitej sekwencji genomowej wspólnej dla dwóch szczepów) (Adékambi i wsp., 2009). Na podstawie badań filogenetycznych genu *rpoB* blisko spokrewnionych gatunków mykoplazm izolowanych od ptaków, jako minimalny poziom wskazujący na odrębny gatunek, zaproponowano arbitralną wartość 90-91% (Volokhov i wsp., 2012).

W ostatnich latach potwierdzono również użyteczność zastosowania innych markerów genetycznych, które pozwalają na identyfikację mykoplazm do poziomu gatunku, a także mogą zostać wykorzystane do prowadzenia badań epidemiologicznych. Jako markery komplementarne do genu 16S rRNA mogą zostać użyte m. in. geny kodujące białka, w tym czynnik elongacji Tu (*tuf*), kinaza fosfoglicerynianowa (*pgk*), białko szoku cieplnego (*dnaK*), beta-podjednostka gyrazy DNA (*gyrB*), geny białek rybosomalnych (*rps*), i gen białka podziału komórkowego (*ftsZ*) (Wolf i wsp., 2004; Kong i Gilbert, 2004; Volokhov i wsp., 2007, 2012).

1.2.3. Cechy morfologiczne - budowa komórki

Komórka mykoplazm składa się z błony komórkowej, cytoplazmy, rybosomów, kolistej podwójnej helisy DNA (Razin, 1998). Najważniejszą cechą, która odróżnia mykoplazmy od innych bakterii, jest brak ściany komórkowej. Ta unikalna właściwość doprowadziła do umieszczenia mykoplazm w osobnym dziale taksonomicznym – Tenericutes (bakterie bezścienne), stanowiącym jeden z czterech działów królestwa Prokaryota (Kulappu Arachchige i wsp., 2020). Od tej cechy pochodzi nazwa Mollicutes (łac. *mollis* - miękka, *cutis* - skóra). Funkcję typowej dla bakterii ściany komórkowej u mykoplazm pełni selektywnie przepuszczalna błona komórkowa, składająca się z trzech warstw steroli (kwasów tłuszczowych, cholesterolu lub lipidów złożonych). Obecność błony komórkowej umożliwia mykoplazmom posiadanie wielu unikalnych właściwości, takich jak: zmienność antygenowa białek powierzchniowych, oporność na

antybiotyki zaburzające biosyntezę ściany komórkowej, unikalny system pomp jonowych, wrażliwość osmotyczna oraz wrażliwość na detergenty i alkohole (Kulappu Arachchige i wsp., 2020)

Brak sztywnej ściany komórkowej sprawia, że komórki mykoplazm mogą przyjmować różne kształty: od kulistych lub gruszkowatych struktur (o średnicy 0,3-0,8 μm) do rozgałęzionych lub spiralnych włókien (May i wsp., 2014). Niektóre gatunki mykoplazm mają wrzecionowaty lub kolbowaty kształt (np. *M. gallisepticum*) i posiadają wyspecjalizowane organelle, które pośredniczą w przyleganiu do komórek docelowych gospodarza (Rottem, 2003; Uppal i Chu, 1977). Organelle te składają się z sieci interaktywnych białek (adhezyn) oraz białek wspomagających przyleganie. Białka te współpracują strukturalnie i funkcjonalnie w celu mobilizacji i koncentracji adhezyn na wierzchołku komórki, co umożliwia mykoplazmom kolonizację błon śluzowych (Collier, 1983). Inne gatunki mykoplazm nie mają wyraźnych organelli wierzchołkowych, ale są zdolne do cytoadherencji i mogą wykorzystywać białka albo alternatywne mechanizmy pasożytnictwa powierzchniowego (Baseman i Tully, 1997). Spolaryzowana struktura organelli wierzchołkowych, a także ruch ślizgowy który jest unikalnym zjawiskiem obserwowanym u mykoplazm, umożliwiają im przyleganie do komórek gospodarza i poruszanie się (Miyata, 2008). Zdolność do tego typu poruszania się jak do tej pory została zidentyfikowana u 14 różnych gatunków z rodzaju *Mycoplasma*. Wśród gatunków występujących u ptaków taką zdolność wykazuje *M. gallisepticum* a także *M. imitans* i *M. iowae*. Ruchliwość ślizgowa umożliwia mykoplazmom dostęp do komórek nabłonka błony śluzowej, co odgrywa istotną rolę w ich patogenności (Indikova i wsp., 2014; Wijesurendra i wsp., 2015).

Mykoplazmy nie posiadają zdolności do wytwarzania składników niezbędnych do budowy błony komórkowej, dlatego ich replikacja i przeżycie są całkowicie zależne od substancji wytwarzanych przez gospodarza lub pobieranych ze sztucznych podłoży mikrobiologicznych. Jednym z przykładów substancji niezbędnej do namnażania mykoplazm jest cholesterol, który jest produktem końcowym szlaku biosyntezy steroli w komórkach zwierzęcych (Razin i wsp., 1982). Warto zaznaczyć, że mikroorganizmy z rodzaju *Mycoplasma*, mogą mieć bardzo wyspecjalizowane i zróżnicowane wymagania wzrostowe, co utrudnia, a czasami uniemożliwia namnażanie ich w warunkach laboratoryjnych (Ferguson-Noel i wsp., 2020).

Sposób rozmnażania mykoplazm nie różni się zasadniczo od sposobu rozmnażania innych prokariotów, które dzielą się przez podział komórki (Miyata i Seto,

1999). Replikacja genomu poprzedza podziały komórkowe, ale nie jest z nimi zsynchronizowana, dlatego w hodowlach mykoplazm można zaobserwować formy pączkujące, włókna i łańcuchy paciorków (Razin, 1995). Kolonie mykoplazm hodowane na sztucznym podłożu stałym (agar PPLO) tworzą charakterystyczny kształt sadzonego jaja (Razin i Oliver, 1961).

1.2.4. Wielkość i skład genomu *Mycoplasma*

Mikroorganizmy należące do rodzaju *Mycoplasma* posiadają niewielkie koliste dwuniciowe genomy, o zmiennej wielkości pomiędzy szczepami tego samego gatunku. Analiza filogenetyczna genu 16S rRNA potwierdziła, że mykoplazmy powstały na drodze ewolucji redukcyjnej z bakterii Gram-dodatnich o genomach o niskiej zawartości procentowej par G + C (Sirand-Pugnet i wsp., 2007). W genomie mykoplazm średnia zawartość G + C waha się w zakresie między 23,7–44,0%. Dodatkowo, między różnymi gatunkami mykoplazm można zauważyć różnice w rozkładzie G + C wzdłuż genomu (Sirand-Pugnet i wsp., 2007). W procesie ewolucji genom mykoplazm został zredukowany do niezbędnego minimum, co pozwala jednak na utrzymanie przez nie funkcji niezbędnych do samodzielnego rozmnażania się, replikacji DNA, transkrypcji i translacji. Skład genomu mykoplazm jest dostosowany do bezwzględnie pasożytniczego trybu życia (Razin i wsp., 1998). Znaczna część genów mykoplazm koduje lipoproteiny, które odpowiadają za interakcje z gospodarzem, a także umożliwiają mykoplazmom pozyskanie niezbędnych do rozwoju i replikacji substancji odżywczych (Bencina, 2002). Wielkość genomu mikroorganizmów z rodziny Mycoplasmataceae waha się od 580 do 1358,6 kbp, które kodują od 500 do 2000 genów. Najmniejszy genom wielkości 580 kbp posiada *M. genitalium* (Fraser i wsp., 1995), nieznacznie większy, bo około 630 kbp *M. meleagridis* (Yacoub i wsp., 2015), *M. synoviae* około 900 kbp (Zhu i wsp., 2018), *M. gallisepticum* około 1000 kbp (Papazisi i wsp., 2003) oraz *M. iowae* około 1200 kbp (Wei i wsp., 2012).

1.2.5. Gatunki mykoplazm występujące u ptaków

Spośród 235 znanych obecnie mykoplazm, ponad 20 gatunków zostało zidentyfikowanych u ptaków. Większość z nich została stwierdzona u drobiu hodowlanego, jednak jednostkę chorobową określaną jako mykoplazmoza drobiu wywołuje głównie zakażenie patogennymi szczepami gatunków *M. gallisepticum* i *M. synoviae*. Oba gatunki znajdują się w wykazie chorób zakaźnych podlegających notyfikacji do Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) (OIE, 2021). Mykoplazmoza drobiu jest objęta regulacjami prawnymi na poziomie prawa europejskiego (EC, 2016) i krajowego (Dz. U., 2004). Do gatunków mogących wywoływać mykoplazmozę zalicza się również *M. meleagridis* i *M. iowae*, jednak w porównaniu z zakażeniami *M. gallisepticum* i *M. synoviae*, nie stanowią one globalnego problemu. U drobiu hodowlanego zakażenie mykoplazmami zazwyczaj przybiera postać subkliniczną, a na wystąpienie wyraźnych objawów chorobowych wpływ mają dodatkowe czynniki współistniejące, takie jak czynniki środowiskowe (np. nieodpowiednia wentylacja kurnika, nadmierne zagęszczenie ptaków, wysokie stężenie amoniaku (NH₃) w powietrzu), stres czy zmiany hormonalne związane z rozpoczęciem nieśności (Kleven, 1998).

Mykoplazmy często biorą udział w zakażeniach mieszanych, gdzie współdziałają synergicznie z wirusami i/lub bakteriami, dlatego jednoznaczne określenie ich udziału w występowaniu objawów klinicznych choroby jest niezwykle trudne. Za patogenność danego gatunku mykoplazmy może odpowiadać skoordynowane działanie zróżnicowanej antygenowo i funkcjonalnie budowy powierzchni komórek. Ponadto, mykoplazmy wykazują znaczące różnice w patogenności pomiędzy szczepami w obrębie danego gatunku (Xu i wsp., 2021). Dodatkowo, szczepy mykoplazm różnią się między sobą tropizmem tkankowym i inwazyjnością, jednak czynniki będące przyczyną tych różnic nie zostały jeszcze poznane (Berčič i wsp., 2008). Do głównych objawów klinicznych wywołanych zakażeniem *M. gallisepticum* u drobiu hodowlanego należą: trudności z oddychaniem, wysięk z otworów nosowych, zapalenie spojówek, kichanie, zapalenie i obrzęk zatok podoczodołowych. Objawy kliniczne zakażenia *M. synoviae* w układzie oddechowym są podobne, jak w przypadku zakażeń *M. gallisepticum* lecz zwykle słabiej nasilone. Dodatkowo, u ptaków zakażonych *M. synoviae* może występować zapalenie błony maziowej stawów skokowych, przez co mogą pojawiać się obrzęki stawów i kulawizny (Ferguson-Noel i wsp., 2020). Ostatnie badania potwierdziły, że niektóre szczepy *M. synoviae* wykazują również predylekcję do układu rozrodczego kur i mogą

powodować anomalie wierzchołka skorupy jaj (EAA), nie powodując żadnych makroskopowych nieprawidłowości w tkankach jajowodu (Feberwee i wsp., 2009; Kursa i wsp., 2019). U drobiu hodowlanego zakażenia *M. gallisepticum* i *M. synoviae* są przyczyną znacznych strat ekonomicznych w postaci spadku nieśności, opóźnienia wzrostu młodych osobników oraz strat z powodu złej jakości tuszek. Zakażenia *M. gallisepticum* i *M. synoviae* powiązane z występowaniem objawów chorobowych występują głównie u ptaków z rzędu grzebiących, w szczególności u kur i indyków. Obecność tych patogenów została potwierdzona także u wielu innych gatunków ptaków, u których zwykle nie występowały objawy kliniczne, a za źródło zakażenia dla większości z nich uznano bliski kontakt z zakażonym drobiem domowym (Bradbury, 2005). Kliniczna postać mykoplazmozy wywołana zakażeniem *M. gallisepticum* występowała sporadycznie u dzikich indyków w Stanach Zjednoczonych (Jessup i wsp., 1983). W 1994 roku w USA zidentyfikowano szczep *M. gallisepticum*, wykazujący potencjał przystosowania się do nowego gatunku gospodarza, co spowodowało epidemię we wschodniej populacji dziwuszek ogrodowych (*Haemorus mexicanus*), rozprzestrzeniając się w kolejnych latach na dalsze regiony kontynentu. Ptaki zakażone *M. gallisepticum* wykazywały typowe dla mykoplazmozy objawy chorobowe, takie jak: trudności z oddychaniem, obustronne zapalenie spojówek i wysięk z otworów nosowych (Dhondt i wsp., 2005). W trakcie trwania epidemii podobne objawy były obserwowane u kilku innych gatunków ptaków wolno żyjących należących do rodziny Fringillidae, jednak zakażenia *M. gallisepticum* nie spowodowały redukcji populacji tych gatunków, tak jak miało to miejsce w przypadku dziwuszek ogrodowych (Dhondt i wsp., 2014). Inne, patogenne dla drobiu hodowlanego gatunki mykoplazm, takie jak *M. synoviae* czy *M. meleagridis*, również były izolowane od ptaków wolno żyjących, które nie wykazywały klinicznych objawów choroby (Fritz i wsp., 1992; Lierz i wsp., 2000).

Spośród mykoplazm izolowanych od ptaków cztery gatunki są swoiste dla drobiu wodnego: *M. anatis*, *M. anseris*, *M. cloacale* i *M. anserisalpinitidis*. Zakażenia tymi patogenami w stadach hodowlanych gęsi i kaczek mogą powodować znaczne straty ekonomiczne wynikające ze spadku produkcji jaj, wzrostu liczby zmarłych zarodków, czy braku przyrostu masy ciała u wyklutych piskląt. U dorosłych ptaków zakażenie jest przyczyną zapalenia kloaki i prącia (Stipkovits i Szathmary, 1996), określanym jako zakaźne zapalenie prącia i steku (ZZPST) (Tomczyk, 2019). W warunkach krajowych stwierdzono wysoki odsetek zakażenia swoistymi dla drobiu wodnego mykoplazmami w stadach gęsi i kaczek Barbarie (Tomczyk, 1996). Obecność *M. anatis* i *M. cloacale*

została potwierdzona także u różnych gatunków dzikiego ptactwa wodnego nie wykazujących objawów klinicznych (Goldberg i wsp., 1995). Na podstawie zakażenia eksperymentalnego przeprowadzonego przez Samuela i wsp. (1995), polegającego na zakażeniu *M. anatis* jaj kaczki krzyżówki (*Anas platyrhynchos*) stwierdzono, że zakażenie skutkowało redukcją lęgu i pogorszeniem wzrostu kacząt.

Ptaki zakażone patogennymi gatunkami mykoplazm mogą stać się bezobjawowymi nosicielami, a tym samym stanowić rezerwuar i wektor zakażeń (Bradbury i wsp., 2001; Michiels i wsp., 2016). W badaniach eksperymentalnych potwierdzono, że w rozprzestrzenianiu infekcji mogą brać również udział synantropijne gatunki ptaków wolno żyjących, takie jak gołębie czy wróble (Gharaibeh i Hailat, 2011). Gołębie, pozostając bezobjawowymi nosicielami gatunków mykoplazm patogennych dla drobiu hodowlanego, są podatne na zakażenia wywołane przez inne gatunki mykoplazm specyficzne wyłącznie dla gołębi takie jak: *M. columbinum*, *M. columborale* i *M. columbinasale* (Shimizu i wsp., 1978; Sinclair, 1980; Mac Owan i wsp., 1981; Nagatomo i wsp., 1997; Loria i wsp., 2005; Hellebuyck i wsp., 2014). Z uwagi na fakt, że były izolowane zarówno od chorych jak i od zdrowych ptaków, potwierdzenie ich potencjału chorobotwórczego w wywoływaniu klinicznych objawów choroby wymaga dalszych badań. Wiedza na temat szczepów mykoplazm swoistych dla gołębi jest niewystarczająca. Ptaki z rzędu Passeriformes, do których zalicza się wróble, są powszechnie identyfikowane jako bezobjawowi nosiciele i stanowią zagrożenie w bioasekuracji ferm drobiu hodowlanego (Stallknecht i wsp., 1982; Feberwee i wsp., 2021). Badania potwierdzają, że w tej grupie ptaków, poza wspomnianym wcześniej zakażeniem *M. gallisepticum* u dziwuszek ogrodowych, objawy chorobowe mykoplazmozy może wywoływać również zakażenie *M. sturni*. Ten gatunek mykoplazmy został po raz pierwszy opisany jako przyczyna zapalenia spojówek u szpaka europejskiego (Forsyth i wsp., 1996). W kolejnych latach *M. sturni* została zidentyfikowana jako przyczyna zapalenia spojówek u wielu innych gatunków wróblowatych (Ley i wsp., 1998; Wellehan i wsp., 2001a). W literaturze brak jest informacji o możliwości zakażenia tym gatunkiem mykoplazmy drobiu hodowlanego.

Ptaki drapieżne są wśród ptaków wolno żyjących prawdopodobnie najczęstszym gospodarzem różnych gatunków *Mycoplasma* spp., zarówno tych związanych z infekcjami u drobiu hodowlanego, jak i specyficznych wyłącznie dla tej grupy ptaków. Trzy nowe gatunki mykoplazm zostały wyizolowane od ptaków drapieżnych wykazujących objawy ze strony układu oddechowego: *M. buteonis* od myszołowa

zwyczajnego (*Buteo buteo*), *M. falconis* od raroga zwyczajnego (*Falco cherrug*) oraz *M. gypis* od sępa płowego (*Gyps fulvus*) (Poveda i wsp., 1994). Dodatkowo, *M. buteonis* zidentyfikowano również u pisklęcia sokoła wędrownego z deformacjami szkieletu (Erdélyi i wsp., 1999). Różne inne gatunki mykoplazm, takie jak *M. seminis* sp. nov. izolowany od sokołów (Fischer i wsp., 2020) czy *M. hafezii* sp. nov. wyizolowany z tchawicy sokoła wędrownego (Ziegler i wsp., 2019), stwierdzono u ptaków niewykazujących żadnych objawów klinicznych, co może wskazywać na komensalny charakter tych mykoplazm. Komensalne gatunki mykoplazm były izolowane również od bociana białego (*Ciconia ciconia*) – *M. ciconiae* (Möller Palau-Ribes i wsp., 2016), mew – *M. bradburyea* (Ramírez i wsp., 2021) czy od pingwina Humboldta (*Spheniscus humboldti*) – *M. tullyi* (Yavari i wsp., 2017).

1.2.6. Transmisja – drogi rozprzestrzeniania się mykoplazm

Zakażenia mykoplazmami u ptaków mogą rozprzestrzeniać się w dwojaki sposób: drogą poziomą i pionową. Transmisja pozioma zachodzi wówczas, gdy patogen jest przekazywany przez bezpośredni kontakt pomiędzy osobnikami w stadzie i pomiędzy stadami z udziałem wektorów. Miejscem wniknięcia patogenu do organizmu gospodarza są górne drogi oddechowe lub spojówki a niekiedy droga płciowa. Rozprzestrzenianie się zakażenia następuje drogą płciową (akt krycia lub inseminacji), gdzie tkanką docelową jest powierzchnia nabłonka dróg moczowo-płciowych, dotyczy gatunków patogennych dla indyków (*M. meleagridis*, *M. iowae*) czy drobiu wodnego (*M. anseris*, *M. anserisalpingitidis*) (Bradbury, 2005). Tempo rozprzestrzeniania się zakażenia w stadzie drobiu może znacząco się różnić między różnymi szczepami w obrębie tego samego gatunku mykoplazmy (Dingfelder i wsp., 1991; Feberwee i wsp., 2005). W przypadku mykoplazm patogennych dla drobiu hodowlanego stwierdzono ich zdolność do przeżywania w środowisku, w tym: na cząsteczkach kurzu, powierzchni piór czy w wodzie, co stanowi dodatkowo ważny mechanizm pośredniej transmisji poziomej (Marois i wsp., 2002, 2005). Transmisja pozioma jest również sposobem szerzenia się mykoplazmy pomiędzy różnymi gatunkami ptaków (Hartup i wsp., 1998). Przykładem tego może być zapalenie spojówek wywołane infekcją *M. gallisepticum*, które po raz pierwszy pojawiło się u dziwuszek ogrodowych we wschodniej części Stanów Zjednoczonych. Patogen dość szybko rozprzestrzenił się w lokalnej populacji tego gatunku ptaków (Ley i wsp., 1996; Luttrell i wsp., 1996), po czym epidemia przemieszczała się w głąb kraju przez kolejne lata, aż do osiągnięcia zachodniego

wybrzeża USA (Luttrell i wsp., 2016). Obecność *M. gallisepticum* została potwierdzona również u innych ptaków z rzędu wróblowatych, u których nie stwierdzano objawów klinicznych (Farmer i wsp., 2005). Chociaż dokładne sposoby transmisji *M. gallisepticum* nie są do końca znane, przypuszcza się, że główną przyczyną rozprzestrzeniania się zakażenia *M. gallisepticum* między różnymi gatunkami ptaków jest bezpośredni kontakt podczas pobierania pokarmu w karmnikach (Fischer i wsp., 1997). W badaniach prowadzonych przez Hochachka i wsp. (2013) stwierdzono wielokrotny transfer *M. gallisepticum* pomiędzy drobiem domowym a dziwuszkami ogrodowymi, jednak tylko jeden szczep tego patogenu posiadał zdolność przystosowania się i ewoluowania w organizmie nowego gospodarza.

Mykoplazmoza często przebiega w postaci subklinicznej, gdzie nosiciele niewykazujący objawów chorobowych są równocześnie rezerwuarami patogenu. W zakażeniach mykoplazmami w stadach drobiu hodowlanego stosowanie farmakoterapii rzadko prowadzi do całkowitej eradykacji patogenu, a jedynie do ustąpienia objawów klinicznych i do trwałego nosicielstwa mykoplazm (Kleven, 2008). W badaniach prowadzonych przez Mashima i wsp (1997) proces leczenia dziwuszek ogrodowych z objawami zapalenia spojówek wywołany zakażeniem *M. gallisepticum*, u których zastosowano terapię opartą o kombinację tylozyny i ciprofloksacyny, prowadził do ustąpienia objawów klinicznych. Niemniej jednak, obecność materiału genetycznego i przeciwciał swoistych dla *M. gallisepticum* została potwierdzona u kilku badanych ptaków. Wellehan i wsp. (2001b) w swojej pracy w procesie leczenia zapalenia spojówek u dziwuszek ogrodowych zastosowali inny zestaw antybiotyków: enrofloksacynę oraz gentamycynę, po czym podobnie jak w poprzedniej pracy, u ptaków zaobserwowano ustąpienie objawów klinicznych. Pomimo tego, obecność *M. gallisepticum* była wykrywana nawet do 6 miesięcy od zakończenia terapii. Wyniki obu prac wskazują, że ptaki wolno żyjące, u których stwierdzono zakażenie *M. gallisepticum*, po okresie rekonwalescencji mogą pozostać nosicielami i rezerwuarem tego patogenu. Występowanie mykoplazm patogennych dla drobiu grzebiącego stwierdzono u wielu innych gatunków ptaków, w tym u kaczek (Bencina i wsp., 1988), gołębi (Benčina i wsp., 1987) oraz gęsi (Buntz i wsp., 1986), jednak ptaki te nie wykazywały klinicznych objawów choroby, a pozostawały wyłącznie wektorami zakażenia. Szczególne zagrożenie w rozprzestrzenianiu zakażeń mykoplazmami mogą stanowić ptaki migrujące, jednak w dostępnej literaturze zostało to potwierdzone

wyłącznie dla mykoplazm infekujących ptactwo wodne, gdzie źródłem patogenu mogą być kaczki wolno żyjące (Goldberg i wsp., 1995).

Niezwykle istotną drogą rozprzestrzeniania się mykoplazm jest transmisja pionowa zarazka, w której patogen jest przekazywany z rodziców na potomstwo przez jajo (*per ovo*). W badaniach eksperymentalnych mających na celu udokumentowanie transmisji *M. synoviae*, najwyższe wskaźniki transmisji stwierdzono między 4 a 6 tygodniem po zakażeniu ptaków. W przypadku zakażeń *M. gallisepticum* najwyższe wskaźniki przenoszenia patogenu poprzez jaja stwierdzono w czasie ostrej fazy choroby, między 3 a 8 tygodniem po zakażeniu i dotyczyły od 14 do 53% zainfekowanych jaj (Ferguson-Noel i wsp., 2020). Wskaźniki transmisji pionowej mykoplazm wyrażone w liczbach mogą różnić się między zakażeniami poszczególnymi szczepami danego gatunku mykoplazm (Glisson i Kleven, 1984). Warto również zaznaczyć, że wskaźniki transmisji podczas przewlekłych zakażeń szczepami terenowymi będą prawdopodobnie znacznie niższe, niż te odnotowane w pracach doświadczalnych. Stan wiedzy dotyczącej pionowej transmisji mykoplazm u ptaków wolno żyjących jest znikomy. W dostępnej literaturze jest tylko jedna praca opisująca wykrycie *M. lipofaciens* ML64 w jajach jastrzębia zwyczajnego (*Accipiter gentilis*) (Lierz i wsp., 2007). Zakażenie *M. lipofaciens* stwierdzone w jajach bez wcześniejszej izolacji patogenu u ptaków może jedynie sugerować możliwość pionowej transmisji tego gatunku mykoplazmy. W badaniach terenowych prowadzonych w USA, których celem było sprawdzenie pionowej transmisji *M. gallisepticum* u dziwuszek ogrodowych, nie potwierdzono poziomego przenoszenia patogenu do jaj (Hartup i Kollias, 1999).

1.2.7. Czynniki biorące udział w procesie kolonizacji organizmu gospodarza przez *Mycoplasma* spp.

Choroba bakteryjna jest wynikiem złożonych interakcji między mikroorganizmem, gospodarzem i środowiskiem. W procesie ewolucji organizm gospodarza rozwinął liczne mechanizmy chroniące go przed infekcją, natomiast mykoplazmy opracowały wiele strategii pozwalających im uniknąć lub utrudnić działanie mechanizmów obronnych gospodarza (Akira i wsp., 2006). Patogeneza chorób wywoływanych przez poszczególne gatunki mykoplazm infekujące ptaki jest procesem wieloczynnikowym, w którym ważnym czynnikiem może być inwazyjność samych mykoplazm. Miejscem wniknięcia większości mykoplazm do organizmu ptaka są drogi oddechowe, a tkanką docelową - nabłonek dróg oddechowych (Winner i wsp., 2000). Patogeny gatunku mykoplazmy musi wniknąć do organizmu gospodarza, dotrzeć do

tkanki docelowej, przylgnąć lub wnikać do niej i mieć możliwość namnażania się. Pierwszą barierę, jaką patogen musi pokonać żeby skolonizować powierzchnię błony śluzowej ptaka, stanowi śluz. Pozostanie na powierzchni nabłonka jest bardzo istotne w procesie kolonizacji, dlatego też bakterie wykorzystują różne strategie, takie jak krótkotrwałe wiązanie się ze śluzem czy wiązanie się z białkami powierzchniowymi nabłonka gospodarza (Yiwen i wsp., 2021). Adhezja mykoplazm jest wstępnym i niezbędnym etapem dla późniejszej kolonizacji i infekcji organizmu gospodarza, a z kolei utrata aktywności adhezyjnej odpowiada za znaczne obniżenie patogenności większości mykoplazm (Much i wsp., 2002). W procesie adhezji biorą udział zarówno adhezyny jak i białka pomocnicze znajdujące się na powierzchni komórek mykoplazm. Adhezja mykoplazm do komórek nabłonka była badana głównie w odniesieniu do nabłonka dróg oddechowych. Mykoplazmy wykształciły wiele mechanizmów pozwalających im przeciwdziałać różnym procesom mającym na celu usunięcie ich z organizmu gospodarza. Od dawna wiadomo, że działanie aparatu rzęskowego utrudnia kolonizację powierzchni komórek nabłonka przez patogeny. Mykoplazmy podczas kolonizacji organizmu gospodarza są zdolne do wywoływania zaburzeń ruchu rzęsek (ciliostazy), co pozwala im uniknąć wydalenia wskutek tzw. oczyszczenia rzęskowego. Podczas zakażenia patogennym szczepem *M. gallisepticum* obserwuje się degenerację i metaplastę nabłonka oddechowego oraz zwiększenie grubości błony śluzowej tchawicy wywołane poprzez infiltrację komórek jednojądrzastych (Kulappu Arachchige i wsp., 2020). Przez wiele lat mykoplazmy były uważane za patogeny zewnątrzkomórkowe, jednak wyniki niedawno przeprowadzonych badań dostarczyły dowodów na to, że niektóre gatunki mogą wnikać do komórek gospodarza. Jednym z gatunków rodzaju *Mycoplasma* posiadających taką zdolność jest *M. gallisepticum* (Dowling i wsp., 2020). W badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych na kurczętach wykazano, że po zakażeniu wysoce patogennym szczepem *M. gallisepticum* można go było reizolować z serca, mózgu, wątroby i nerek zakażonych ptaków. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wykazały zdolność mykoplazm do hematogenego rozprzestrzeniania się w obrębie organizmu gospodarza (Much i wsp., 2002). Od momentu kolonizacji mykoplazmy wchodzi w interakcję z układem odpornościowym gospodarza, a ich zdolność do zmienności białek powierzchniowych utrudnia usunięcie ich z organizmu ptaka. Dodatkowo wykazano, że niektóre gatunki mykoplazm wywierają wpływ na komórki układu odpornościowego i wykazują działanie immunomodulujące (Razin i wsp., 1998). Spośród gatunków mykoplazm izolowanych od ptaków wpływ na supresję

lub stymulację limfocytów B i T, a także indukcję produkcji cytokin potwierdzono m. in. u *M. gallisepticum* i *M. synoviae* (Javed i wsp., 2005; Lavric i wsp., 2008). W badaniach prowadzonych przez Majumder i wsp. (2014) wykazano, że również niepatogenny szczep *M. gallisepticum* (Rhig) wykazywał zdolność do wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej i aktywności leukocytów. W wielu przypadkach zmiany chorobowe powstające podczas zakażenia wydają się być bardziej prawdopodobne z powodu pośrednich reakcji wynikających z odpowiedzi immunologicznej i odpowiedzi zapalnej gospodarza, niż bezpośrednich efektów wywołanych przez same bakterie (Bradbury, 2005).

1.2.8. Cechy mykoplazm predysponujące je do adaptacji do nowego gospodarza

Mykoplazmy, jako mikroorganizmy przystosowane do bezwzględnie pasożytnego trybu życia, wydają się wykazywać specyficzność względem gospodarzy, a także tropizm do ich tkanek i narządów. Istnieje wiele doniesień o występowaniu mykoplazm u żywicieli, którzy nie są postrzegani jako ich swoiści gospodarze. Dlatego założenie o ścisłej swoistości gatunków mykoplazm dla gospodarza może być błędne i mykoplazmy mogą być zdolne do zakażenia szerszego spektrum żywicieli i ekosystemów niż wcześniej przewidywano (Pitcher i Nicholas, 2005; Citti i Blanchard, 2013). Braki w ogólnej wiedzy dotyczącej występowania mykoplazm u różnych gospodarzy mogą wynikać z faktu, że mykoplazmy są znacznie częściej komensalami niż patogenami, a infekcje mają często przebieg subkliniczny lub utajony, co stanowi trudność w wykryciu zakażenia i ich identyfikacji (Dhondt i wsp., 2014).

Mechanizmy potrzebne mykoplazmom do przetrwania w żywicielu kręgowym nie zostały jednak do końca poznane (Browning i wsp., 2011). Badania nad mechanizmami zdolności infekcyjnej wykorzystywanej przez poszczególne gatunki mykoplazm skupiały się na identyfikacji cząsteczek adhezyjnych (Kulappu Arachchige i wsp., 2020), lipoprotein (Browning i wsp., 2011), mechanizmów molekularnych wykorzystywanych do zmiany składu powierzchni błony bakteryjnej (Razin i wsp., 1998) oraz zdolności do produkcji składników utleniających (np. nadtlenu wodoru), które powodują uszkodzenia komórek organizm gospodarza (Pritchard i wsp., 2014). Chociaż badania te zapewniają wgląd w mechanizmy wykorzystywane przez mykoplazmy do infekowania gospodarza, nie wyjaśniają dlaczego dany gatunek mykoplazmy jest specyficzny dla swojego gospodarza. Większość gatunków mykoplazm, które mają zdolność infekowania szerszego zakresu gospodarzy, występuje u gatunków ptaków

wykazujących pokrewieństwo np. w obrębie rzędu czy rodziny (May i wsp., 2014). Poznanie w jaki sposób zmiana gospodarza wpływa na rozwój cech mykoplazm związanych z wirulencją może ułatwić zrozumienie fenomenu transmisji patogenu z jednego gatunku na drugi. Za główną cechę pozwalającą na dostosowanie się danego gatunku mykoplazmy do nowego gospodarza została uznana zmienność antygenowa białek powierzchniowych komórki mykoplazm, umożliwiająca unikanie odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu. W późniejszych badaniach zidentyfikowano inne czynniki, sprzyjające skutecznemu transferowi mykoplazm pomiędzy żywicielami, takie jak np. różnice w genie *msla* kodującym lipoproteinę odpowiedzialną za pozyskiwanie nukleotydów ze środowiska, wpływ czynnika metabolicznego dehydrogenazy dihydrolipoamidowej (Lpd) na odpowiedni poziom energii umożliwiający skuteczną kolonizację organizmu gospodarza, czy mechanizmy odpowiedzialne za zdolność adhezji do komórek gospodarza (Dowling i wsp., 2020).

Zakażenie *M. gallisepticum* u drobiu jest najczęściej przyczyną przewlekłej choroby układu oddechowego i zakaźnego zapalenia zatok podoczodołowych. Zmiana gospodarza jest często czynnikiem wpływającym na zmianę przebiegu choroby i obraz objawów klinicznych zakażenia. U dziwuszek ogrodowych zakażenie było przyczyną wysokiej śmiertelności wynikającej z ciężkiego zapalenia spojówek, prowadzącego do zmniejszonej zdolności pobierania pokarmu i możliwości ucieczki przed drapieżnikami. Analiza filogenetyczna szczepów izolowanych od tych ptaków wykazała, że zmiana żywiciela była spowodowana introdukcją konkretnego szczepu *M. gallisepticum*, który wykazał potencjał zaadoptowania się do nowego gospodarza (Bonneaud i wsp., 2019). Porównanie sekwencji całego genomu szczepów mykoplazm z ogniska epizootycznego u drobiu i od dziwuszek wykazało, że zmiana gospodarza była związana z istotnymi zmianami w genach zmiennej powierzchniowej lipoproteiny (*vlhA*) oraz utratą genów, takich jak utrata locus DNA specyficznego dla gospodarza (*hsd*), który prawdopodobnie odpowiada za tropizm tkankowy, a także ze zmianami w genach odpowiedzialnych za cytoadherencję (Dowling i wsp., 2020). Ten zespół badaczy przeprowadził badania z wykorzystaniem dwóch metod: jakościowego testu immunofluorescencji różnicowej (DIF) i ilościowego testu z gentamycyną. Test DIF pozwala na wizualizację wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych bakterii w zainfekowanych komórkach ptaków, natomiast ilościowy test z gentamycyną umożliwia wykrycie jedynie żywych bakterii ulokowanych wewnątrzkomórkowo (Dowling i wsp., 2020). Wyniki tych badań dowiodły, że szczepy *M. gallisepticum* izolowane od dziwuszki ogrodowej wykazują większą zdolność do

adhezji, inwazji, utrzymywania się i opuszczania komórek fibroblastów zarodków kurzych, niż referencyjne zjadliwe (Rlow) i atenuowane (Rhigh) szczepy drobiowe. Dodatkowo, w odróżnieniu od szczepów drobiowych, szczep *M. gallisepticum* z ogniska epizootycznego zięby domowej HF_1994 wykazywał wyraźny brak cytotoksyczności. Z kolei szczep *M. gallisepticum* izolowany od dziwuszek wykazywał zdolność do wykorzystywania środowiska wewnątrzkomórkowego, co mogło mu ułatwić kolonizację, rozprzestrzenianie się i unikanie odpowiedzi immunologicznej ze strony nowego gospodarza.

1.2.9. Czynniki mające wpływ na występowanie *Mycoplasma* spp. u poszczególnych gatunków ptaków

Nie stwierdzono jednoznacznej odpowiedzi na pytanie dlaczego u jednych gatunków ptaków mykoplazmy występują powszechnie a u innych rzadziej. Na obecność mykoplazm w organizmie ptaków ma wpływ wiele czynników, zarówno ze strony organizmu ptaka jak i charakterystycznych cech samych mykoplazm (Bradbury, 2005). Mikroorganizmy związane z infekcjami układu oddechowego, tak jak na przykład mykoplazmy, są często normalnymi składnikami flory bakteryjnej i tylko w nielicznych przypadkach wywołują chorobę. Odpowiada za to złożona interakcja pomiędzy gospodarzem, środowiskiem i właściwościami kolonizującymi mikroorganizmów. Jama nosowo-gardłowa jest połączeniem układów pokarmowego i oddechowego, dlatego skład mikroflory wydaje się tam być najbardziej złożony (Ngunjiri i wsp., 2019). Kolonizacja jamy nosowo-gardłowej patogenami oportunistycznymi rozpoczyna się w ciągu pierwszych tygodni życia ptaków i może być modulowana przez inne mikroorganizmy z którymi wchodzi one w interakcję (Hakansson i wsp., 2018). Wyjaśnienie interakcji między patogenną a fizjologiczną florą górnych dróg oddechowych może przyczynić się do wykorzystania bakterii komensalnych w celu zwalczania patogenów wywołujących choroby układu oddechowego (Man i wsp., 2017).

1.2.10. Metody stosowane do wykrywania zakażeń *Mycoplasma* spp.

Opracowano wiele metod mających na celu wykrycie obecności mykoplazm. Wybór i zastosowanie konkretnej metody zależy od celu badania. Metodami pozwalającymi na potwierdzenie obecności mykoplazm jest wykrycie ich materiału genetycznego lub wykonanie badania mikrobiologicznego polegającego na izolacji bakterii na podłożu hodowlanym. Metoda hodowlana jest określana jako złoty standard i jest niezbędna do potwierdzenia czynnego zakażenia oraz ostatecznej identyfikacji

gatunku mykoplazm. Ze względu na różnorodne wymagania wzrostowe mykoplazmy są mikroorganizmami szczególnie trudnymi do izolacji z wykorzystaniem metody hodowlanej (Ferguson-Noel i wsp., 2020). Konkretnie gatunki mykoplazm, a niekiedy nawet szczepy w obrębie tego samego gatunku, posiadają ściśle określone specyficzne wymagania dotyczące składu podłoża namnażającego czy warunków termicznych inkubacji. Od 80-tych lat ubiegłego wieku w detekcji i różnicowaniu mikroorganizmów z rodzaju *Mycoplasma* znajdują zastosowanie metody oparte na wykorzystaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (Vega-Orellana i wsp., 2017). Badania z wykorzystaniem techniki PCR umożliwiają szybkie, czułe i specyficzne wykrywanie DNA różnych gatunków mykoplazm. Obecnie często stosowana jest również modyfikacja metody PCR – metoda real-time PCR, umożliwiająca określenie ilości materiału genetycznego mykoplazm zawartego w próbce (Raviv i Kleven, 2009). Zarówno konwencjonalne techniki PCR, jak i real-time PCR są stosowane do wykrywania materiału genetycznego mykoplazm bezpośrednio w próbkach, bez konieczności stosowania metody hodowlanej. Możliwość zastosowania reakcji PCR pozwalających na identyfikację gatunku ma ogromne znaczenie dla szczegółowej diagnostyki i badań epidemiologicznych (Li i wsp., 2009). Kolejną z metod pozwalającą na szybką identyfikację gatunku jest elektroforeza w gradiencie stężeń czynnika denaturującego (DGGE). Metoda ta polega na użyciu czynnika denaturującego w różnych stężeniach co pozwala na rozdział fragmentów DNA o różnej wielkości, które zatrzymują się na różnych wysokościach ścieżki żelu tworząc specyficzny wzór rozdziału dzięki któremu możliwe jest różnicowanie poszczególnych gatunków mykoplazm (Enright i Spratt, 1999). Inne metody molekularne pozwalające na identyfikację oparte są na polimorfizmie sekwencji określonych sekwencji DNA, jak np. metoda MLST. Metoda ta polega na analizie od 3 do 7 genów referencyjnych metabolizmu podstawowego, które ze względu na wysoce konserwatywny charakter są użytecznym narzędziem do badań filogenetycznych (Enright i Spratt, 1999)

W ostatnich latach metoda spektrometrii mas MALDI-TOF MS (ang. *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) znalazła zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej, umożliwiając szybką i dokładną identyfikację gatunkową zdecydowanej większości mikroorganizmów izolowanych w rutynowych laboratoriach diagnostycznych (Wjst i van den Boom, 2005). Wykorzystanie MALDI-TOF MS do identyfikacji izolatów mykoplazm może być utrudnione przez ograniczoną liczbę widm referencyjnych mykoplazm w obecnie

dostępnych bazach danych. W 2019 roku Spargser i wsp. podjęli próbę stworzenia dużej wewnętrznej biblioteki MSP (ang. *main spectrum profiles*) obejmującej 13 grup filogenetycznych w obrębie klasy Mollicutes, zawierających 114 znanych i 23 nieopisanych gatunków mykoplazm zwierzęcych (Spargser i wsp., 2019). W tym samym roku Baudler i wsp. stworzyli bazę danych obejmujących 23 gatunki ptasich mykoplazm, w tym również 4 szczepów szczepionkowych (Baudler i wsp., 2019). Na podstawie analizy terenowych izolatów różnych gatunków *Mycoplasma* spp. została oszacowana 96% skuteczność tej techniki w identyfikacji drobnoustrojów na poziomie gatunku. Należy jednak podkreślić, że w próbkach terenowych może być jednocześnie obecnych kilka gatunków mykoplazm. Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do badania próbek zawierających kilka gatunków patogenu w jednej próbce, przeprowadzone na podstawie identyfikacji gatunków mykoplazm izolowanych od ludzi i bydła ujawniło znaczne ograniczenia tej metody. W próbkach, w których odsetek poszczególnych gatunków mykoplazm nie był równy, wykrywano tylko gatunek który był liczniejszy (Pereyre i wsp., 2013). Należy pamiętać, że technika ta może być stosowana wyłącznie jeśli poprzedza ją skuteczna izolacja mikroorganizmu w metodzie hodowlanej.

Innymi metodami stosowanymi w diagnostyce zakażeń mykoplazmami są metody serologiczne, takie jak: test aglutynacji płytkowej (SPA), test ELISA i test hamowania hemaglutynacji (HI), które są powszechnie stosowane w rutynowej diagnostyce i kontroli zakażeń mykoplazmami w stadach drobiu hodowlanego. Są to metody pośredniego wykrywania zakażeń *M. gallisepticum*, *M. synoviae* i *M. meleagridis* u ptaków.

2. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Praca przeglądowa

A. Sawicka, M. Durkalec, G. Tomczyk, O. Kursa. 2020. Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds: A systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 15(4): e0231545.
(punkty MEiN: 100 pkt.; IF 3,041)

Prace oryginalne

Praca 2.1 A. Sawicka, G. Tomczyk, O. Kursa, T. Stenzel. 2019. Occurrence and relevance of *Mycoplasma* spp. in racing and ornamental pigeons in Poland. Avian Dis. 63(3): 468-473.
(punkty MEiN: 70 pkt.; IF 1,493)

Praca 2.2 A. Sawicka-Durkalec, O. Kursa, Ł. Bednarz, G. Tomczyk. 2021. Occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild birds: phylogenetic analysis and potential factors affecting distribution. Sci. Rep. 11: 17065.
(punkty MEiN: 140 pkt.; IF 4,379)

Praca 2.3 A. Sawicka-Durkalec, G. Tomczyk, O. Kursa, T. Stenzel, M. Gyuranecz. 2021. Evidence of *Mycoplasma* spp. transmission by migratory wild geese. Poultry Sci. 101: 101526.
(punkty MEiN: 140 pkt.; IF 3,352)

Łącznie: 450 punktów MEiN; IF 12,265¹

¹Punktacja według wykazu czasopism MEiN oraz współczynnik wpływu Impac Factor (IF) według Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania prac.

2.2. Cel i zakres pracy doktorskiej

Głównym celem pracy doktorskiej była ocena częstości występowania zakażeń oraz analiza filogenetyczna *Mycoplasma* spp. u ptaków wolno żyjących i gołębi.

Zadania szczegółowe obejmowały:

1. Ocenę wpływu czynników takich jak: typ siedliska, zwyczaje żywieniowe oraz zjawisko migracji na częstość występowania *Mycoplasma* spp. u ptaków wolno żyjących (praca 2.2)
2. Ocenę obecności zakażeń *M. gallisepticum* i *M. synoviae* u ptaków wolno żyjących i gołębi w Polsce (prace 2.1 i 2.2)
3. Analizę filogenetyczną sekwencji genu *rpoB* *M. anserisalpingitidis* izolowanych od dzikich gęsi (praca 2.3)
4. Ocenę roli dzikich gęsi jako potencjalnego rezerwuaru i wektora mykoplazm patogennych dla hodowlanego drobiu wodnego (praca 2.3)
5. Opracowanie i walidację metody PCR pozwalającej na wykrywanie poszczególnych gatunków z rodzaju *Mycoplasma* swoistych dla gołębi (praca 2.1)
 - 5.1. Analizę różnic w występowaniu mykoplazm charakterystycznych dla gołębi w zależności od typu użytkowego ptaków oraz ich kondycji zdrowotnej (praca 2.1)
 - 5.2. Ocenę możliwości występowania koinfekcji poszczególnymi gatunkami mykoplazm w zależności od kondycji zdrowotnej i typu użytkowego gołębi (praca 2.1)

3. Wnioski

1. Wybrane gatunki ptaków wolno żyjących jak również gołębie są podatne na zakażenia jednym lub kilkoma gatunkami *Mycoplasma* sp., przez co stanowią naturalny rezerwuuar tych patogenów.
2. Wykazano związek pomiędzy obecnością zakażeń *Mycoplasma* spp. u ptaków wolno żyjących a czynnikami środowiskowymi, takimi jak: rodzaj diety, preferowane siedlisko i migracja.
3. W badanych próbkach pochodzących od ptaków wolno żyjących i gołębi nie stwierdzono obecności materiału genetycznego *M. gallisepticum* i *M. synoviae*, a zatem ryzyko transmisji tych patogenów do drobiu hodowlanego jest niskie.
4. Dzikie gęsi stanowią rezerwuuar *Mycoplasma* spp. i mogą pełnić rolę wektora zakażeń dla hodowlanego drobiu wodnego.
5. Opracowane testy PCR do wykrywania mykoplazm swoistych dla gołębi są użyteczne do gatunkowego rozróżnienia *M. columbinum*, *M. columborale* i *M. columbinasale*.
6. Nie potwierdzono związku pomiędzy kondycją zdrowotną gołębi a występowaniem *Mycoplasma* spp., jednak u ptaków wykazujących objawy kliniczne *Mycoplasma* spp. była częściej wykrywana u gołębi pocztowych niż u ozdobnych, co może sugerować rolę mykoplazm w patogenezie tego typu użytkowego.
7. Stan zdrowia i typ użytkowy gołębi może wpływać na proporcje występowania poszczególnych gatunków mykoplazm specyficznych dla tego gatunku ptaków.