

# **AUTOREFERAT**

---

**Dr Wojciech Kozdruń**

---

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

---

**Puławy, 2012**

**I. Imię i nazwisko:** Wojciech Bogdan Kozdruń

**II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

- 1) Dyplom technika weterynarii o specjalności profilaktyka i leczenie zwierząt – Policealne Studium Weterynaryjne w Trzcianie k/Rzeszowa – 1989 rok  
– Praca dyplomowa: Metody kastracji zwierząt domowych
- 2) Lekarz weterynarii – Wydział Weterynaryjny Akademii Rolniczej w Lublinie – 1995 rok
- 3) Doktor nauk weterynaryjnych – Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach – 2003 rok – Rozprawa doktorska pod tytułem „Charakterystyka krajowych szczepów wirusa choroby Mareka” – promotor: prof. dr hab. Elżbieta Samorek – Salamonowicz
- 4) Tytuł Specjalisty chorób drobiu i ptaków ozdobnych – Specjalizacyjne Studium Podyplomowe dla Lekarzy Weterynarii - Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach – 2002 rok
- 5) Dyplom – Auditor wewnętrzny w zakresie normy PN – EN ISO 17025 – 2008 rok – Polskie Centrum Badań i Certyfikacji w Warszawie

**III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:**

- 1) 1995 rok – Stażysta w Zakładzie Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach
- 2) 1996 rok – Asystent w Zakładzie Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach
- 3) 1999 rok - Asystent w Pracowni Diagnostyki Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach
- 4) 2003 rok – Adiunkt w Pracowni Diagnostyki Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

5) 2007 rok – Adiunkt w Zakładzie Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

**IV. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

**1. Wojciech Kozdruń, Elżbieta Samorek – Salamonowicz, Hanna Czekaj: Łańcuchowa reakcja polimerazowa do różnicowania szczepów wirusa choroby Mareka. Bull. Vet. Inst. Puławy, 45, 5 - 10, 2001.**

Choroba Mareka jest limfoproliferacyjną chorobą drobiu charakteryzująca się występowaniem zmian nowotworowych w narządach wewnętrznych.

Czynnikiem etiologicznym jest wirus choroby Mareka (MDV) zaliczany do alfaherpeswirusów. Szczepy wirusa choroby Mareka zostały zaliczone do trzech serotypów: serotyp 1 – szczepy onkogene i ich atenuowane warianty; serotyp 2 – szczepy niepatogenne izolowane od kur; serotyp 3 – szczepy niepatogenne izolowane od indyków (HVT).

Diagnostyka choroby Mareka nie jest prosta, chociaż stwierdzone zmiany patologiczne mogą nasuwać podejrzenie jej wystąpienia. Od tych samych ptaków mogą być izolowane szczepy zjadliwe oraz szczepy szczepionkowe, a także apatogenne, które nie są odpowiedzialne za chorobę oraz zmiany nowotworowe.

Identyfikacja wyizolowanych szczepów jest trudna i możliwa tylko przy zastosowaniu próby biologicznej. Metody serologiczne są nieprzydatne. Wprowadzane już do praktyki metody biologii molekularnej pozwalają wykryć antygeny wirusowe lub kwasy nukleinowe.

Celem pracy była próba zastosowania PCR do diagnostyki choroby Mareka. Do badań użyto 18 terenowych szczepów wirusa choroby Mareka oraz 4 szczepy standardowe: zjadliwy szczep HPRS<sub>16</sub>, atenuowany szczep CVI 988 (serotyp 1 – MDV 1), apatogeny szczep SB1 (serotyp 2 – MDV 2) i niepatogeny szczep HVT FC 126 herpeswirusa indyczego (serotyp 3 – MDV

3). Wirus anemii zakaźnej (CAV) oraz wirus zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy (ILTV) były użyte jako kontrole swoistości PCR. Szczepy wirusowe namnażano w hodowli komórek fibroblastów zarodka kurzego (CEF), a następnie izolowano całkowity DNA. Zastosowano 3 pary starterów: dla genu A serotypu 1, dla sekwencji 132 bp serotypu 1 oraz dla genu A serotypu 3. PCR przeprowadzano w następujących warunkach: 94°C - 1 min (denaturacja), 55°C - 30 s (przyłączanie starterów), 72°C - 30 s (wydłużanie łańcucha) i 35 cykli. Produkty PCR analizowano po przeprowadzeniu elektroforezy w 2% żelu agarozowym przy 100 V/h. Produkt PCR o wielkości 314 bp uzyskano we wszystkich szczepach terenowych i szczepie standardowym HPRS<sub>16</sub> po zastosowaniu starterów dla genu A serotypu 1. Po zastosowaniu starterów dla sekwencji 132 bp serotypu 1, produkt PCR o wielkości 434 bp uzyskano we wszystkich szczepach terenowych i szczepie standardowym HPRS<sub>16</sub>, natomiast w przypadku szczepu atenuowanego CVI 988 uzyskano produkt PCR o wielkości 1033 bp. Zastosowanie starterów dla genu A serotypu 3 pozwoliło na amplifikację produktu o wielkości 436 bp tylko w przypadku szczepu niepatogennego HVT FC 126 (serotyp 3).

Przedstawione wyniki wskazują, że użyte pary starterów i zastosowana metoda PCR mogą być skutecznym narzędziem do identyfikacji DNA MDV w hodowlach komórkowych, a także do różnicowania szczepów MDV należących do serotypu 1 i 3 i różnicowania zjadliwych i atenuowanych szczepów w obrębie serotypu 1.

UDZIAŁ WŁASNY: zaprojektowanie starterów do PCR, optymalizacja parametrów PCR, wstępne przygotowanie tekstu publikacji – 70%

## **2. Wojciech Kozdruń: Zastosowanie PCR w diagnostyce chorób wirusowych drobiu. *Medycyna Wet.*, 59 (5), 393 – 395, 2003.**

Choroby wirusowe drobiu są ciągle największym zagrożeniem epizootycznym w produkcji drobiarskiej, a ponadto powodują znaczne straty eko-

nomiczne. W ich diagnostyce coraz częściej stosowane są metody biologii molekularnej, np. PCR – łańcuchowa reakcja polimerazowa.

W niniejszej pracy opisano praktyczne zastosowanie PCR w diagnostyce chorób wirusowych drobiu. Dotychczas w przypadku wirusa choroby Mareka odróżnienie szczepów zjadliwych od szczepów szczepionkowych możliwe było tylko za pomocą próby biologicznej. Metodą *in vitro* pozwalającą na różnicowanie szczepów jest jedynie PCR. Ze względu na ścisły związek DNA wirusa z DNA komórki gospodarza przeprowadzenie tej reakcji jest trudniejsze niż w przypadku innych wirusów. Jednakże po przeprowadzeniu reakcji amplifikacji, na podstawie wielkości otrzymanego produktu można określić przynależność serotypową szczepów, a także odróżnić szczepy zjadliwe od szczepów szczepionkowych w obrębie serotypu 1.

Kolejną jednostką chorobową jest białaczka kur (AL – Avian Leucosis). Obecnie coraz większego znaczenia epizootycznego nabiera białaczka typu J. Została opracowana reakcja amplifikacji z użyciem 4 par starterów, specyficznych dla różnych fragmentów genomu wirusa białaczki. Zastosowane kombinacje starterów pozwoliły różnicować poszczególne podgrupy wirusa białaczki kur, a także zakażenia endogenne od zakażeń egzogennych.

Metoda oparta na amplifikacji charakterystycznych fragmentów kwasów nukleinowych znalazła zastosowanie także w diagnostyce innych chorób wirusowych drobiu takich jak: zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza (choroba Gumboro), rzekomy pomór drobiu (choroba Newcastle), zakaźne zapalenie oskrzeli, zakażenia reowirusami, anemia zakaźna kurcząt, zakaźne zapalenie krtani i tchawicy.

Przedstawione w pracy omówienie nie wyczerpuje wszystkich możliwości stosowania techniki amplifikacji DNA w diagnostyce chorób wirusowych drobiu. Dodatkowo przeprowadzona analiza filogenetyczna uzyskanych produktów PCR pozwala różnicować szczepy wirusowe, a także określić ich pochodzenie i stopień podobieństwa.

UDZIAŁ WŁASNY: przygotowanie piśmiennictwa, przygotowanie tekstu publikacji – 100%

**3. Wojciech Kozdruń, Elżbieta Samorek – Salamonowicz, Hanna Czekaj: Budowa molekularna wirusa choroby Mareka. Medycyna Wet., 60 (11), 1164 – 1167, 2004.**

Herpeswirusy tworzą dużą i ważną grupę czynników zakaźnych, występującą u wielu gatunków zwierząt i ludzi. U drobiu najczęściej występującym herpeswirusem jest wirus choroby Mareka (MDV).

W niniejszej pracy przedstawiono budowę molekularną tego wirusa. Wirus ten posiada symetrię heksagonalną i średnicę około 150 – 160 nm. Nukleokapsyd o średnicy około 100 nm składa się z około 162 kapsomerów.

DNA wirusa MD jest liniową, dwuniciową cząsteczką o gęstości 1,706 g/ml. Masa cząsteczkowa genomu wynosi od 103 do 120 kDa. Genom szczepów zjadliwych składa się ze 166 000 – 184 000 bp, natomiast genom szczepów atenuowanych jest około 2000 – 3000 bp dłuższy.

Badania struktury molekularnej szczepów wirusa choroby Mareka wykazały znaczne różnice w budowie genomu pomiędzy poszczególnymi serotypami, a także pomiędzy poszczególnymi patotypami w obrębie serotypu 1.

W genomie wirusa choroby Mareka określono około 80 specyficznych genów, które zostały podzielone na trzy klasy zależnie od pełnionej funkcji.

Mimo wielu badań, złożona struktura genomu wirusa choroby Mareka nie została w pełni poznana. Wykazanie podobieństw w strukturze genomu wirusa choroby Mareka do genomu innych herpeswirusów, a także dalsze badania nad strukturą MDV pozwolą udoskonalić metody diagnostyki choroby Mareka, a także metody profilaktyki.

UDZIAŁ WŁASNY: przygotowanie piśmiennictwa, przygotowanie tekstu publikacji – 70%

**4. Wojciech Kozdruń, Elżbieta Samorek – Salamonowicz, Hanna Czekaj, Katarzyna Król: Opracowanie multi PCR do wykrywania szczepów wirusa choroby Mareka. Medycyna Wet., 61 (6), 711 – 714, 2005.**

Celem badań była próba opracowania parametrów multi PCR pozwalającego wykryć w jednej reakcji szczepy należące do dwóch różnych serotypów. Do badań użyto 3 szczepy (KRA, WL, BW) wyizolowane z przypadków terenowych choroby Mareka oraz 3 szczepy standardowe: szczep atenuowany Rispens CVI 988 (serotyp 1), zjadliwy szczep HPRS<sub>16</sub> (serotyp 1) oraz szczep herpeswirusa indyczego HVT FC 126 (serotyp 3). Totalny DNA izolowano z komórek fibroblastów zarodka kurzego (CEF) zakażanych badanymi szczepami. W reakcji amplifikacji zastosowano 3 pary starterów: dla sekwencji 132 bp, genu pp38 oraz genu A serotypu 3. Stosowano różne temperatury przyłączenia starterów, stężenia jonów Mg<sup>2+</sup>, liczbę cykli oraz koncentrację Taq polimerazy DNA. Jednoczesne zastosowanie starterów dla sekwencji 132 bp oraz genu A serotypu 3 pozwoliło odróżnić szczep serotypu 3 od szczepu atenuowanego serotypu 1. Wadą zastosowanego układu 2 par starterów było tworzenie produktów PCR o zbliżonej wielkości i niemożliwość rozróżnienia szczepu szczepionkowego należącego do serotypu 3 od szczepów zjadliwych serotypu 1. Z kolei jednoczesne użycie w reakcji amplifikacji par starterów dla sekwencji 132 bp oraz genu pp 38 pozwoliło jedynie na potwierdzenie przynależności zjadliwych szczepów wirusowych do serotypu 1.

UDZIAŁ WŁASNY: zaprojektowanie starterów do PCR, optymalizacja parametrów PCR, wstępne przygotowanie tekstu publikacji – 70%

**5. Wojciech Kozdruń, Tamas Mato, Vilmos Palya, Elżbieta Samorek – Salamonowicz, Katarzyna Król, Grzegorz Woźniakowski: Analiza filogenetyczna szczepów wirusa choroby Derzsy'ego izolowanych od gęsi w Polsce. Medycyna Wet., 64 (8), 1051 – 1054, 2008.**

Choroba Derzsy'ego występująca u gęsi jest wywoływana przez wirus należący do rodziny *Parvoviridae*, zwany wirusem choroby Derzsy'ego (DDV)

lub parwowirusem gęsim (GPV). W Polsce choroba Derzsy'ego jest notowana od przeszło 30 lat i nadal jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych w dotkniętych stadach. Celem pracy była charakterystyka molekularna szczepów wirusa choroby Derzsy'ego izolowanych z przypadków terenowych. Materiał do badań pochodził z 65 stad gęsi w wieku 1,5 – 6 tyg., w których podejrzewano występowanie choroby Derzsy'ego. Z narządów wewnętrznych gęsi wyosobniono 7 izolatów, które na podstawie zmian cytopatycznych w hodowli komórek fibroblastów zarodka gęsiego (GEF) oraz zmian embriopatologicznych w zarodkach gęsich zaliczono do szczepów wirusa choroby Derzsy'ego. W wyniku przeprowadzonej reakcji amplifikacji uzyskano jeden wyraźny prążek produktu PCR o wielkości 806 bp, charakterystyczny dla tego wirusa. Na podstawie analizy filogenetycznej badane szczepy GPV zaliczono do parwowirusów gęsich. W obrębie ich, szczepy zaliczono do 2 grup: grupa szczepów szczepionkowych i szczepów o niskiej zjadliwości oraz grupa szczepów terenowych. Wyliczony stopień podobieństwa między badanymi szczepami wynosił od 92,3% do 100%, a ze szczepami europejskimi od 91,3% do 99,5%. Na podstawie badań własnych można stwierdzić, iż polskie szczepy wirusa choroby Derzsy'ego różnią się nieco od siebie, lecz wszystkie mają pochodzenie europejskie.

UDZIAŁ WŁASNY: przygotowanie materiałów do badań, wykonanie niektórych badań molekularnych, wstępna analiza wyników – 60%

**6. Grzegorz Woźniakowski, Wojciech Kozdruń, Elżbieta Samorek – Salmonowicz, Katarzyna Król: Touchdown PCR for the detection of waterfowl parvoviruses. Bull. Vet. Inst. Puławy, 53, 3 – 7, 2009.**

Choroba Derzsy'ego jest zakaźną chorobą powodującą znaczne straty w masowej produkcji drobiu wodnego.

Czynnikiem etiologicznym jest wirus należący do rodzaju Dependovirus rodziny *Parvoviridae* nazywany wirusem choroby Derzsy'ego (DDV) lub parwowirusem gęsim (GPV).



Analiza białek kapsydu GPV wykazała, iż najważniejszym białkiem strukturalnym jest białko VP3, które stanowi około 80% wszystkich białek kapsydu.

Celem badań było wykrywanie sekwencji białka VP3 parwowirusa gęsiego metodą PCR.

Do badań użyto 16 terenowych szczepów parwowirusa gęsiego oraz DNA wyizolowane ze standardowego szczepu parwowirusa kaczkki piżmowej (MDPV). Zastosowano Touchdown PCR do wykrywania regionu kodującego białko VP3.

W przypadku wszystkich szczepów GPV i szczepu MDPV stwierdzono obecność specyficznego produktu PCR o wielkości 1.604 bp. Określono także specyficzność, czułość i wydajność reakcji. W celu wyeliminowania niespecyficznych reakcji zastosowano reakcję Touchdown PCR. Dodatkowo, dla poprawienia specyficzności i wydajności reakcji do mieszaniny reakcyjnej dodano betainę.

Przeprowadzona optymalizacja Touchdown PCR pozwoliła na identyfikację zarówno GPV jak i MDPV.

UDZIAŁ WŁASNY: przygotowanie materiałów do badań, korekta redakcyjna tekstu publikacji – 40%

**7. Grzegorz Woźniakowski, Wojciech Kozdruń, Elżbieta Samorek – Salmonowicz: Genetic variance of Derzsy's disease strains isolated in Poland. J. Mol. Genet. Med., 3 (2), 1 – 8, 2009.**

Celem pracy była ocena zmienności genetycznej szczepów wirusa choroby Derzsy'ego wyizolowanych od gęsi z przypadków terenowych choroby Derzsy'ego w Polsce. Sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe białek VP1, VP2 i VP3 polskich szczepów GPV były porównywane z innymi szczepami wcześniej izolowanymi na Węgrzech, Niemczech, Francji, Chinach i Tajwanie. Zmienność genetyczna w sekwencjach aminokwasowych polskich szczepów GPV była niska i wyniosła 5% we wszystkich analizowanych se-

kwencjach. Znaczne różnice w sekwencjach aminokwasowych stwierdzono pomiędzy polskimi szczepami GPV, a szczepem parwowirusa kaczki piżmowej. Przeprowadzone badania wykazały, że szczepy GPV izolowane w Polsce i szczepy izolowane wcześniej na Węgrzech i we Francji mają wspólne pochodzenie.

UDZIAŁ WŁASNY: przygotowanie materiałów do badań, korekta redakcyjna tekstu publikacji – 40%

**8. Grzegorz Woźniakowski, Wojciech Kozdruń, Elżbieta Samorek- Salamowicz: Detection and differentiation of waterfowl parvoviruses by PCR. Bull. Vet. Inst. Puławy, 54, 283 – 288, 2010.**

Celem prezentowanej pracy było zastosowanie metody PCR do wykrywania i różnicowania parwowirusa gęsiego (GPV) i parwowirusa kaczki piżmowej (MDPV) w wątrobie, śledzionie i kale zakażonych gęsi oraz ściółce z zakażonych ferm.

Celem poprawy specyficzności, wydajności i ograniczenia inhibicji reakcji PCR w próbkach kału i ściółki zastosowano profil termiczny „Touchdown PCR” oraz dodatek betainy. Dla zweryfikowania metody PCR zastosowano izolację wirusa w hodowli komórek fibroblastów zarodka gęsiego (GEF). Obecność efektu cytopatycznego widocznego w zakażonych hodowlach posłużyła do wykrywania obu wirusów, ale nie do ich identyfikacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań został opracowany PCR do szybkiej detekcji GPV i MDPV w próbkach narządów wewnętrznych, kału oraz ściółki.

UDZIAŁ WŁASNY: przygotowanie materiałów do badań, korekta redakcyjna tekstu publikacji – 40%

**9. Kozdruń W.: „Syndrom krwotocznego zapalenia nerek i jelit”, W: „Choroby drobiu” pod redakcją prof. dr hab. Michała Mazurkiewicza. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, wyd. 2, Wrocław, 2011, 485**

UDZIAŁ WŁASNY: przygotowanie piśmiennictwa, przygotowanie tekstu – 100%

**10. Kozdruń W.: „Zakażenia cirkowirusami gąsiąt i kacząt”, W: „Choroby drobiu” pod redakcją prof. dr hab. Michała Mazurkiewicza. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, wyd. 2, Wrocław, 2011, 486**

UDZIAŁ WŁASNY: przygotowanie piśmiennictwa, przygotowanie tekstu – 100%

#### **V. Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze:**

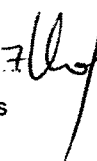
1. Badania nad występowaniem choroby Mareka u indyków rzeźnych
2. Opracowanie testu ELISA do wykrywania zakażeń wirusem choroby Mareka
3. Zastosowanie testu immunoblot do wykrywania zakażeń wirusem choroby Mareka
4. Elektroforetyczna analiza szczepów wirusa choroby Mareka
5. Opracowanie i wdrożenie w praktyce zestawów do diagnostyki zakażeń wirusem choroby Mareka, reowirusami, adenowirusami oraz do oceny statusu immunologicznego kur
6. Badania nad serokonwersją po szczepieniu przeciwko chorobie Derzsy'ego u różnych ras gęsi
7. Wpływ zakażenia reowirusami na skuteczność szczepień przeciwko chorobie Mareka
8. Badania nad charakterystyką szczepów reowirusów izolowanych z przypadków ostrej reowirozy kurcząt

9. Opracowanie PCR do wykrywania i różnicowania szczepów wirusa choroby Mareka
10. Wstępne badania nad charakterystyką szczepów wirusa choroby Mareka o podwyższonej patogenności
11. Opracowanie PCR do diagnostyki zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy
12. Badania nad zastosowaniem Bioreaktora Celligen Plus do namnażania wirusa choroby Derzsy'ego w hodowli komórek fibroblastów zarodka gęsiego (GEF)
13. Badania nad zastosowaniem cytometrii przepływowej w diagnostyce chorób wirusowych drobiu
14. Badania nad przypadkiem cholangiocarcinomy u gęsi
15. Badania nad czynnikiem etiologicznym wywołującym zmiany nowotworowe u gęsi
16. Opracowanie i wdrożenie metody multipleks PCR do diagnostyki i różnicowania szczepów wirusa choroby Mareka
17. Badania nad pierwszym w Polsce przypadkiem syndromu Alabama Red Leg u kurcząt brojlerów
18. Opracowanie i wdrożenie metody multipleks PCR do diagnostyki chorób wirusowych drobiu wodnego
19. Charakterystyka szczepów wirusa choroby Mareka (analiza filogenetyczna, analiza restrykcyjna)
20. Charakterystyka szczepów wirusa choroby Derzsy'ego (analiza filogenetyczna, analiza restrykcyjna)
21. Badania epizootyczne nad występowaniem zakażeń wirusem choroby Mareka w Polsce
22. Badania epizootyczne nad występowaniem zakażeń wirusowych u gęsi w Polsce

23. Badania nad występowaniem zakażeń wirusem Zachodniego Nilu w populacji ptaków dzikich w Polsce

**ZESTAWIENIE CAŁOŚCI DOROBKU NAUKOWEGO**

Sumaryczny impact factor	10,786
Liczba cytowań wg. Web of Science	38
H - index	3
Prace przeglądowe	43
Prace doświadczalne	41
Doniesienia naukowe	112
Współautorstwo rozdziałów w monografii	25
Autorstwo rozdziałów książki	2
Instrukcje laboratoryjne	2
Współorganizacja konferencji naukowych	13
Nagrody i patenty	17
Opinie i raporty	8
Przynależność do organizacji	6
Współpraca krajowa i zagraniczna	25
Referaty	9
Projekty badawcze	14
Wyjazdy krajowe	47
Wyjazdy zagraniczne	15

2012.03.27   
data i podpis