

Dr nauk wet. Katarzyna Domańska-Blicharz  
Zakład Chorób Drobiu  
Państwowy Instytut Weterynaryjny-  
-Państwowy Instytut Badawczy  
Al. Partyzantów 57  
24-100 Puławy  
tel.: 81 889 30 67  
e-mail: domanska@piwet.pulawy.pl

## **AUTOREFERAT**

### **opis dorobku i osiągnięć naukowych**

## Spis treści

I. Życiorys naukowy	
A. Wykształcenie	2
B. Doświadczenie zawodowe	2
II. Osiągnięcia wynikające z art. 16 rozdz. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.)	
A. Jednotematyczny cykl publikacji pt. „Charakterystyka molekularna krajowych szczepów koronawirusów ptasich i ocena sytuacji epidemiologicznej w kraju”	3
B. Ważniejsze osiągnięcia w zakresie innych prowadzonych badań	
- przed doktoratem	9
- po doktoracie	11
C. Podsumowanie dorobku naukowego	16
D. Realizowane projekty naukowe	16
E. Odbyte staże, szkolenia i kursy	17
F. Nagrody i wyróżnienia	17
G. Pozostałe informacje	18

## Życiorys naukowy

### A. Wykształcenie

1989-1994	Studia magisterskie na kierunku biotechnologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
1994	Magister biotechnologii ze specjalnością biologia molekularna Praca magisterska pt. „Subkomórkowa lokalizacja fosfokinazy kazeinowej w komórkach drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ” promotor prof. dr hab. Nikodem Grankowski
2003	Doktor nauk weterynaryjnych nadany uchwałą Rady Naukowej PIWet-PIB w Puławach z dnia 17.12.2003 Praca doktorska pt. „Występowanie rakotwórczych N-nitrozoamin w krajowych przetworach mięsnych” promotor prof. dr hab. Bogdan Kowalski, recenzenci: prof. dr hab. Piotr Przybyłowski, prof. dr hab. Jan Żmudzki

### B. Doświadczenie zawodowe

1994-1996	Stażysta w Pracowni Ochrony Radiologicznej i Badań Izotopowych, PIWet-PIB
1996-1999	Asystent w Pracowni Ochrony Radiologicznej i Badań Izotopowych, PIWet-PIB
1999-2003	Asystent w Zakładzie Chorób Drobiu, PIWet-PIB
Od 01.01.2004	Adiunkt w Zakładzie Chorób Drobiu, PIWet-PIB

Po ukończeniu studiów na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej na kierunku biotechnologia, w roku 1994 podjęłam pracę w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym, początkowo w Pracowni Ochrony Radiologicznej i Badań Izotopowych, a od 1 czerwca 1999 r. w Zakładzie Chorób Drobiu.

W Pracowni Ochrony Radiologicznej i Badań Izotopowych zajmowałam się przede wszystkim analityką i toksykologią lotnych N-nitrozoamin. W tym czasie zapoznałam się z problematyką dotyczącą związków N-nitrozowych i opanowałam podstawowe techniki instrumentalne niezbędne w badaniach N-nitrozoamin (spektrofotometria, chromatografia gazowa z detektorem energii termicznej TEA, spektrometria masowa). Aktywnie uczestniczyłam w badaniach nad toksycznością rtęci i kadmu, określając wpływ zatrucia tymi metalami na niektóre parametry biochemiczne (glutation, dysmutaza ponadtlenkowa, S-transferaza glutationowa) tkanek organizmu szczura. Uczestniczyłam również w badaniach w ramach grantu pod tytułem „Wpływ wybranych dodatków żywieniowych na przyswajanie, retencję i eliminację kadmu w organizmie szczura” (Grant KBN 4PO4D 091 14).

Tematyka pracy naukowo – badawczej, którą podjęłam w Zakładzie Chorób Drobiu dotyczyła aktualnych problemów zdrowotnych drobiu w hodowli krajowej wywołanych przez czynniki zakaźne. Moje zainteresowania koncentrowały się głównie na wdrażaniu metod biologii molekularnej do diagnostyki i badań epidemiologicznych chorób zakaźnych drobiu, w tym zwłaszcza o etiologii wirusowej jak zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza (choroba

Gumboro), influenza ptaków, rzekomy pomór drobiu, zakaźne zapalenie oskrzeli, zakażenia reowirusowe, ale również zakażeń mykoplazmami drobiu (*Mycoplasma gallisepticum*-MG, *Mycoplasma synoviae*-MS, *Mycoplasma meleagridis*-MM).

Uczestnicząc w tych pracach kontynuowałam jednocześnie badania nad doktoratem a otrzymane wyniki stały się podstawą mojej pracy doktorskiej pt. „Występowanie rakotwórczych N-nitrozoamin w krajowych przetworach mięsnych”, którą obroniłam w listopadzie 2003 r.

**I. Osiągnięcia wynikające z art. 16 rozdz. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.)**

**A. Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem „Charakterystyka molekularna krajowych szczepów koronawirusów ptasich i ocena sytuacji epidemiologicznej w kraju”.**

Cykl ten obejmuje 4 publikacje w czasopiśmie z bazy JCR o łącznym IF=3,382; punkty MNiSW=85. Oświadczam, że w/w publikacjach opisane badania były moją autorską koncepcją, we wszystkich byłam głównym autorem tekstu i w zdecydowanej większości byłam również głównym wykonawcą badań. Swój udział w powstaniu tych publikacji oceniam na 70-80% (w zdecydowanej większości byłam również także głównym wykonawcą badań).

1. Domańska-Blicharz K., Minta Z., Śmietanka K., Porwan T.: New variant of IBV In Poland, Veterinary Record 2006, 158, 808
2. Domanska-Blicharz K., Smietanka K., Minta Z.: Molecular studies on infectious bronchitis virus isolated in Poland, Bull. Vet Inst Pulawy, 2007, 51, 449-452
3. Domańska-Blicharz K., Seroka A., Lisowska A., Tomczyk G., Minta Z.: Turkey coronavirus in Poland - preliminary results, Bull Vet Inst Pulawy, 2010, 55, 473-477
4. Domanska-Blicharz K., Lisowska A., Jatczak J., Mamczur J., Minta Z.: D1466-like genotype of infectious bronchitis virus responsible for a new epidemic in chickens in Poland, Veterinary Record 2012; 171: 351-354

Ponadto do cyklu wliczyłabym również pracę w czasopiśmie spoza bazy JCR (mój wkład w jej powstanie oceniam na 80%).

5. Domanska-Blicharz K., Lisowska A., Jatczak J., Mamczur J., Minta Z.: Występowanie wariantów D1466-like wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli u kur w Polsce, Medycyna Wet. 2013, 69: 43-46

Oświadczenia współautorów wszystkich prac zostały załączone.

## **WSTĘP**

Koronawirusy (Coronavirus - CoV) są odpowiedzialne za szerokie spectrum chorób różnorodnych gatunków zwierząt i ludzi.. Zdecydowana większość CoV ptaków należy do rodzaju *Gammacoronavirus*, podrodziny *Coronavirinae*, rodziny *Coronaviridae*, rzędu *Nidovirales* wraz z koronawirusem SW1 wyizolowanym od białugi. W roku 2011 w oficjalnej

systematyce wirusów Międzynarodowy Komitet ds. Taksonomii Wirusów pojawił się dodatkowy rodzaj *Deltacoronavirus* zidentyfikowany u niektórych ptaków azjatyckich. Do najważniejszych przedstawicieli *Gammacoronavirus* zaliczane są wirusy zakaźnego zapalenia oskrzeli (Infectious Bronchitis Virus - IBV) oraz koronawirusy indyków (Turkey Coronavirus – TCoV).

Wirus IB to czynnik etiologiczny wysoce zaraźliwej choroby kur znanej pod nazwą zakaźnego zapalenia oskrzeli (Infectious Bronchitis – IB), który może replikować w komórkach nabłonkowych nie tylko układu oddechowego lecz także moczowo-płciowego oraz pokarmowego. Genom IBV to pojedyncza nić RNA o wielkości ok. 27 000 par zasad (pz) zawierająca na obu końcach (3' i 5') tzw. regiony nie ulegające translacji (UTR). Około 2/3 genomu koduje wirusową replikazę czyli polimerazę RNA zależną od RNA, natomiast pozostała 1/3 koduje m.in. cztery główne białka strukturalne: otoczki E, nukleokapsydu N, membranowe M oraz tworzące wypustki S. W strukturze białka S można wyróżnić dwa podregiony, region S2 zakotwicza wypustkę w wirusowej membranie, natomiast region S1 tworzy zewnętrzną część i jako pierwszy reaguje z receptorem w komórce gospodarza. W tym regionie znajdują się wszystkie najważniejsze epitopy antygenowe indukujące powstawanie przeciwciał neutralizujących i to właśnie białko S1 determinuje serotyp/genotyp/wariant IBV. Dotychczas poznano ponad 30 serotypów, różniących się znacząco w budowie białka S1 (różnice rzędu 50%). Różnorodność wirusów, zarówno pod względem patotypu, tropizmu tkankowego czy właściwości antygenowych przypisuje się kilku czynnikom. Z jednej strony biologia wirusa tzn. struktura jego genomu (wielkość, skład chemiczny) czy brak właściwości naprawczych wirusowej replikazy predysponuje do występowania zarówno spontanicznych mutacji (zmiany pojedynczych nukleotydów - nt) czy rekombinacji (wymiany większych fragmentów genomu) pomiędzy różnymi wirusami i powoduje ich dużą labilność. Z kolei z drugiej strony ciągły wzrost pogłowia drobiu (zagęszczenie), sposób jego chowu (intensyfikacja), wymiana handlowa i powszechne stosowanie szczepionek (presja immunologiczna) dodatkowo stwarzają warunki do powstawania nowych wariantów wirusowych.

Aż do późnych lat 70-tych ubiegłego wieku wydawało się, że serotyp Massachusetts (Mass) IBV jest jedynym serotypem obecnym w Europie wywołującym zakaźne zapalenie oskrzeli. Jednak badania przeprowadzone w kolejnych latach w Wielkiej Brytanii i Holandii wykazały obecność szczepów IBV należących do przynajmniej 4 innych serotypów, które wywoływały zachorowania u ptaków uodparnianych szczepionkami typu Mass. Serotypy te to D207 (znany również jako D274), D212 (również znany jako D1466) oraz D3896 i D3128. Rozwój i dostęp technik izolacji wirusa i jego serotypizacji umożliwiły identyfikację kolejnych wariantów, jednak większość z nich miało niewielkie znaczenie epidemiologiczne i wykrywane były zwykle przez krótki okres czasu. Niektóre z tych wariantów miały większe znaczenie i powodowały problemy zdrowotne w postaci częstych ognisk choroby, np. wariant B1648 odpowiedzialny za problemy nerkowe na przełomie lat 80/90-tych ubiegłego wieku był głównym czynnikiem zachorowań kurcząt w krajach Benelux'u. Jednak największe straty w europejskiej produkcji drobiarskiej powodował wariant 793/B (znany także jako 4/91 lub CR88), który pojawił się na początku lat 90-tych. Bardzo szybko pojawiły się żywe, atentowane szczepionki zawierające szczepy typu 793/B-like skutecznie zabezpieczające

ptaki przeciwko temu wariantowi IBV. Obecnie jego występowanie notowane jest w wielu częściach świata, co ciekawe do tej pory nie stwierdzono go w USA.

Drugi z przedstawicieli rodzaju *Gammacoronavirus* - koronawirus indyków to czynnik powodujący ostre infekcje jelitowe (enteropatie) u indyków w każdym wieku. Choroba po raz pierwszy została opisana przez Petersona i Hymasa w 1951r pod nazwą najpierw gorączka błotna (Mud Fever), później choroba niebieskiego grzebienia lub monocytoza (Bluecomb Disease, Avian Monocytosis), natomiast identyfikacji wirusa, który ją wywoływał dokonano w 1973r. Choroba rozpowszechniona była głównie w Ameryce Północnej oraz Australii powodując przede wszystkim straty ekonomiczne wynikające ze zmniejszonych przyrostów masy ciała i wzrostu zużycia paszy u starszych ptaków, natomiast u młodych ptaków ze zwiększonych upadków. W 2001 roku pojawiły się pierwsze doniesienia na temat TCoV izolowanych od indyków w Europie (Wielka Brytania i Włochy), a także Ameryce Południowej (Brazylia) i Afryce (Egipt). Badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii w latach 2003 -2005 wykazały, że ponad 32% badanych stad indyków było zakażonych TCoV. Z kolei badania francuskie wykazały obecność TCoV w 37% stadach indyków z objawami enteropatii.

TCoV współuczestniczą w wywoływaniu zespołów chorobowych dotyczących jelit. Takim wieloczynnikowym syndromem chorobowym jest zespół zapalenia jelit indycząt (PEC - poult enteritis complex). Powodująca duże straty ekonomiczne choroba manifestuje się głównie zahamowaniem rozwoju ptaków i zwiększonym zużyciem paszy. W przypadkach o nasilonym przebiegu obserwuje się również zaburzenia w funkcjonowaniu układu immunologicznego i zwiększone upadki, które w zależności od wieku ptaków mogą sięgać nawet 50-96% (Poult Enteritis Mortality Syndrome - PEMS czyli syndrom śmiertelności na tle zapalenia jelit indycząt). Barnes and Guy oszacowali, że w USA w okresie wiosny i jesieni u 60-90% stad indyków obserwowane są objawy PEC. Rola większości wirusów jelitowych w etiologii PEC pozostaje nadal niejasna, jednak za najważniejsze uznaje się koronawirusy indyków i astrowirusy indyków (turkey astrovirus – TAsTV).

Oba wirusy mają podobną strukturę genomu a homologia sekwencji nukleotydowej (nt) całego genomu pomiędzy nimi wynosi ok. 86%. Jednak największe różnice dotyczą genu S z podobieństwem nt na poziomie jedynie ok. 32%.

W Polsce badania nad koronawirusami ptaków dotyczyły głównie IBV. Pierwszej identyfikacji zakażeń IBV dokonano badaniem serologicznym w 1967 r. W późniejszym okresie, a szczególnie w połowie lat osiemdziesiątych rejestrowano liczne przypadki spadków nieśności w stadach kur towarowych spowodowane zakażeniem IBV typu Mass. Dalsze rozprzestrzenianie się choroby częściowo zahamowało wprowadzenie na szeroką skalę szczepień kur niosek przeciwko IB. W końcu lat osiemdziesiątych wykazano, że IB było jedną z przyczyn zwiększonych strat w produkcji także kurcząt brojlerów. Notowane wówczas zachorowania u kurcząt charakteryzowały się objawami ze strony układu oddechowego, zmniejszeniem przyrostów masy ciała i zwiększoną śmiertelnością. Pierwsze przypadki zachorowań manifestujące się głównie uszkodzeniem nerek (ang. nephritis) u kurcząt brojlerów stwierdzono w 1994 r. Wówczas notowane przypadki dotyczyły stad nieszczepionych. W późniejszym okresie, począwszy od 1997 r. przypadki zapalenia nerek na tle IBV notowano także u ptaków szczepionych. Jak wykazały dalsze badania, zachorowania

te wywoływały szczepy 793/B-like. Natomiast nie prowadzono dotychczas żadnych badań nad występowaniem w Polsce koronawirusów indyków.

## **CEL PRACY**

- ✓ Wdrożenie technik biologii molekularnej do wykrywania i charakterystyki molekularnej różnych genotypów IBV oraz TCoV
- ✓ Ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania zakażeń tymi wirusami w krajowej populacji drobiu
- ✓ Badania nad patogennością wybranych TCoV

## **OMÓWIENIE PRACY**

Podstawą w kontroli zakażeń IBV jest rozpoznanie jaki typ/wariant wirusa wywołuje problem zdrowotny na danym fermie/terenie. Tradycyjną metodą klasyfikacji szczepów IBV na różne serotypy jest test neutralizacji wirusa (ang. virus neutralisation - VN) oraz test tzw. antygen capture-ELISA. Jednakże przy tych testach wymagana jest czasochłonna i kosztowna izolacja IBV. Z kolei identyfikacja wymaga użycia licznych serotypów IB czy posiadania przeciwciał monoklonalnych, a ze względu na reakcje krzyżowe interpretacja wyników jest problematyczna. Rozwój i szeroki dostęp technik biologii molekularnej sprawił, że coraz częściej w odniesieniu do różnicowania IBV stosuje się termin genotyp zamiast serotyp. Przynależność do określonego genotypu określa się na podstawie sekwencjonowania genu S, a szczególnie jego regionu S1. Podczas badań przetestowano kilka metod wykrywania zakażeń CoV ptaków, początkowo skupiając się jedynie na IBV potem rozszerzając je również o badania nad TCoV. Do wykrywania koronawirusów ptaków zastosowano 2 metody: konwencjonalny, jednoprobówkowy RT-PCR i RT-PCR w połączeniu z nested-PCR (2). W konwencjonalnym RT-PCR użyte startery miały sekwencje komplementarne do konserwatywnego regionu 3'UTR, natomiast w RT-nested PCR komplementarne do konserwatywnego fragmentu genu nukleokapsydu (N). Pomimo, iż metoda RT-nested PCR okazała się 1000x czulsza w wykrywaniu genomu IBV to jednak podwyższone ryzyko kontaminacji przy wykonywaniu tej metody a także fakt, że nie wykrywała zakażeń TCoV zdecydowano do dalszych badań stosować konwencjonalną metodę RT-PCR (3). W późniejszym czasie zastąpiono ją czulszą metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym (rRT-PCR) ukierunkowaną na wykrywanie konserwatywnego fragmentu 5'UTR obecnego zarówno w genomie IBV jak i TCoV, którą z powodzeniem stosowano do wykrywania szczepów IBV należących do różnych genotypów jak i TCoV (4, 5).

Dodatkowo, zgromadzono ponad 30 par starterów umożliwiających określenie sekwencji nt regionu S1. Tak duża ilość starterów wynika z faktu zmienności tego genu i tak jedna para starterów amplifikująca fragment genu S genotypu D274 nie daje żadnego produktu w przypadku szczepu IBV innego genotypu. Użycie tych starterów pozwoliło zidentyfikować po raz pierwszy w kraju genotyp QX IBV. Zachorowania, które opisałam w publikacji (1) wystąpiły na początku 2004 r. na wielkotowarowej fermie brojlerów składającej się z 3 kurników po 30 000 kurcząt rasy Ross. Od 5-tego tygodnia życia kurcząt obserwowano nieznaczne zwiększenie upadków trwające 3-4 dni, które nie przekraczało 1%. Po tym czasie sytuacja uległa normalizacji. Ok. 70% upadków dotyczyło kurcząt dużych, u których sekcynie stwierdzano znaczne odwodnienie, zanik narządów limfatycznych (grasicy,

torby Fabrycjusza, śledziona), przekrwienie wątroby, a u pojedynczych sztuk zapalenie brodawek żołądka gruczołowego. Jednakże najpoważniejsze zmiany dotyczyły nerek, w których stwierdzano zwyrodnienie, przekrwienie i znaczne, 2-3 krotne powiększenie. Przeprowadzona przeze mnie charakterystyka molekularna pozwoliła wykazać 98,9% homologię nt fragmentu genu S1 izolatu terenowego z sekwencją chińskiego izolatu QX IBV dostępną wówczas w GeneBank'u (1).

W kolejnej pracy (2) dokonałam charakterystyki molekularnej pozostałych izolatów IBV znajdujących się w archiwum Zakładu Chorób Drobiu. Porównując sekwencję nt fragmentu genu S1 dziewięciu izolatów IBV wykazałam, że większość z nich wykazuje większe podobieństwo do IBV typu 793/B (trzy izolaty z 1997 r., jeden z 1999 r., jeden z 2004 r. i jeden z 2005 r.), dwa kolejne do chińskiego wariantu QX-like, natomiast jeden izolat z 1997 r. tworzył odrębną gałąź drzewa filogenetycznego a jego homologia nt do pozostałych typów IBV wynosiła 63,7-81,5%. W późniejszym już czasie, po ukazaniu się publikacji zaktualizowano GenBank i sekwencja tego izolatu była najbardziej zbliżona do atypowego wariantu wykrytego w na terenie Federacji Rosyjskiej w 1999 r. (2). Na podstawie prowadzonego przeze mnie monitoringu sytuacji epidemiologicznej zakażeń IBV w krajowej populacji kur można stwierdzić, że najczęstsze problemy zdrowotne związane z IB w ostatnich latach powoduje wariant chiński QX. Po raz pierwszy zidentyfikowany w Chinach w 1996 roku, rozprzestrzenił się bardzo szybko na teren Europy, w 2003 najpierw pojawił się w Niemczech, następnie w Holandii, Belgii, Francji, Włoszech, Danii, Słowenii, Wielkiej Brytanii i Hiszpanii. Rozprzestrzenia się także na inne rejony świata, gdyż wirus QX zdiagnozowany został w Izraelu a niedawno zmutowany QX-like również w krajach Ameryki Łacińskiej. Nie jest znany mechanizm rozprzestrzeniania się wirusa IB i chociaż w ostatnich latach zidentyfikowano wirusy „IB-like” u dzikich ptaków, raczej wydaje się mało prawdopodobne by miały one taki udział w rozprzestrzenianiu jak w przypadku grypy ptaków. Przyczyną upatruje się raczej w międzynarodowym komercyjnym obrocie drobiem. Interesujące jest również dlaczego akurat ten wariant IBV zdołał się tak szybko rozprzestrzenić i powoduje takie problemy zdrowotne u kur. Należy wspomnieć, że badania monitoringowe zakażeń IBV w krajowych stadach kur są stale przeze mnie kontynuowane i ostatnie wyniki wskazują na zmiany w obrębie sekwencji nt genu S1 IB QX-like wymuszające zastosowanie do ich identyfikacji nowych par starterów. W prowadzonych badaniach nie stwierdzono innych typów IBV występujących na terenie Europy jak It-02 czy wcześniej zidentyfikowanego w Polsce IBV 624I.

W ostatnim czasie, dzięki rozszerzeniu metod RT-PCR/sekwencjonowanie zidentyfikowano szczep IBV D1466-like do tej pory w Polsce nie wykrywany (4, 5). Próbkę dodatkowo w metodzie wykrywającej wszystkie typy IBV sprawdzano w kolejnych reakcjach konwencjonalnego RT-PCR: i) tzw. uniwersalnej, w której użyte startery miały sekwencje komplementarne do regionu białka S1 wariantów IBV takich jak QX, 793/B, Mass czy It-02 oraz ii) tzw. D1466, w której startery miały sekwencje komplementarne do genu białka S1 wariantów typu D1466. Różnicowanie na poszczególne warianty uzyskiwano poddając sekwencjonowaniu (w Zakładzie Chorób Drobiu lub w Genomedzie Sp. z o.o., Warszawa) otrzymane w w/w reakcjach produkty. Od listopada 2011 do Zakładu Chorób Drobiu coraz liczniej zgłaszane były przypadki kur niosek z zaburzeniami w nieśności (opóźnienie lub spadek nieśności oraz pogarszanie jakości jaj). U zakażonych ptaków najczęściej



obserwowano zmiany anatomiczno-patologiczne dotyczące jajnika i jajowodu (znacznego stopnia niedorozwój), niekiedy także w nerkach (łącznie z obecnością złogów moczanów). W późniejszym okresie (od lutego 2012) otrzymywano także próbki od broilerów z objawami zapalenia nerek, a śmiertelność w stadzie sięgała 20%. W dostarczonych próbkach wykrywano prąжки w obu zastosowanych metodach RT-PCR, które po zsekwencjonowaniu zidentyfikowano jako wirusy IB należące do typu D1466 oraz 793/B. Do maja 2012 r. przebadano łącznie 53 stada kur i kurcząt brojlerów, z czego w 18 (34%) przypadkach stwierdzono zakażenie genotypem D1466 (w 14 stadach kur niosek i 4 stadach kurcząt brojlerów). Przeprowadzony wywiad epidemiologiczny wykazał, że w prawie wszystkich stadach prowadzono prawidłowy program immunoprofilaktyczny przeciwko IB polegający na kilkakrotnym podaniu żywych atenuowanych szczepionek zawierających szczepy należące zarówno do typu Mass, D274 oraz 793/B. Dodatkowo, w stadach kur niosek przed okresem nieśności stosowano inaktywowaną szczepionkę zawierającą szczepy należące do typu Mass i D274. Taki program szczepień był dotąd wystarczający przy zagrożeniach wynikających z infekcji szczepami IBV typu QX, 793/B czy It-2. Produkty RT-PCR pochodzące z 6 przypadków poddano sekwencjonowaniu i analizie filogenetycznej. Wszystkie polskie sekwencje wykazywały największą homologię do holenderskich szczepów D1466 oraz V1397. Przy czym sekwencja polskich szczepów różniła się również między sobą gdyż homologia między nimi wynosiła 86,2-99,5%: trzy z sześciu analizowanych sekwencji były w 99,5% podobne i tworzyły podgrupę I, natomiast trzy kolejne (homologia 90,1-96,1%) podgrupę II (Ryc. 2). Podobieństwo wirusów z podgrupy I i II do szczepu D1466 wynosiło 99,0-99,5% i 86,8-91,7% , natomiast do szczepu V1397 odpowiednio: 93,8-94,3% i 90,9-93,8%. Z kolei podobieństwo do północnoamerykańskich szczepów DE072 i GA98 wynosiło 67,8-79,3%. Szczep należący do genotypu D1466-like jest szczepem nietypowym, ponieważ homologia jego białka S1 do pozostałych znanych europejskich genotypów jest bardzo niska. Po raz pierwszy wyizolowano go w 1979 r. w Holandii i bardzo szybko znalazł on zastosowanie w szczepionce, niestety w Polsce obecnie nie zarejestrowanej. Szczepami najbardziej podobnymi do genotypu D1466-like są północnoamerykańskie warianty DE072 (ang. Delaware 072) po raz pierwszy zdiagnozowany w 1992 r. oraz GA98 (ang. Georgia 98) zdiagnozowany w 1998 r.

Kolejnym aspektem moich badań były koronawirusy indyków. Spośród próbek wymazów kałowych zgromadzonych od 136 stad indyków w latach 2008-2009, w 7,3% stwierdzono obecność TCoV (3). Kontynuowane w dalszym ciągu badania pozwoliły na korektę tej liczby, dotychczas (luty 2013) obecność TCoV zidentyfikowano w ok. 9% badanych stad. Taka częstość występowania okazała się niższa niż we Francji (35%), Wielkiej Brytanii (32%) i Brazylii (82%). Z kolei w Stanach Zjednoczonych w ostatnich latach nie zidentyfikowano zakażeń TCoV, podobnie jak w Niemczech. W omawianej pracy dokonano również oceny siewstwa TCoV przez zakażone indyki oraz zawartości wirusa w poszczególnych narządach i tkankach. W tym celu opracowano ilościową metodę rRT-PCR (qrRT-PCR), która posłużyła do określenia ilości kopii RNA w wymazach i tkankach eksperymentalnie zakażonych indyków. Oznaczono, że w wymazach z kloaki wirus obecny był od 5 dpi do 14 dpi, w 21 dpi nie wykryto RNA TCoV. Podobny przebieg wydalania wirusa, od 5 do 14 dpi obserwował również Goma *et al.* Badając obecność wirusa w różnych odcinkach jelit zakażonych indyczątkami wykazałam, że wirus utrzymuje się z upływem czasu

głównie w jelicie ślepy, co może mieć wartość diagnostyczną, gdyż nawet 21 dni po zakażeniu ilość kopii wirusowego RNA jest znaczna (niemal  $10^5$  RNA). W innych publikacjach utrzymywanie się wirusa w jelitach było różne i trwało, w zależności od użytego do zakażenia TCoV od 2 do 7 tygodni. Takie rozbieżności wynikać mogą z różnej patogenności użytego w doświadczeniu szczepu wirusowego, jego dawki a także wieku i rasy użytych w doświadczeniu indyków. Z przeprowadzonych badań zaskakujący był fakt, że 1-dniowe kurczęta SPF użyte w doświadczeniu jako ptaki narażone na zakażenie przez kontakt okazały się wrażliwe na infekcję TCoV. W wymazach z kloaki RNA TCoV wykrywano u nich od 7 do 21 dpi (koniec doświadczenia). U kurcząt obserwowałam również kliniczne objawy enteropatii jak biegunka od 10 dpi. Śladowe ilości wirusowego RNA wykrywano także w nerkach, wątrobie i torbie Fabrycjusza. Fakt patogenności wirusa TCoV u kurcząt wymaga dodatkowych badań.

## **WYNIKI**

Prowadzone przeze mnie badania nad koronawirusami ptaków umożliwiły:

- ✓ Udoskonalenie warsztatu diagnostycznego zakaźnego zapalenia oskrzeli i zakażeń koronawirusami indyków
- ✓ Zidentyfikowanie po raz pierwszy w krajowej populacji kur obecności IBV typu QX (2004 r.) oraz D1466 (2012 r.)
- ✓ Wykazanie w krajowej populacji indyków obecności TCoV, określenie jego prevalencji a także roli w wywoływaniu enteropatii zarówno u indyków jak i kurcząt
- ✓ Określenie patogenności wybranego szczepu TCoV w badaniach eksperymentalnych

Ponadto od niedawna podjęłam również badania nad występowaniem CoV u ptaków wolno żyjących. Ich obecność stwierdziłam w wymazach kałowych 3,15% (22/699) badanych ptaków. Obecnie prowadzę prace nad charakterystyką molekularną wykrytych koronawirusów, niemniej dotychczasowe wyniki były prezentowane na kongresie WVPA (Domanska-Blicharz K., Seroka A., Minta Z.: Detection and molecular characterization of IBV-like viruses in wild birds in Poland, 424-430, Proceedings of 17th World Veterinary Poultry Congress, Cancun, Mexico, 14-18.08.2011).

## **B. Ważniejsze osiągnięcia w zakresie innych prowadzonych badań**

### **PRZED DOKTORATEM**

Praca w Pracowni Ochrony Radiologicznej i Badań Izotopowych, PIWet-PIB pozwoliła mi na opanowanie technik chromatografii cieczowej i gazowej sprzężonymi z różnymi detektorami (uV-VIS, TEA, MDS) a także zapoznanie się z metodami biochemicznymi wykorzystywanymi w analizie oddziaływań toksycznych związków chemicznych na żywe organizmy (oznaczenia glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej, S-transferazy glutationowej). Prowadząc badania nad określeniem stanu skażenia lotnymi N-nitrozoaminami krajowych przetworów mięsnych wykazałam, że przeciętne stężenia N-nitrozoamin w przetworach mięsnych w Polsce nie są wysokie i znajdują się na podobnym poziomie, co stężenia stwierdzone w innych krajach. Na podstawie analizy stężeń N-nitrozoamin w poszczególnych asortymentach przetworów mięsnych oraz wielkości ich

spożycia obliczyłam średnie dzienne spożycie NDMA (N-nitrozo-di-metyloamina) z przetworami mięsnymi i rybnymi przez statystycznego mieszkańca Polski. Wynosiło ono ok. 0,20 µg/osobę w przypadku przetworów mięsnych oraz ok. 0,062 µg/osobę w przypadku przetworów rybnych. Wartości te mieszczą się w zakresie wielkości pobierania NDMA przez mieszkańców innych krajów. W pracy wykazałam także, jak bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na częstość występowania i zawartość rakotwórczych N-nitrozoamin w wędlinach podrobowych jest ściśle przestrzeganie właściwych warunków czasu i temperatury przechowywania wędlin. Wyniki moich prac wykazały, że w świeżych produktach występowanie lotnych N-nitrozoamin miało charakter sporadyczny, natomiast po 2-3 dniach przechowywania, nawet w warunkach lodówki, stężenia i częstotliwość występowania tych związków wzrastała. Zależności pomiędzy zawartością azotanów, azotynów i jakością mikrobiologiczną a tworzeniem się N-nitrozoamin w wędlinach podrobowych przechowywanych w różnych warunkach czasowych i temperaturowych były słabo zaznaczone i niejednoznaczne. Uzyskane wyniki wskazywały jednakże na konieczność stałego śledzenia aktualnego stopnia zagrożenia toksykologicznego ze strony występujących w żywności N-nitrozoamin. Dysponowanie takimi danymi jest niezwykle istotne nie tylko z punktu widzenia ochrony zdrowia człowieka-konsumenta, ale także rosnących wymogów w międzynarodowym handlu i eksporcie żywności pochodzenia zwierzęcego.

Otrzymane wyniki stały się podstawą mojej pracy doktorskiej, a także zostały opublikowane w następujących czasopismach:

- Domańska K., Kowalski B.: Effect of different storage conditions on N-nitrosamines content in Polish edible offals processed meat products, Bull. Vet. Inst., Pulawy, 46, 317-324, 2002
- Domańska K., Rożańska H: Microbiological quality of Polish edible offals processed meat products during storage; influence on N-nitrosamines content, Bull. Vet. Inst., Pulawy, 2003, 47, 217-224
- Domańska K., Kowalski B.: Occurrence of volatile N-nitrosamines in Polish processed meat products, Bull. Vet. Inst., Pulawy, 2003, 47, 507-514
- Domańska-Blicharz K., Michalski M., Kowalski B.: Effect of different storage conditions on nitrates and nitrites in Polish edible offals processed meat products. Influence on N-nitrosamine content, Bull. Vet. Inst. Pulawy, 2004, 48, 63-68.
- Domańska-Blicharz K., Rachubik J., Kowalski B.: Occurrence of volatile N-Nitrosamines in Polish tinned foods, Bull Vet Inst Pulawy, 2005, 49 (3), 319-322.

Równolegle prowadziłam badania nad toksycznością metali ciężkich. Uczestniczyłam również w badaniach w ramach grantu pod tytułem "Wpływ wybranych dodatków żywieniowych na przyswajanie, retencję i eliminację kadmu w organizmie szczura". Prace te znalazły odzwierciedlenie w następujących publikacjach:

- Grosicki A., Domańska K.: Dietary zinc-heavy metal interactions, Polish Journal of Environmental Studies, 1997, 6: 5-9.
- Domańska K., Grosicki A., Kowalski B.: Effect of subchronic cadmium exposure on hepatic and renal glutathione, glutathione s-transferase, and superoxide dismutase in rats, Bull Vet Inst Pulawy, 1999, 48: 203-210.

- Domańska K., Grosicki A.: Comparison of effects of vitamin C and selenium on renal and hepatic superoxide dismutase activities in cadmium intoxicated rats., Bull Vet Inst Pulawy , 2000, 44: 247-252.
- Domańska K., Grosicki A., Kowalski B.: Influence of bentonite and vitamin C on renal and hepatic glutathione in cadmium intoxicated rats, Journal of Trace and Microprobe Techniques, 2000, 18: 557-562.

## **PO DOKTORACIE**

### ***Zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza (choroba Gumboro)***

Pierwszym obiektem moich zainteresowań po rozpoczęciu pracy w Zakładzie Chorób Drobiu była choroba Gumboro (zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza, IBD). Rezultatem moich badań prowadzonych w latach 2001-2004 było opracowanie metod biologii molekularnej (RT-PCR, real time RT-PCR, REA i sekwencjonowanie) oraz metod immunoenzymatycznych (test immunoperoksydazowy IP i AC-ELISA) i ich zastosowanie do diagnostyki i badań epidemiologicznych choroby Gumboro. Metody te okazały się przydatne do szybkiego wykrywania materiału genetycznego wirusa (RT-PCR) oraz antygeny (metody IP i AC-ELISA) w torbie Fabrycjusza kurcząt zakażonych wirusem IBD lub do porównawczej charakterystyki antygenowej (AC-ELISA, przeciwciała monoklonalne) i genotypowej (RT-PCR, real time RT-PCR, REA i sekwencjonowanie genów VP1 i VP2) krajowych szczepów wirusa IBD izolowanych na przełomie lat 70/80 (słabo patogenne) oraz w latach 90-tych (wysoco zjadliwe). Wyniki tych badań, w części realizowane we współpracy z laboratorium referencyjnym OIE w Ploufragan, Instytutem Weterynaryjnym Węgierskiej Akademii Nauk w Budapeszcie (Węgry) w ramach programu COST Action 839 „Immunosupresyjne wirusowe choroby drobiu” oraz grantu SPUB finansowanego przez KBN, mają szczególną wartość i znaczenie w wyjaśnieniu wczesnej epidemii tej choroby w Europie. Wskazują one, że szczepy wirusa IBD izolowane w Polsce i na Węgrzech w latach 1977-1981 tworzą nową odrębną grupę genetyczną i prawdopodobnie mogły pojawić się przed wirusami klasycznymi serotypu 1 „F52/70-like”.

Otrzymane wyniki opublikowane zostały w następujących czasopismach:

- Domańska K., Rivallan., Śmietanka K., Toquin D., Minta Z., Eterradossi N.: Antigenic characterization of Polish Infectious Bursal Disease virus strains, Bull. Vet. Inst. Pulawy, 2002, 46, 45-52.
- Domańska K., Rivallan., Śmietanka K., Toquin D., de Boissesson C., Minta Z., Eterradossi N.: Genetic characterization of Polish Infectious Bursal Disease virus strains, Bull. Vet. Inst. Pulawy, 2003, 47, 61-69.
- Domańska K., Śmietanka K., Minta Z.: Characterization of Polish Infectious Bursal Disease Virus strains by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction combined with Restriction Enzyme Analysis, Bull. Vet. Inst. Pulawy, 2003, 47, 349-356
- Domańska K., Mato. T., Rivallan., Śmietanka K., Minta Z., de Boissesson C., Toquin D., Lomniczi B., Palya V., Eterradossi N.: Antigenic and genetic diversity of early European isolates of Infectious bursal disease virus prior to the emergence of the very virulent viruses: early European epidemiology of Infectious bursal disease virus revisited? Arch. Virol, 2004, 149, 465-480.

- Minta Z., Domańska-Blicharz K., Bartnicka B., Śmietanka K.: Production and characterization of monoclonal antibodies against early Polish strains of Infectious Bursal Disease Virus, Bull Vet Inst Pulawy, 2005, 49, 361-366.

### ***Grypa ptaków***

Uczestniczyłam również w pracach nad influencją (grypą) ptaków (AI). Głównie moja aktywność skupiała się na wprowadzeniu do diagnostyki tej jednostki chorobowej nowoczesnych metod opartych na biologii molekularnej tj. metody RT-PCR do wykrywania materiału genetycznego wirusów influenzy typu A przy zastosowaniu starterów specyficznych dla konserwatywnego regionu genów M i NP oraz testy RT-PCR pozwalające określić przynależność wirusów influenzy do podtypu hemaglutyniny – H5 i H7 oraz neuraminidazy – N1. Jako wykonawca uczestniczyłam także we wdrożeniu metody rRT-PCR w ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego a także we współpracy z innymi laboratoriami krajów UE w ramach projektu EPIZONE (6 PR). Wdrożenie metod molekularnej diagnostyki influenzy ptaków w połączeniu z sekwencjonowaniem fragmentu genu hemaglutyniny umożliwiło szybkie określenie *in vivo* cech patogennych krajowych izolatów wirusów AI podtypów H5 i H7, w tym również wirusa HPAI H5N1 wyizolowanego 2006 r. od ptaków dzikich oraz dokonać analizy filogenetycznej tych izolatów porównując je do szczepów krążących w Europie i świecie. W ramach w/w projektu EPIZONE uczestniczyłam w badaniach z zakresu porównawczej epidemiologii molekularnej wirusów AI izolowanych w Europie oraz doskonalenia unijnego programu monitorowania zakażeń wirusami influenzy u drobiu i ptaków dzikich. Wśród kontynuowanych badań związanych z influencją ptaków było moje uczestnictwo w trzech projektach w ramach 6 Programu Ramowego (INN-FLU, FLU-LAB-NET i NEW-FLUBIRD). Tutaj do moich osiągnięć należą badania nad przeżywalnością AIV w wodzie pochodzącej z miejsc, w których bytują dzikie ptaki wodne (staw miejski, ujście Wisły, woda morska z Bałtyku). Przeprowadzone badania wykazały, że na przeżywalność wirusa miały wpływ jego początkowa koncentracja oraz fizyko-chemiczne właściwości wody jak temperatura i zasolenie, wirus H5N1 najdłużej przeżywał w temperaturze 4<sup>0</sup> C, natomiast najkrócej w 20<sup>0</sup> C oraz że AIV zachowuje swoje właściwości infekcyjne dłużej w filtrowanej wodzie morskiej, natomiast w niefiltrowanej wodzie morskiej traci je najszybciej, co może wynikać z oddziaływania dodatkowych czynników biologicznych (np. zewnątrzkomórkowe proteazy, nukleazy i inne enzymy).

Rezultatem badań dotyczących influenzy ptaków są następujące prace:

- Domańska-Blicharz K., Śmietanka K., Minta Z.: Molecular methods for detection of avian influenza type A viruses, Bull. Vet Inst Pulawy 2006, 50, 287-291.
- Śmietanka K., Minta Z., Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Wijaszka T.: Avian influenza H5N1 outbreak in a flock of mute swans in the city of Toruń, Poland, in 2006. Bull. Vet Inst Pulawy, 2008, 52, 491-495.
- Domańska-Blicharz K., Minta Z., Śmietanka K., Marche S., van den Berg T.: H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus Survival in Different Types of Water, Avian Dis, 2010, 54, 734-737.

- Śmietanka K., Fusaro A., Domańska-Blicharz K., Salviato A., Monne I., Dundon W.G., Cattoli G., Minta Z.: Full-Length Genome Sequencing of the Polish HPAI H5N1 Viruses Suggests Separate Introductions in 2006 and 2007, *Avian Dis*, 2010, 54, 335-339.
- Smietanka K, Minta Z, Wyrostek K, Józwiak M, Olszewska M, Domańska-Blicharz K., Reichert M, Piękała A, Habyarimana A, van den Berg T.: Susceptibility of pigeons to clade 1 and 2.2 high pathogenicity avian influenza H5N1 virus, *Avian Dis*. 2011 55(1):106-112.
- Dundon W.G., Heidari A., Fusaro A., Monne I., Beato M.S., Cattoli G., Koch G., Starick E., Brown I.H., Aldous E.W., Briand F.-X., Le Gall-Recule G., Jestin V., Jørgensen P.H., Berg M., Zohari S., Metreveli G., Munir M., Stahl K., Albina E., Hammoumi S., Gil P., Servan de Almeida R., Smietanka K., Domanska-Blicharz K., Minta Z., Van Borm S., van den Berg T., Moreno Martin A., Barbieri I., Capua I.: Genetic data from avian influenza and avian paramyxoviruses generated by the European network of excellence (EPIZONE) between 2006 and 2011— Review and recommendations for surveillance, *Vet Microbiol*, 2012, 154, 209–221.

### ***Zakażenia adenowirusowe***

Z innych moich zainteresowań z zakresu chorób wirusowych drobiu były badania nad adenowirusami. Zakażenia adenowirusowe są powszechne wśród ptaków, jednak objawy kliniczne tych zakażeń są względnie rzadko obserwowane. Począwszy od 2000 r. w literaturze naukowej zaczęły pojawiać się doniesienia z Japonii o przypadkach wrzodziejącego zapalenia żołądka mięśniowego (ang. gizzard erosions – GE) u kurcząt brojlerów a w ostatnim czasie, podobne objawy kliniczne obserwowano także w Polsce. Na początku 2008 r. zanotowano na kilku fermach w centralnej Polsce przypadki GE u kurcząt brojlerów a moja aktywność w tym aspekcie skupiła się na identyfikacji czynnika wywołującego GE, odtworzeniu schorzenia w warunkach eksperymentalnych, a także przeprowadzeniu charakterystyki molekularnej wyizolowanego wirusa. W przeprowadzonych badaniach wykazano wrażliwość wiekową na zakażenie wyizolowanym w hodowli fibroblastów zarodków kurzych (CEF) adenowirusem należącym do serotypu (FAdV-1). Po zakażeniu eksperymentalnym kurcząt SPF, jedynie u zakażonych w 1 dniu życia obserwowano GE oraz dużą śmiertelność, natomiast u zakażonych w 4 tygodniu życia dowodem infekcji była obecność ciałek wtrętowych w komórkach nabłonka żołądka mięśniowego kurcząt oraz krótkotrwała obecność materiału genetycznego FAdV w jelitach i żołądku mięśniowym. Zsekwencjonowano dwa geny kodujące wypustki (krótką i długą) znajdujące się na powierzchni cząsteczki wirusa, których budowa (skład aminokwasowy) prawdopodobnie determinuje patogenność danego szczepu FAdV-1. Nie znalazłam jednak żadnej korelacji (sugerowanej wcześniej w literaturze światowej) pomiędzy zidentyfikowanymi zmianami w budowie tych wypustek a patogennością szczepów, co wskazuje na inny mechanizm patogenności.

Wyniki tych prac zostały omówione w publikacji:

- Domanska-Blicharz K., Tomczyk G., Smietanka K., Kozaczynski W., Minta Z.: Molecular characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens with gizzard erosions, *Poultry Sci* 2011, 90, 983–989

### ***Wirusowe czynniki enteropatii u drobiu***

W ostatnim okresie, do najważniejszych moich zainteresowań należy uznać prace nad wirusowymi czynnikami stanów patologicznych przewodu pokarmowego (enteropatii) u drobiu, głównie u indyków. Sprawnie funkcjonujący przewód pokarmowy u drobiu to istotny warunek osiągnięcia dobrych wyników produkcyjnych i ekonomicznych chowu. W USA oszacowano straty wynikające z występowaniem różnego rodzaju enteropatii na ok. 10 centów amerykańskich/funt mięsa drobiowego. W Polsce dotychczas nie prowadzono ani żadnych badań nad enteropatiami, nie prowadzono również tego typu obliczeń, z kolei informacje od hodowców oraz lekarzy weterynarii opiekujących się stadami drobiu dowodziły, że jest to bardzo aktualny problem ekonomiczny w kraju i to skłoniło mnie to podjęcia tych badań. Enteropatie opisywane są pod różnymi nazwami, u kurcząt: syndrom zahamowania wzrostu (RSS-runting stunting syndrom) lub syndrom złego wchłaniania (MAS-malabsorption syndrom), natomiast u indyków: zespół zapalenia jelit indycząt (PEC - poult enteritis complex) oraz syndrom śmiertelności na tle zapalenia jelit indycząt (PEMS - poult enteritis mortality syndrome). Obok czynników niezakaźnych (pasza, warunki chowu) coraz większe znaczenie w etiopatogenezie enteropatii przypisuje się czynnikom zakaźnym, w tym wirusom. Zakres moich badań objął 4 różne wirusy: astrowirusy, rotawirusy, parwovirusy i koronawirusy (tutaj w aspekcie enteropatii, chociaż wcześniej były obiektem moich zainteresowań jako czynnik etiologiczny IB). Łącznie przebadalam ponad 260 stad indyków (styczeń 2008-grudzień 2012) oraz 86 stad kur i kurcząt (czerwiec 2011 – grudzień 2012). Ptaki w stadach, w których pobierano próbki były w dobrej kondycji zdrowotnej lub wykazywały objawy chorobowe charakterystyczne dla enteropatii. Spośród przebadanych 264 stad indyków, astrowirusowe RNA wykrywano w 114 (43,8%) stadach, natomiast sekwencje nukleotydowe charakterystyczne dla koronawirusów w 23 (8,7%) stadach. Z kolei obecność genomu rotawirusów i parwovirusów zidentyfikowano odpowiednio w 63 (23,8%) i 74 (28%) stadach. Na przebadanych łącznie 86 stad kurcząt i kur w 38 (44,1%) stadach zidentyfikowano obecność parwovirusów. W 11 stadach (12,7%) stwierdzono obecność rotawirusów a zaledwie w 2 stadach (2,3%) obecność astrowirusów. Najwięcej, bo 64 stad (74,4%) było zakażonych CoV odpowiedzialnych za IB. Dotychczas uzyskane wyniki sugerują, że u indyków najpowszechniejszymi spośród wirusów odpowiedzialnych za enteropatie są zakażenia astrowirusami (43,8%), w mniejszym stopniu parwovirusami (28%) oraz rotawirusami (23,8%), natomiast zakażenia koronawirusami są sporadyczne (8,7%). Z kolei u kurcząt i kur najczęściej identyfikowane były parwovirusy (44,1%) oraz rotawirusy (12,7%), natomiast zakażenia astrowirusami były wykrywane incydentalnie.

Ponadto, niektóre z w/w wirusów zostały poddane dokładniejszej charakterystyce molekularnej. W przypadku astrowirusów indyczych dokonałam dodatkowo ich zróżnicowania na poszczególne typy (astrowirus indyczy typu 1 czyli TAsV-1, typu 2 czyli TAsV-2 i wirus zakaźnego zapalenia nerek czyli ANV). Wykorzystano do tego cztery różne metody molekularne wykrywające ten sam gen polimerazy (ORF1b) lecz różne jego fragmenty. Obecność TAsV-2 stwierdziłam w 30 stadach (38,9%), natomiast typ TAsV-1 w 9 stadach (11,6%), przy czym niektóre stada zakażone były kilkoma typami TAsV. Obecność genomu ANV wykryłam tylko w jednym stadzie (1,29%) i był to pierwszy przypadek identyfikacji ANV u indyków poza Stanami Zjednoczonymi. Analiza filogenetyczna w

oparciu o fragment ORF1 wykazała duże zróżnicowanie genetyczne w sekwencjach wybranych polskich TAsV. Niektóre ze szczepów wykazywały podobieństwo do północnoamerykańskich TAsV-2, jednak większość tworzyła odrębną podgrupę szczepów europejskich, co może sugerować ich odrębne pochodzenie. Stwierdzona duża zmienność sekwencji astrowirusów indyków sprawia, że metody RT-PCR ukierunkowane na określenie poszczególnych typów okazały się mało przydatne, natomiast najlepszą wydaje się być sekwencjonowanie produktu z RT-PCR ukierunkowanej na wykrywanie wszystkich typów astrowirusów..

Wnikliwszym badaniom poddałam również wykryte podczas moich badań parwovirusy. Wirusy te od lat znano jako czynnik powodujący enteropatie, szczególnie u ssaków a w ostatnich latach również u kur i indyków. Badania wykazały, że genomy parwovirusów zidentyfikowanych u tych gatunków ptaków są odmienne od pozostałych i tworzą odrębne grupy filogenetyczne: parwovirusów indyckich (TuPV-turkey parvovirus) i kurzych (ChPV-chicken parvovirus). Analiza filogenetyczna w oparciu o fragment genu NS1 (3'ORF) wykazała różnorodność zidentyfikowanych parwovirusów, gdyż umiejscawiały się one w trzech odrębnych grupach: ChPV-like, TuPV-like i w nowo-zidentyfikowanej tzw. TuPV-LUB, w której znajdowały się jedynie trzy polskie izolaty od indyków. Podobieństwo sekwencji nukleotydowej badanego fragmentu genomu tych parwovirusów do izolatów wzorcowych (prototypów) TuPV i ChPV wynosiło zaledwie 50.6-64.5%. Ponadto jeden parwovirus zidentyfikowany u kur znajdował się w grupie TuPV. Analiza genetyczna sekwencji tego izolatu wykazała, że mógł on powstać w wyniku rekombinacji pomiędzy wirusami z grupy ChPV i nowo-zidentyfikowanej TuPV-LUB. Parwovirusy identyfikowano zarówno od ptaków ze stad klinicznie zdrowych jak i chorych.

Wyniki tych prac zostały omówione w publikacji:

- Domanska-Blicharz K., Seroka A., Minta Z.: One-year molecular survey of astrovirus infection in turkeys in Poland Arch Virol 2011, 156, 1065–1072.
- Domanska-Blicharz K., Jacukowicz A., Lisowska A., Minta Z.: Genetic characterization of parvoviruses circulating in turkey and chicken flocks in Poland, Archives of Virology, 2012; 157: 2425-2430

### ***Mykoplazmozy drobiu***

Oprócz moich prac związanych z chorobami drobiu o etiologii wirusowej aktywnie uczestniczyłam także w badaniach nad mykoplazmami drobiu, skupiając się głównie na wdrażaniu do warsztatu diagnostycznego *Mycoplasma gallisepticum*, *M.synoviae* i *M.meleagridis* technik PCR. Efektem tych badań były publikacje:

- Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Minta Z.: Comparison of different molecular methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum*, Bull. Vet Inst Pulawy, 2008, 52, 529-532.
- Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Minta Z.: Comparison of different molecular methods for detection of *Mycoplasma Synoviae*, Bull Vet Inst Pulawy, 2009, 53, 357-360

Określenie wkładu własnego (w tym także procentowo) we współautorstwie zawarto w spisie publikacji i komunikatów zjazdowych



### C. Podsumowanie dorobku naukowego

Jestem autorką lub współautorką 46 pełnotekstowych publikacji naukowych, z czego 36 powstało po doktoracie. Wśród moich publikacji 31 pozycje stanowią prace oryginalne, z czego 21 powstało po doktoracie. Większość artykułów opublikowana została w czasopiśmie z listy JCR. Ponadto jestem autorką lub współautorką 61 komunikatów konferencyjnych, w tym 29 na konferencje krajowe oraz 32 na zagraniczne. Dodatkowo jestem współautorem 2 podrozdziałów w podręczniku „Choroby drobiu” (red. prof. M.Mazurkiewicz).

Lista punktów MliSW/KBN: 534 (490 punktów za publikacje oryginalne oraz 44 punkty za prace przeglądowe; prace wchodzące w skład pracy habilitacyjnej stanowią 85 punktów)

Sumaryczny IF publikacji naukowych według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania: 25,172 (z czego prace stanowiące pracę habilitacyjną – 3,382)

Liczba cytowań publikacji wg Web of Science: 78 z autocytowaniami, 65 bez autocytowań

Indeks Hirsha publikacji wg Web of Science: 5

### D. Realizowane projekty naukowe

Krajowe projekty badawcze (9)

- KBN 4 PO5D 091 14, Wpływ wybranych dodatków żywieniowych na przyswajanie, retencję i eliminację kadmu w organizmie szczura, wykonawca (1998-2000)
- KBN 584/E-180/SPUB-M/COST/P-06, Immunosupresyjne wirusowe choroby drobiu, wykonawca (2001-2003)
- N308 024 31/1642, Zastosowanie metody real time RT-PCR do wykrywania i charakterystyki wirusów grypy ptaków, wykonawca (2006-2010)
- N308 033 32/2836, Doskonalenie metod diagnozowania oraz ocena sytuacji epidemiologicznej zakażeń koronawirusami u kur i indyków w Polsce, kierownik projektu (2007-2011)
- N N308 564 939 Wrażliwość różnych gatunków drobiu na zakażenie wariantem gołębiem wirusa rzekomego pomoru drobiu, PIWet-PIB - wykonawca (2010-2013)
- N N308 578 040, Rola zakażeń wirusowych w enteropatiach u drobiu w Polsce, kierownik projektu (2011-2014)
- NR 12-01 26-10 Znaczenie zwierząt wolno żyjących jako rezerwuaru bakteryjnych, wirusowych i pasożytniczych czynników chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt domowych, wykonawca zadań (2011-2014):  
„Ptaki wolno żyjące jako rezerwuar i wektor w szerzeniu się wirusów grypy ptaków”  
oraz  
„Ptaki wolno żyjące jako rezerwuar i wektor w szerzeniu się *Mycoplasma sp*”

- Narodowe Centrum Badan i Rozwoju – Program Badan Stosowanych –Opracowanie i wdrozenie technologii produkcji szczepionki wektorowej przeciwko chorobie Newcastle u kur, wykonawca (2012-2015)

Międzynarodowe projekty badawcze 6PR UE (6)

- COST Action 839 “Immunosuppressive viral diseases in poultry” (2000-2004)
- FP 6-2004-Food-3-A, EPIZONE “Network of excellence for epizootic diseases diagnosis and control” (2006-2012):  
WP 4.1 Real-time PCR diagnostics, wykonawca  
WP 6.2 Molecular epidemiology and surveillance of AI and APMV, wykonawca
- FP 6-SSPE-CT-2006-44372, INN-FLU “Influence of viral proteins of avian influenza virus on the innate immune response of birds”, wykonawca (2007-2010)
- FP 6-SSP-5B-44453, FLU-LAB-NET “Development and enhancement of laboratory networks for avian influenza”, wykonawca (2007-2011)
- FP 6-SSPE-CT-2007-44490, NEW-FLUBIRD “Network for early warning of influenza viruses in migratory birds in Europe”, wykonawca (2007-2010)
- COST Action FA1207 „Towards control of avian coronaviruses: strategies for vaccination, diagnosis and surveillance”, krajowy przedstawiciel w Management Committee (2012-2016)

#### **E. Odbyte staże, szkolenia i kursy**

2000 - Toxicological Risk Assessment (Wageningen, Holandia) – 2 tygodnie

2000 – Application of monoclonal antibodies in antigen-capture ELISA for antigenic characterisation of IBDV (Ploufragan, Francja) – 2 tygodnie

2002 - Sekwencjonowanie DNA i analiza wyników (Warszawa) – 1 tydzień

2012 - Strengthening the Polish Reference Veterinary Laboratory. Preparation before Influenza pandemia (Ploufragan, Francja) – 1 tydzień

#### **F. Nagrody i wyróżnienia**

- 2005 - nagroda III stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za pracę “Antigenic and genetic diversity of early European isolates of infectious bursal disease virus prior to the emergence of the very virulent viruses: early epidemiology of infectious bursal disease virus revisited”, Arch Virol 2004
- 2010 – wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za pracę “Full-length genome sequencing of the Polish HPAI H5N1 viruses suggests separate introductions In 2006 and 2007”, Avian Dis, 2010
- 2011 – nagroda III stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za pracę „Molecular characterisation of fol adenoviruses isolated from chicken with gizzard erosions”, Poultry Sci, 2011
- 2012 - wyróżnienie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi za osiągnięcia w zakresie postępu w rolnictwie, rozwoju wsi, rynkach rolnych i rybołówstwie za cykl prac:

Opracowanie i wdrożenie metod rozpoznawania wirusowych czynników enteropatii u drobiu

- Wielokrotne nagrody lub wyróżnienia w konkursach na najlepszą publikację pracowników naukowych PIWet-PIB

### **G. Pozostałe informacje**

- Jestem promotorem pomocniczym w otwartym przewodzie doktorskim mgr Anny Jacukowicz pod roboczym tytułem „Ocena występowania i charakterystyka molekularna astrowirusów w populacji drobiu grzebiącego w Polsce”
- Recenzowałam 4 publikacje w czasopismach naukowych (Bulletin Veterinary Institute Puławy, Journal of Virological Methods, African Journal of Microbiology Research)
- Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych oraz World Veterinary Poultry Association
- Czynn timer uczestniczyłam w 10 konferencjach międzynarodowych (prezentacja ustna – 10 lub plakatowa - 7):
  - II International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia, Rauschholzhausen (Niemcy) 2001
  - WG3 Meeting of COST Action 839, Puławy (Polska), 2001
  - MC/WG2 Joint-Meeting of COST Action 839, Larnaka (Cypr), 2002
  - Final meeting COST 839, Barcelona (Hiszpania), 2004
  - V International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, Rauschholzhausen (Niemcy), 2006
  - XV Congress of the World Veterinary Poultry Association, Pekin (Chiny) 2007
  - 7<sup>th</sup> International Symposium on Avian Influenza, Athens (USA), 2009
  - XVI Congress of the World Veterinary Poultry Association, Marrakesh (Maroko), 2009
  - 8th International Symposium on Turkey Diseases, Berlin (Niemcy), 2010
  - Turkey production and Health: An update, Berlin (Niemcy), 2011
  - VII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, Rauschholzhausen, Germany, 2012

Ponadto czynnimer uczestniczyłam również w konferencjach krajowych (prezentacja ustna – 9 lub plakatowa - 7):

- Immunosupresja i immunomodulacja układu odpornościowego ptaków – możliwość immunoprofilaktyki, Polanica Zdrój, 2003
- XII Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Warszawa 2004
- Patologia narządu rozrodczego ptaków - etiologia, diagnostyka i zwalczanie, Polanica Zdrój, 2005
- Aktualne problemy w patologii drobiu, Wrocław, 2006
- Monitoring zagrożeń w produkcji drobiarskiej – aspekty bezpieczeństwa żywności, Wrocław 2007

- XII Kongres PTNW „Od nauki do praktyki”, Olsztyn 2008
- Aktualne problemy w patologii drobiu, Wrocław, 2009
- Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem embriopatologii i okresu około lęgowego, Wrocław, 2010
- Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem pasożytów, Wrocław, 2011
- XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Wrocław 2012
- Byłam członkiem komitetu organizacyjnego następujących konferencji:
  - Influenza ptaków, Puławy, 2000
  - Zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza, Puławy, 2001
  - 15th Joint Annual Meetings of the National Reference Laboratories for Avian Influenza and Newcastle Disease of European Union Members States, Puławy, 2009

Puławy, 2015.09.04

Ustawa Domicilio - Michal