

Autoreferat

Dr Krzysztof Śmietanka

**Państwowy Instytut Weterynaryjny
-Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Zakład Chorób Drobiu
Zakład Epidemiologii i Oceny Ryzyka**

Puławy, 2013

1. Imię i Nazwisko

Krzysztof Śmietanka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- Dyplom ukończenia studiów na kierunku medycyna weterynaryjna, Akademia Rolnicza (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) w Lublinie, 2000 r., lekarz weterynarii
- Dyplom doktora nauk weterynaryjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, 2007 r., tytuł rozprawy doktorskiej: „Molekularna charakterystyka krajowych szczepów paramyksowirusów ptaków serotypu 1”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- od 2000 r. – Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Zakład Chorób Drobiu
- od 2011 r. - Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Zakład Epidemiologii i Oceny Ryzyka

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Badania nad występowaniem, epidemiologią i patobiologią grypy ptaków ze szczególnym uwzględnieniem zakażeń wirusem H5N1”

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania, impact factor IF i punktacja MNiSW aktualna w roku publikacji)

1. **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.

IF=0,337, MNiSW =15 pkt

2. **Śmietanka K.**, Fusaro A., Domanska-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.

IF=1,623, MNiSW = 32 pkt

3. **Śmietanka K.**, Pikuła A., Minta Z., Meissner W.: Evidence of persistence and multiple genetic modifications of H7N7 low-pathogenic avian influenza virus in wild mallards in Poland provided by phylogenetic studies. *Avian Pathol.* 2011, 40, 131-138.

IF=1,711, MNiSW = 32 pkt

4. **Śmietanka K.**, Minta Z., Wyrostek K., Józwiak M., Olszewska M., Domańska-Blicharz K., Reichert M., Pikuła 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, 106-112.

IF=1,462, MNiSW = 32 pkt

5. **Śmietanka K.**, Minta Z., Włodarczyk R., Wyrostek K., Józwiak M., Olszewska M., Minias P., Kaczmarek K., Janiszewski T., Kleszcz A.: Avian influenza viruses in wild birds at the Jeziorsko reservoir in Poland in 2008-2010. *Pol J Vet Sci.* 2012,15, 323-328.

IF=0,565, MNiSW = 20 pkt

6. **Śmietanka K.**, Minta Z., Reichert M., Olszewska M., Wyrostek K., Józwiak M., van den Berg T.: Experimental infection of juvenile domestic and Canada geese with two different clades of H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Vet Microbiol.* 2013, 163, 235-241.

IF=3,327, MNiSW = 40 pkt

7. Olszewska M., **Śmietanka K**¹, Minta Z. Phylogenetic studies of H3 low pathogenic avian influenza viruses isolated from wild mallards in Poland. *Acta Vet Hung* 2013, 3, 416-424

IF=1,173, MNiSW = 25 pkt

¹autor korespondencyjny

Indywidualny wkład współautorów w powstanie w/w publikacji znajduje się w odpowiednich załącznikach do wniosku.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) prac stanowiących monotematyczny cykl: **10,198**

Sumaryczna liczba punktów MniSW prac stanowiących monotematyczny cykl: **196**

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Grypa ptaków (ang. avian influenza, AI) jest chorobą zakaźną wywołaną przez wirus z rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaj *Influenzavirus A*. Budowa antygenowa białek zewnętrznych – hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA) – stanowi podstawę podziału wirusów AI na podtypy. Do chwili obecnej zidentyfikowano u ptaków 16 podtypów HA (H1-H16) i 9 podtypów NA (N1-N9), występujących w różnych kombinacjach (np. H5N1, H1N1, H13N6 itd.), a ptaki wolno żyjące należące do rzędu blaszkodziobych i siewkowych stanowią naturalny rezerwuar patogenu i pierwotne źródło zakażenia dla drobiu. Zjadliwość AIV dla dzikich ptaków jest zwykle niska (ang. low pathogenic avian influenza, LPAI), natomiast u drobiu niektóre wirusy podtypów H5 i H7 mogą ulegać mutacji do formy wysoce zjadliwej (ang. highly pathogenic avian influenza, HPAI) i wywoływać duże straty. Grypa ptaków wywołana przez podtypy H5 i H7 podlega obowiązkowi zgłaszania i zwalczania zarówno w formie LPAI jak i HPAI, jednak konsekwencje epidemiologiczne i ekonomiczne są nieporównywalnie wyższe w przypadku wysoce zjadliwej postaci choroby.

Z uwagi na dużą zmienność wirusa AI oraz dynamicznie zmieniające się uwarunkowania w zakresie epidemiologii choroby u różnych gatunków ptaków, celem pracy, którą podjąłem wspólnie ze współpracownikami, były badania nad grypą ptaków w 3 aspektach:

- 1) epidemiologii zakażeń wirusem wysoce zjadliwej grypy ptaków (HPAI) H5N1 w Polsce u drobiu i ptaków dzikich – publikacje wymienione w p. 1 i 2
- 2) występowania wirusów grypy w naturalnym rezerwuarze u ptaków dzikich na terenie kraju (publikacje 3, 5 i 7) oraz charakterystyki molekularnej wybranych izolatów wirusa wykrytych u kaczek krzyżówek (*Anas platyrhynchos*) (publikacje 3 i 7)
- 3) wrażliwości wybranych gatunków ptaków (gęsi domowe, bernikle kanadyjskie, gołębie) na eksperymentalne zakażenie wirusem HPAI H5N1, w tym określenia zakresu i intensywności zmian anatomo-patologicznych i histopatologicznych, rozmieszczenia wirusa w organizmie oraz jego siewstwa do środowiska – publikacje wymienione w p. 4 i 6

Główne osiągnięcia będące rezultatem przeprowadzonych badań, wliczanych do osiągnięcia naukowego stanowiącego monotematyczny cykl publikacji:

- I. *Wykazanie siewstwa wirusa grypy ptaków H5N1 oraz serokonwersji u łabędzi niemych nie wykazujących objawów klinicznych choroby*

Epidemia wysoce zjadliwej grypy ptaków (HPAI) wywołana przez podtyp H5N1 wirusa objęła pod koniec 2003 r. dużą część Azji Południowo-Wschodniej, a w 2005 roku wirus pojawił się w azjatyckiej części Rosji, Kazachstanie, a następnie w Turcji, Rumunii i Chorwacji (Sims i Brown, 2008). Od stycznia 2006 r. zaczęto obserwować

masowe zachorowania i padnięcia u ptaków dzikich najpierw w Niemczech, a następnie w innych państwach Europy. Na początku marca 2006 r. rozpoznano pierwsze krajowe przypadki zakażeń H5N1 u 3 martwych łabędzi niemych znalezionych nad Wisłą w centrum Torunia (Minta i wsp., 2007). Łabędzie stanowiły część większego stada, liczącego 116 osobników, które zostały zamknięte w specjalnie do tego celu przygotowanej wolierze. Pięć dni po zamknięciu ptaków w wolierze padł kolejny łabędź, a badania narządów wewnętrznych potwierdziły u niego obecność wirusa H5N1. Przeprowadzono szczegółowe badania żywych łabędzi, od których pobierano wymazy z jamy ustno-gardłowej i kloaki (do badań metodami RT-PCR) oraz krew (do badań serologicznych przy użyciu metody ELISA, immunodyfuzji w żelu agarowym oraz testu hamowania hemaglutynacji - HI). Obecność materiału genetycznego wirusa grypy ptaków wykryto u 32 łabędzi nie wykazujących objawów klinicznych choroby. Poziom siewstwa był jednak niski. Z kolei obecność przeciwciał typowo-specyficznych wykazano metodą konkurencyjną ELISA („competitive” ELISA) u ok. 90% ptaków i potwierdzono podtypowo-specyficznym testem HI dla antygeny H5 u ponad 70% osobników. U mniejszego odsetka łabędzi wykryto również obecność przeciwciał dla podtypów H1, H3, H7 i H9, chociaż przynajmniej w pewnym stopniu mogło to wynikać z reakcji krzyżowych, gdyż test HI nie charakteryzuje się wysoką swoistością. Chociaż łabędzie nieme są bardzo wrażliwe na zakażenie wirusem HPAI H5N1 w badaniach eksperymentalnych (do 100% zachorowalności i śmiertelności) i są również uznawane za „ptaki wskaźnikowe” (ang. „sentinel birds”), u których zwiększona śmiertelność powinna nasuwać podejrzenie obecności wirusa na danym obszarze, to wyniki przeprowadzonych badań własnych wskazują na dość niski odsetek śmiertelności w warunkach terenowych, co potwierdzają inni autorzy. Dla przykładu, podczas epidemii w Czechach w stadzie 282 łabędzi padło tylko 12 osobników (Nagy i wsp., 2007), a we Francji nieco ponad 50 łabędzi ze stada liczącego ok. 800 ptaków (Hars i wsp., 2008). Z kolei w Wielkiej Brytanii w 2008 roku obecność wirusa H5N1 stwierdzono u 10 padłych łabędzi w stadzie liczącym kilkaset ptaków. Przyczyny rozbieżności pomiędzy wynikami badań eksperymentalnych i obserwacji terenowych są dość złożone, jednak wyjaśnieniem tego zjawiska, zaproponowanym w dyskusji do publikacji stanowiącej efekt opisywanych badań, może być wcześniejsza ekspozycja na zakażenie wirusem grypy (najprawdopodobniej o niskiej zjadliwości) i wykształcenia się częściowej odporności krzyżowej na zakażenie HPAIV/H5N1. Opublikowane już później wyniki badań naukowców z Niemiec (Globig i wsp., 2009), Francji (Niqueux i wsp., 2010) i Wielkiej Brytanii (Pybus i wsp., 2012) potwierdzają, że wśród łabędzi niemych obecność seroreagentów występuje w wysokim odsetku i przynajmniej częściowo wyjaśnia stosunkowo niską zachorowalność i śmiertelność obserwowaną w warunkach terenowych.

II. *Wykazanie, że krajowe przypadki zakażeń wirusem wysoce zjadliwej grypy ptaków H5N1 u ptaków dzikich i drobiu w 2006 i 2007 roku były wywołane przez co najmniej dwie niezależne introdukcje różniących się genetycznie wariantów wirusa, należących do linii azjatyckiej „Qinghai”.*

Wysoce zjadliwa grypa ptaków wywołana przez podtyp H5N1 wystąpiła w Polsce dwukrotnie: w 2006 i 2007 roku (Minta i wsp., 2007; Śmietanka i wsp., 2009). Ogółem w okresie 5.03-7.05.2006 obecność wirusa potwierdzono u 64 ptaków dzikich, głównie łabędzi niemych, ale również u czapli siwej, tracza nurogęsia i jastrzębia. Nie odnotowano ognisk u drobiu. Z kolei na początku grudnia 2007 r. wirus H5N1 został wykryty na 2 fermach indyków w powiecie płońskim. Pomiędzy 1 a 22 grudnia 2007 r. zarejestrowano ogółem 10 ognisk, w tym dziewięć u drobiu (oprócz indyków również u kur niosek towarowych i kur w chowie przyzagrodowym) i jedno u ptaków dzikich utrzymywanych w azylu (bocian biały i myszołów zwyczajny). Koszty zwalczania choroby, której obecność wykryto ostatecznie w kilku powiatach znajdujących się na terenie 2 województw: mazowieckiego i warmińsko-mazurskiego, wyniosły ok. 12 milionów złotych (Śmietanka i wsp., 2009). Podstawowym problemem naukowym jaki pojawił się w tym okresie było pytanie o genezę epidemii HPAI H5N1 z 2006 i 2007 r. oraz o możliwy związek między nimi.

Badania wykonano we współpracy naukowej z laboratorium referencyjnym ds. grypy ptaków Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) w Legnaro (Włochy) w ramach konsorcjum naukowego Epizone, w którym brałem aktywny udział. Badania polegały na wykorzystaniu techniki sekwencjonowania najpierw w celu określenia podstawowych markerów molekularnych dotyczących zjadliwości, adaptacji do organizmu ptaków i ssaków oraz markerów związanych z lekoopornością, a następnie ustalenia pokrewieństwa filogenetycznego pomiędzy wybranymi izolatami H5N1 z lat 2006 i 2007. Ogółem poddano sekwencjonowaniu genom 7 izolatów H5N1: 5 z 2006 roku (3 od łabędzi niemych, 1 od jastrzębia i 1 od tracza nurogęsia) oraz 2 z 2007 roku (1 od kurcząt i 1 od myszołowa zwyczajnego), przy czym w większości przypadków uzyskano sekwencję obejmującą od 90% do 100% długości każdego z genów. W pierwszej kolejności przeanalizowane zostały markery molekularne determinujące zjadliwość, adaptację do organizmu gospodarza oraz lekooporność. Rola markerów molekularnych genomu wirusa grypy ptaków została szczegółowo opisana w publikacji przeglądowej (Śmietanka i Minta, 2011).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że wszystkie izolaty wirusowe były wysoce zjadliwe, gdyż posiadały liczne aminokwasy zasadowe (argininę i lizynę) w miejscu cięcia hemaglutyniny (HA). Z kolei obecność glutaminy w pozycji 238 i glicyny w pozycji 240 białka HA wskazuje na powinowactwo do receptorów α -2,3 kwasu sjałowego, występujących głównie w nabłonku górnych dróg oddechowych u ptaków (u ludzi dominują receptory kwasu sjałowego w konformacji α -2,6). W neuraminidazie (NA) stwierdzono obecność delekcji 20 aminokwasów, co sugeruje wzrost zjadliwości dla drobiu grzebiącego, jednak nie wykazano markerów oporności na oseltamivir,

powszechnie stosowany lek przeciwwirusowy. Wykryta we wszystkich badanych izolatach mutacja w pozycji 627 wirusowej polimerazy PB2, gdzie w miejsce występującego tam zwykle kwasu glutaminowego pojawiła się lizyna, jest markerem zwiększonej adaptacji i patogenności dla ssaków. W białku NS1 wykazano obecność delecji 5 aminokwasów w pozycjach 80-84, których rola nie jest do końca poznana, ale hipotetycznie może również wskazywać na zwiększoną patogenność dla ssaków. Reasumując tę część badań, krajowe izolaty wirusów H5N1 z roku 2006 i 2007 nie różniły się w zakresie głównych markerów molekularnych, charakteryzując się wysoką zjadliwością dla ptaków, zwiększonym potencjałem patogenności i adaptacji do organizmu ssaków, przy jednoczesnej wrażliwości na najczęściej stosowane leki przeciwwirusowe.

Wyniki badań filogenetycznych przeprowadzonych w oparciu o metodę przyłączania sąsiada (ang. neighbour-joining) wykazały jednoznacznie, że izolaty z 2006 i 2007 stanowiły dwie wyraźnie odrębne „linie” kładu genetycznego 2.2, określane jako 2.2 II (wirusy z 2006 r.) i 2.2 III (wirusy z 2007 r.). W pośredni sposób potwierdza to, że przypadki HPAI z 2006 i 2007 roku wywołane zostały przez co najmniej dwie niezależne introdukcje różniących się co prawda nieznacznie, jednak bezsprzecznie odrębnych genetycznie wirusów. W związku z tym odrzuciliśmy hipotezę, że ogniska HPAI H5N1 z 2007 roku były kontynuacją epidemii z roku 2006. Wyniki badań filogenetycznych wykazały najbliższe pokrewieństwo wirusów z 2006 r. z izolatami niemieckimi, ale wszystkie należały do tzw. „chińskiej linii Qinghai”. Zgodnie z hipotezą, którą zaproponowaliśmy w publikacji, źródłem ognisk w 2006 roku mogły być ptaki dzikie, które przeniosły wirus z Azji poprzez Rosję do krajów basenu Morza Bałtyckiego (Szwecji, Danii, Polski i Niemiec).

Geneza przypadków z 2007 r. jest znacznie trudniejsza do ustalenia. Wirusy izolowane w Polsce były spokrewnione z izolatami z Czech, Rumunii i Niemiec (i w nieco mniejszym stopniu z Bliskiego Wschodu). W tym samym roku zgłaszano przypadki H5N1 w tych właśnie państwach i najprawdopodobniej wirus został zawleczony z jednego z nich. Niewyjaśniona pozostaje kwestia, czy do przeniesienia na wirusa teren Polski przyczyniły się ptaki dzikie czy działalność człowieka związana z handlem lub transportem drobiu. Wirusy kładu 2.2 III wykrywano u ptaków dzikich w państwach ościennych - Niemczech i Republice Czeskiej - natomiast badania monitoringowe prowadzone w naszym kraju nie wykazały obecności wirusa w populacji wolno żyjącej. Z kolei dochodzenie epidemiologiczne przeprowadzone przy użyciu nowoczesnych metod epidemiologii molekularnej nie wykazało jasnych powiązań z którymkolwiek z ognisk chorobowych u drobiu w krajach sąsiadujących z Polską, a szczególnie w Niemczech (Haase i wsp., 2010).

III. Wykazanie na drodze eksperymentalnego zakażenia wirusem HPAI/H5N1, że gołębie domowe są odporne na rozwój choroby w formie klinicznej, podczas gdy wirus wywołuje zachorowania i padnięcia młodych gęsi domowych i bernikli kanadyjskich

Epidemia HPAI/H5N1, która w 2003 r. objęła duży region Chin i Azji Południowo-Wschodniej, a od 2005 r. zaczęła rozprzestrzeniać się do Azji Centralnej, Bliski Wschód, Europę i Afrykę, była wydarzeniem bezprecedensowym nie tylko z uwagi na skalę zasięgu geograficznego, ale również z uwagi na fakt, że wówczas wirus H5N1 ujawnił swoje szerokie spektrum patogenności, obejmujące nie tylko liczne gatunki ptaków, lecz również ssaki, w tym kotowate i łasicowate oraz ludzi. Jednym z głównym problemów naukowych przed którym stanęli specjaliści w zakresie grypy była ocena wrażliwości różnych gatunków ptaków na zakażenie wirusem H5N1 oraz oszacowanie ich epidemiologicznej roli jako bezobjawowego rezerwuaru (w tym możliwości rozprzestrzeniania wirusa na dalekie odległości), jak również jako „indykatora” obecności tego patogenu na danym terenie.

Wspólnie z interdyscyplinarnym zespołem wirusologów i patologów podjąłem badania, których celem była ocena zjadliwości dwóch różniących się genetycznie szczepów wirusa H5N1 dla gołębi domowych *Columba livia*, gęsi domowych *Anser anser f. domestica* i bernikli kanadyjskich *Branta canadensis*. Wybór gatunków podyktowany był kilkoma przyczynami, przedstawionymi poniżej.

Gołębie stanowią zróżnicowaną ekologicznie populację, którą można podzielić na 3 grupy: gołębie domowe, miejskie (potomkowie domowych gołębi – uciekinierów z hodowli) oraz dzikie (w Polsce występuje gołąb grzywacz, sierpówka, turkawka i siniak). W związku z tym mogą one stanowić ogniwo pośrednie pomiędzy populacją dziką a drobiem hodowlanym. W momencie podjęcia badań publikacje dotyczące wpływu zakażeń wirusem H5N1 na gołębie były nieliczne, jednak wskazujące na stosunkową dużą oporność wrodzoną tego gatunku, aczkolwiek wyniki nie były do końca jednoznaczne i wskazywały m.in. na wpływ genotypu wirusa użytego do zakażenia oraz jego dawkę (Liu i wsp., 2007; Werner i wsp., 2007; Jia i wsp., 2008). Podczas epidemii HPAI/H5N1 w Polsce w 2006 r., w krajowym laboratorium referencyjnym ds. grypy wielokrotnie badano próbki pochodzące od gołębi z przypadków masowych padnięć i w żadnym przypadku nie uzyskano wyniku dodatniego. Z drugiej jednak strony naturalne zakażenia gołębi były na świecie odnotowywane, opisano również zejście śmiertelne kota w następstwie zjedzenia zwłok zakażonego H5N1 gołębia (Ellis i wsp., 2004; Songserm i wsp., 2006). Tak więc rola gołębi w epidemiologii zakażeń wirusami grypy H5N1 wymagała dalszych badań.

Polska jest jednym z największych w Europie producentów gęsi, jednak rola tego gatunku w epidemiologii HPAI/H5N1 była niejednoznaczna, mimo że pierwszy przypadek izolacji wirusa H5N1 tzw. „typu azjatyckiego” miał miejsce w Chinach w 1996 r. właśnie w stadzie gęsi (Xu i wsp., 1999). Bardzo nieliczne publikacje naukowe

wskazują na zróżnicowaną wrażliwość gęsi na zakażenie eksperymentalne, zależną od genetycznego wariantu wirusa H5N1 wykorzystanego w badaniach.

Bernikla kanadyjska *Branta canadensis* to północnoamerykański gatunek dzikiej gęsi introdukowany do Wielkiej Brytanii w XVII wieku. Dzisiejsza rozprzestrzeniająca się populacja potomków bernikli – uciekinierów z prywatnych hodowli – uznawana jest za inwazyjną. W Polsce widywana jest regularnie, głównie w rejonie Zatoki Gdańskiej, gdzie w 2005 roku miał miejsce pierwszy udany lęg (Meissner i Bzoma, 2009). Ze względu na zachowania synantropijne może stanowić ogniwo pośrednie pomiędzy populacją ptaków dzikich i hodowlanych.

W celu oceny wrażliwości gołębi na zakażenie wirusem H5N1, cztery grupy ptaków w wieku 1 roku oraz 4 tygodni (10 ptaków w każdej grupie) zakażono donosowo i dospojówkowo dawką 10^6 EID₅₀ (dawki infekcyjnej dla zarodków kurzych) wirusa H5N1 należącego do kladu 1 oraz krajowego izolatu H5N1 od łabędzi z 2006 r. reprezentującego kład 2.2. W klatce z gołębiami zakażonymi umieszczono kurczęta SPF kontaktowe, nie zakażone, w pełni wrażliwe, stanowiące kontrolę siewstwa i transmisji wirusa. W 3, 5, 7, 10 i 14 dniu po zakażeniu (*p.i.*) dwa ptaki z każdej grupy eksperymentalnej humanitarnie uśmiercano i pobierano do badań histopatologicznych oraz badań ilościową metodą real time RT-PCR grupę 14 narządów oraz wymazy z jamy dziobowej i kloaki.

Podczas 14-dniowego okresu obserwacji nie stwierdzono występowania padnięć oraz objawów klinicznych w żadnej z badanych grup wiekowych. W grupie zakażonej wirusem H5N1 kladu 1 wykryto przy użyciu metody real time RT-PCR krótkotrwałe (pomiędzy 3-7 dniem *p.i.*) i niewielkiego stopnia siewstwo wirusa z układu oddechowego i pokarmowego (w zakresie $10^{2,83}$ - $10^{3,50}$ EID₅₀) oraz niewielkiego do umiarkowanego stopnia zmiany histopatologiczne w różnych narządach, m.in. w płucach i mózgu, głównie o charakterze krwotocznym i w postaci nacieków limfocytarnych. Obecność materiału genetycznego wykryto w różnych narządach wewnętrznych pomiędzy 3-10 dniem *p.i.*, przy czym najwięcej w płucach ($10^{6,32}$ - $10^{6,62}$ EID₅₀/g tkanki) i mózgu ($10^{5,86}$ - $10^{6,80}$ EID₅₀/g tkanki) między 5-7 dniem *p.i.*. Również u 2 dorosłych osobników zakażonych wirusem kladu 1 H5N1 stwierdzono obecność przeciwciał w teście ELISA i hamowania hemaglutynacji. Nie stwierdzono zachorowań u kurcząt kontaktowych, co dowodziło braku efektywnej transmisji wirusa do osobników w pełni wrażliwych, pomimo niewielkiego stopnia siewstwa do otoczenia.

W odniesieniu do gołębi zakażonych wirusem kladu 2.2 stwierdzono jedynie obecność materiału genetycznego H5N1 w tchawicy, płucach, żołądku gruczołowym i mięśniowym u 1 dorosłego osobnika w 3 dniu *p.i.* podczas gdy wyniki próbek wymazów z jamy dziobowej i kloaki oraz surowic pobranych 14 dnia *p.i.* były ujemne.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają, że gołębie są bardzo odporne na zakażenie wirusem HPAI/H5N1 kladu 1 i 2.2 i oporność ta jest wysoka również u gołębi młodych. Pewne różnice w sposobie reakcji ptaków na zakażenie eksperymentalne

zależne są od genotypu wirusa użytego do zakażenia, przy czym nieco wyższą zjadliwość wykazał wirus H5N1 kladu 1, co wyrażało się :

- dłuższą replikacją wirusa w większej liczbie narządów (z zaznaczonym neuro- i pneumotropizmem), prowadzącą do indukcji umiarkowanego stopnia zmian histopatologicznych

- siewstwem do środowiska (choć bez transmisji do ptaków wrażliwych)

- serokonwersją

Mechanizm oporności wrodzonej u gołębi może być związany z obecnością receptorów „typu ludzkiego” (α -2,6) w nabłonku górnych dróg oddechowych, co znacznie utrudnia zakażenie wirusami „ptasimi” (Liu i wsp., 2009).

Kolejne badania eksperymentalne dotyczyły oceny patogenności i stopnia zjadliwości wirusów H5N1 dla młodych gęsi domowych i bernikli kanadyjskich. W tym celu przeprowadzono ogółem 4 różne doświadczenia, w których zastosowano zbliżony układ eksperymentalny jak w przypadku opisanych wyżej badań na gołębiach. Wykorzystano gęsi domowe w wieku 18 dni i bernikle kanadyjskie w wieku ok. 3 tygodni, które zakażono wirusami H5N1 należącymi do dwóch różnych grup genetycznych. Użycie w badaniach dorosłych ptaków było ze względów praktycznych niemożliwe, gdyż klatki izolowane używane w tego typu doświadczeniach byłyby zbyt małe. Ze względu na bezpieczeństwo osób obsługujących zwierzęta oraz wykonujących sekcję i pobierających próbki do badań nie podjęto ryzyka utrzymywania ptaków zakażonych wirusem H5N1 w pomieszczeniach w systemie wolno wybiegowym. W wyniku zakażenia zarówno gęsi domowe jak i bernikle kanadyjskie chorowały, wykazując osowienie, brak apetytu, oraz objawy nerwowe (ruchy manewrowe, drgawki, zarzucanie głowy na grzbiet, kręcz szyi), które prowadziły do skrajnego wyczerpania i często śmierci. Zanotowano jednak różną śmiertelność, sięgającą u bernikli wszystkich osobników (zgodnie z przyjętą w tego typu badaniach praktyką, ptaki będące w stanie agonalnym poddawano eutanazji), natomiast u gęsi, w zależności od wariantu genetycznego wirusa, 4 do 5 ptaków na 10 zakażonych, w zależności od kladu. Metodą real time RT-PCR wykryto dużą ilość wirusowego RNA we wszystkich badanych próbkach narządów oraz wymazach, jednak zdecydowanie najwięcej w mózgu. Zmiany histopatologiczne były również wielonarządowe, głównie o charakterze krwotocznym, zapalnym, a przy dłużej trwającym procesie chorobowym również martwicowym. Przedłużony czas trwania choroby i niższa śmiertelność u gęsi domowych może być spowodowana niezidentyfikowanymi do tej pory czynnikami związanymi zarówno z samym patogenem, jak również z mechanizmami nieswoistej odporności wrodzonej organizmu gospodarza.

Reasumując, przeprowadzone badania nad patobiologią zakażeń wirusami grypy wykazały zróżnicowaną wirulencję izolatów H5N1 dla gołębi, gęsi i bernikli kanadyjskich, a uzyskane wyniki potwierdzają, że masowe padnięcia u gołębi nie

powinny być przyczyną alertu skłaniającego do natychmiastowych działań. Z drugiej strony, gęsi domowe i bernikle kanadyjskie powinny być brane pod uwagę przy realizacji monitoringu biernego (objawowego), przynajmniej w odniesieniu do ptaków młodych.

IV. Określenie prewalencji zakażeń oraz identyfikacja głównych gatunków ptaków dzikich ulegających infekcjom wirusami grypy ptaków na przykładzie 3-letnich badań monitoringowych na zbiorniku Jeziorsko w centralnej Polsce

Badania przeprowadzono w latach 2008-2010 na zbiorniku Jeziorsko, który jest jednym z największych sztucznych zbiorników Polski (o powierzchni ok. 43 km²). Stanowi on siedlisko dla ponad 250 gatunków ptaków, w tym 150 gatunków lęgowych. Jest również ważnym miejscem postoju i odpoczynku ptaków podczas jesiennych migracji, które gromadzą się wówczas w liczbie ponad 10 000 osobników (Janiszewski i wsp., 1998). Przed 2008 rokiem badania monitoringowe w tym miejscu nie były prowadzone na szerszą skalę, warto jednak odnotować fakt, iż jeden z 64 przypadków wykrycia wirusa H5N1 u dzikiego ptactwa w 2006 roku został potwierdzony u łabędzia niemego znalezionej właśnie w okolicach tego zbiornika (Minta i wsp., 2007).

W ramach przeprowadzonych badań monitoringowych pobrano w ścisłej współpracy z ornitologami 549 wymazów z jamy dziobowej i kloaki od 366 ptaków należących do 14 gatunków i reprezentujących 3 rzędy: blaszkodziobe (*Anseriformes*), siewkowe (*Charadriiformes*) i żurawiowe (*Gruiformes*). Próbkę badano przy użyciu metod real time RT-PCR, a próbki dodatkowo konwencjonalnym RT-PCR oraz metodą izolacji na zarodkach. Wirus grypy ptaków o niskiej zjadliwości został wykryty u 14 ptaków (prewalencja 3-letnia wyniosła 3,8%), w tym 12 cyraneczek *Anas crecca*, 1 kaczkę krzyżówkę *Anas platyrhynchos* i 1 cyrankę *Anas querquedula*. Trzy wirusy należały do potencjalnie niebezpiecznego podtypu H5, ale badania molekularne potwierdziły ich niski potencjał zjadliwości. Zidentyfikowano jednakże unikalny, niespotykany do tej pory profil aminokwasowy w miejscu cięcia HA: PQREIR*GLF w izolacie H5 od cyranki. Badania filogenetyczne 3 wirusów H5 wykazały ich umiejscowienie w grupie wirusów euroazjatyckich. Izolaty od cyraneczek z 2008 i 2010 r. zlokalizowały się na drzewie filogenetycznym na sąsiednich gałęziach, co sugeruje, iż stosunkowo niedawno oddzieliły się od wspólnego przodka.

Innym interesującym wynikiem przeprowadzonych badań było jednoczesne wykrycie 4 wirusów u 3 samic cyraneczki, żerujących razem i schwytych 26 sierpnia 2010 r. o godz. 6.00. Dwie z nich były zakażone wirusem AI podtypu H4N6, podczas gdy u trzeciej wykryto obecność materiału genetycznego AIV podtypu H5 oraz paramyksowirusa ptaków serotypu 4. Ponieważ stwierdzenie obecności dwóch różnych wirusów grypy (H4 i H5) w tym samym miejscu i czasie mogło nasuwać podejrzenie wystąpienia reasortacji (wymiany segmentów genomu pomiędzy nimi), podjęto dalsze badania, które z przyczyn obiektywnych (niepowodzenie izolacji wirusa H5 na

zarodkach kurzych, najprawdopodobniej ze względu na zbyt małą ilość wirusa w wyjściowym materiale) zawężono tylko do 2 wirusów H4N6. Przeprowadzono częściowe sekwencjonowanie 6 segmentów genomu (od 460 do 780 pz) kodujących białka wewnętrzne wirusa grypy i wykazano 100% homologii pomiędzy nimi, co w tym przypadku wykluczyło możliwość reasortacji. Niemniej jednak śledzenie tego rodzaju procesów jest bardzo cenne i niekiedy dostarcza bardzo interesujących wyników. Dla przykładu, w badaniach Dugan i wsp. (2008) wykryto obecność 5 wirusów H4N6 u kaczek krzyżówek poddanych próbkobranii w tym samym miejscu, a sekwencjonowanie genów kodujących białka wewnętrzne AIV wykazało występowanie aż 4 różnych konfiguracji genomowych, przy czym tylko 2 wirusy posiadały jednorodny układ genów.

Podsumowując, badania przeprowadzone na zbiorniku Jeziorsko wykazały stosunkowo wysoką prevalencję zakażeń AIV (3,8% w ciągu 3 lat), znacznie przewyższającą średnią dla całego kraju (dane niepublikowane), co tłumaczyć należy przede wszystkim czasem próbkobrania (późne lato/wczesna jesień), kiedy odsetek osobników zakażonych czynnie AIV jest w Europie najwyższy. Badania potwierdziły również, że podobnie jak w innych częściach świata, ptaki blaszkodziobe stanowią główny rezerwuar wirusa. Wykrycie potencjalnie niebezpiecznych dla drobiu wirusów podtypu H5 uzasadnia potrzebę monitorowania sytuacji w tym zakresie w populacji dzikich ptaków.

V. *Analiza epidemiologiczna zakażeń wirusami grypy ptaków o niskiej zjadliwości należących do podtypów H3 i H7 u kaczek krzyżówek i wykazanie, że gatunek ten może odgrywać rolę w długotrwałym utrzymywaniu się wirusa na ograniczonym terytorium*

W opisanych w p. IV badaniach monitoringowych prowadzonych na zbiorniku Jeziorsko zakażenia AIV wykrywano głównie u cyraneczek, co związane było najprawdopodobniej ze specyfiką miejsca. W badaniach prowadzonych na terenie całego kraju od szeregu lat gatunkiem ptaków u którego stwierdzana jest najwyższa prevalencja zakażeń AIV jest kaczka krzyżówka (dane niepublikowane). Podobna tendencja stwierdzana jest w całej Europie (Munster i wsp., 2007). Wśród licznych podtypów wirusów grypy stwierdzanych u tego gatunku w Polsce w ramach prowadzonych od blisko 10 lat badań monitoringowych wymienić należy m.in. H1, H2, H3, H4 i H7. Jednym z celów, które postawiłem sobie w mojej pracy, była szczegółowa charakterystyka genetyczna izolatów należących do podtypów H7 i H3, z przyczyn opisanych poniżej.

Epidemie HPAI, których przyczyną były wirusy podtypu H7, chociaż znajdujące się „w cieniu” epidemii H5N1, mogą mieć również poważne konsekwencje epidemiologiczne i ekonomiczne. Dwa najbardziej spektakularne przykłady to epidemia HPAI/H7N1 we Włoszech w latach 1999/2000, w wyniku której padło i wybito ok. 13

milionów ptaków oraz HPAI/H7N7 w Holandii w 2003 r., podczas której padło i poddano eutanazji ok. 25 milionów ptaków, co stanowiło ok. 1/3 całkowitej liczby drobiu w tym kraju (Capua et al., 2000; Alexander et al., 2008). Wirusy H7 posiadają również potencjał zoonotyczny, aczkolwiek do niedawna zakażenia u ludzi przebiegały zwykle łagodnie (nie licząc zgonu lekarza weterynarii w 2003 roku, którego przyczyną była niewydolność oddechowa wywołana zakażeniem wirusem H7N7). W ostatnim czasie uwagę naukowców i opinii publicznej skupia stosunkowo wysoka patogenność wirusa H7N9 ptasiego pochodzenia, który w Chinach wywołał już kilkadziesiąt zgonów (stan na sierpień 2013) u ludzi. Na uwagę zasługuje fakt, że jest to wirus o niskiej zjadliwości dla drobiu.

Wirusy grypy ptaków podtypu H3, chociaż nie są tak niebezpieczne jak H5 i H7, były niekiedy izolowane od drobiu wykazującego objawy ze strony układu oddechowego oraz spadki nieśności (Campitelli i wsp., 2002). W ostatnich latach opisywano również przypadki zakażeń psów wirusami H3 pochodzącymi od ptaków (Song i wsp., 2008; Li i wsp., 2010). Zdecydowanie najistotniejsze w kontekście zagrożenia zdrowia publicznego wydaje się jednak wykazanie, że wirus H3N2, który wywołał pandemię u ludzi w 1968 r. (tzw. „grypa Hong Kong”) powstał w wyniku reasortacji pomiędzy wirusami pochodzącymi od ptaków i ludzi (Bean et al., 1992).

Celem pierwszej części tego etapu pracy była charakterystyka pokrewieństwa genetycznego pomiędzy szczepami wirusa grypy ptaków podtypu H7N7 izolowanymi od kaczek krzyżówek w Polsce w latach 2007-2009. Pochodziły one z populacji miejskich Gdańska (2 izolaty), Słupska (1 izolat) i Białegostoku (1 izolat).

Analiza markerów molekularnych wykazała profil w pełni charakterystyczny dla wirusów izolowanych zwykle od dzikich ptaków, bez cech wskazujących na wzrost zjadliwości czy zwiększony potencjał adaptacyjny dla drobiu i ssaków oraz brak oporności na leki przeciwwirusowe, co wyraźnie sugeruje, że wirusy te nie krążyły wcześniej u innych zwierząt niż dzikie ptactwo. W analizie pokrewieństwa w oparciu o gen HA, wszystkie krajowe izolaty zlokalizowały się w obrębie jednego kladu genetycznego, jednak wirusy A/mallard/Poland/41/09 (Słupsk) i A/mallard/Poland/446/09 (Gdańsk) umiejscowione były szczególnie blisko siebie na drzewie filogenetycznym (>99% podobieństwa). Obydwa wirusy H7N7 izolowano w odstępie 9 miesięcy z miejsc oddalonych od siebie w prostej linii dokładnie o 102 km. Izolat A/mallard/Poland/01/08 również umiejscowił się na drzewie filogenetycznym w tej samej grupie, jednak z niższym procentem podobieństwa wynoszącym ok. 97,5%. Z kolei analiza filogenetyczna w oparciu o gen neuraminidazy (NA) wykazała najbliższe podobieństwo między A/mallard/Poland/16/09 i A/mallard/Poland/446/09, izolowanych w Gdańsku w tym samym miejscu (staw w Jelitkowie), w odstępie prawie dokładnie jednego roku (12.01.2009-27.12.2009).

Powyższe wyniki umożliwiły sformułowanie wniosku, że izolat A/mallard/Poland/446/09 (Gdańsk) powstał w wyniku reasortacji: gen hemaglutyniny

ma wspólne pochodzenie z genem HA wirusa A/mallard/Poland/41/09 (Słupsk), natomiast gen neuraminidazy – z genem NA wirusa A/mallard/Poland/16/09 (Gdańsk).

Wykazanie ciągłości pokrewieństwa pomiędzy różnymi izolatami tego samego podtypu dowodzi pośrednio, że genetycznie spokrewnione wirusy AIV mogą krążyć u dziko żyjących kaczek krzyżówek w Polsce przez długi czas (co najmniej 1 rok). W szczególności jest to istotne w odniesieniu do izolatów A/mallard/Poland/16/09 i A/mallard/Poland/446/09, wykrytych w dokładnie w tym samym miejscu w odstępie prawie 1 roku, co świadczy o tym, że wirusy (a przynajmniej niektóre ich geny) mogą utrzymywać przez długi czas nawet na bardzo ograniczonym terenie. Staw, na którym przebywały kaczki, ma powierzchnię ok. 3500 m². W opublikowanej pracy wspólnie z współautorami postulowaliśmy, że rezerwuarem umożliwiającym tak długą cyrkulację wirusów są kaczki krzyżówki z populacji osiadłej. Na poparcie tej tezy, oprócz pośrednich dowodów filogenetycznych, świadczy fakt licznych obserwacji ornitologicznych samca o numerze obrączki SN 11463, od którego pochodził izolat A/mallard/Poland/446/09. Próbkę do badań pobrano 27.12.2009, a z obserwacji ornitologicznych wynika, że był widziany na tym samym zbiorniku lub w jego najbliższych okolicach 23 lutego, 1 maja i w pierwszych dniach czerwca 2010 r. (W.Meissner, informacja ustna).

Wirusy krążą zatem w populacji krzyżówek osiadłych, jednak dochodzi również do ich rozprzestrzeniania na bliższe i dalsze odległości, czego dowodem jest nie tylko jednorodność genetyczna wirusów z Gdańska, Słupska i Białegostoku, ale również wykrycie podobnych wirusów w północnych Niemczech i Holandii, które miało miejsce już po opublikowaniu wyników powyższych badań (G. Koch, T. Harder, informacja ustna). Z dotychczasowych informacji ornitologicznych wynika, że ten rejon Europy jest miejscem zimowania krzyżówek mających tereny lęgowe w Polsce. Tak więc kaczki krzyżówki z populacji wędrującej odgrywają rolę w rozprzestrzenianiu wirusów AIV na dalekie odległości. Należy jeszcze podkreślić, że wiele lokalizacji, takich jak np. Gdańsk, w którym prowadzono dużą część badań, jest miejscem, w którym populacje wędrujące i osiadłe kaczek krzyżówek koegzystują (W. Meissner, informacja ustna).

Z innych ważnych osiągnięć tej części pracy należy wspomnieć o wyjątkowo bliskim pokrewieństwie genów HA i NP szczepu A/mallard/Poland/446/09 oraz wirusa izolowanego w tym samym roku od gęsi domowych w Czechach (99,4-99,8% podobieństwa), co jest kolejnym potwierdzeniem, że dochodzi do transmisji zakażeń AIV od ptaków dzikich do drobiu.

W drugiej części badań dotyczących epidemiologii molekularnej AIV w rezerwarze jakim jest kaczka krzyżówka poddaliśmy charakterystyce filogenetycznej 4 wirusy podtypu H3 (H3N3, 2xH3N8 i H3N9) izolowane w latach 2006-2010 na terenie województwa warmińsko-mazurskiego (3 izolaty) i podkarpackiego (1 izolat). Wykonano częściowe sekwencjonowanie wszystkich segmentów genomu (wielkość

produktu poddanego analizie filogenetycznej, wynosiła w zależności od genu od 449 do 1000 pz).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na ciągły przepływ genów wirusa grypy pomiędzy Eurazją i Afryką, a nawet Ameryką Północną (Alaska). Szczególnie ta ostatnia informacja jest interesująca w kontekście funkcjonującego poglądu o występowaniu dwóch odseparowanych linii genetycznych wirusów grypy: euroazjatyckiej i amerykańskiej, co wynika z dość ścisłego rozdzielenia geograficznego głównych tras migracji ptaków. Analiza filogenetyczna genu hemaglutyniny wszystkich badanych izolatów wykazała, że tworzą co prawda odrębną podgrupę, jednak w ramach jednej, dużej grupy gromadzącej wirusy z Eurazji, Afryki oraz Alaski. Jest to zatem pośredni dowód na to, że populacje ptaków z Eurazji i Alaski nie są w 100% od siebie oddzielone i dochodzi między nimi co prawda do rzadkich, ale ewidentnych kontaktów, które skutkują dwustronną „wymianą” wirusów grypy. Innym ważnym osiągnięciem przeprowadzonych badań było wykazanie wysokiego stopnia pokrewieństwa pomiędzy genem PA polskiego izolatu A/mallard/Poland/96/10 oraz izolatów wysoce zjadliwej grypy ptaków H5N1 należących do kladu 2.3.2. Badania przeprowadzone wcześniej przez Li i wsp. (2011) wskazywały, że gen PA wirusów H5N1 izolowanych od padłych dzikich ptaków w 2009 r. w rezerwacie Qinghai w Chinach był jedynym, który odbiegał swoim genetycznym profilem od genu PA stwierdzanego w HPAIV H5N1 kladu 2.3.2. Wyniki naszych badań pozwalają postawić hipotezę, że gen PA stwierdzany w chińskich wirusach wysoce zjadliwych H5N1 kladu 2.3.2 z roku 2009 oraz w wirusie słabo zjadliwej grypy ptaków H3N8 wykrytym w sierpniu 2010 r. w województwie warmińsko-mazurskim (A/mallard/Poland/96/10) pochodzą od wspólnego przodka, którym był prawdopodobnie, jak sugeruje Li i wsp. (2011), wirus H5N1 tzw. „typu Yamaguchi 2004”. Dowodzi to bezspornie, że ptaki dzikie ulegają mieszanym zakażeniom wysoce i słabo zjadliwymi wirusami grypy, a w wyniku reasortacji powstają warianty posiadające segmenty genomu pochodzące z różnych źródeł. Konsekwencje epidemiologiczne takich zdarzeń nie są znane, ale na pewno uzasadniają konieczność prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. Podobnie jak w opisanym wyżej przypadku wirusów H7N7, niektóre geny AIV/H3 wykazywały homologię z genami wirusów AI H5 i H7 izolowanych od drobiu (np. geny NP wirusa A/mallard/Poland/358/06 oraz wirusów słabo zjadliwej grypy ptaków H5 wykrytych u kaczek hodowlanych we Francji w 2008 r., czy też wirusów HPAI /H7N7 z epidemii holenderskiej w 2003 r.), co również dowodzi transmisji zakażeń od ptaków dzikich do drobiu, a niewykluczone, że również w odwrotnym kierunku.

Piśmiennictwo cytowane w opisie osiągnięć

1. Alexander D.J. i wsp.: Highly pathogenic avian influenza outbreaks in Europe, Asia, and Africa since 1959, excluding the Asian H5N1 virus outbreaks. In D.E. Swayne (Ed.). 2008, Avian Influenza 1st edn (s. 217- 237). Ames, IA: Blackwell Publishing.
2. Bean W.J.: Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts. J. Virol. 1992, 66, 1129–1138.
3. Campitelli L. i wsp.: H3N2 influenza viruses from domestic chickens in Italy: an increasing role for chickens in the ecology of influenza? J. Gen. Virol. 2002, 83, 413–420.
4. Capua I.: H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. Avian Pathology 2000, 29, 537-543.
5. Dugan V.G. i wsp.: The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. PLoS Pathog 2008, 4: e1000076.
6. Ellis T. M. i wsp.: Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. Avian Pathol. 2004, 33, 492–505.
7. Globig A. i wsp.: Epidemiological and ornithological aspects of outbreaks of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 of Asian lineage in wild birds in Germany, 2006 and 2007. Transbound Emerg Dis 2009, 56, 57-72.
8. Haase M. i wsp.: Possible sources and spreading routes of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 infections in poultry and wild birds in Central Europe in 2007 inferred through likelihood analyses. Infect Genet Evol. 2010, 10, 1075-1084.
9. Hars J. i wsp.: The epidemiology of the highly pathogenic H5N1 avian influenza in mute swan (*Cygnus olor*) and other Anatidae in the Dombes region (France), 2006. J. Wildl. Dis. 2008, 44, 811-823.
10. Janiszewski T. i wsp.: Awifauna zbiornika Jeziorsko w latach 1986-1996. Not. Ornitol. 1998, 39, 121-150.
11. Jia B. i wsp.: Pathogenicity of Chinese H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in pigeons. Arch. Virol. 2008, 153, 1821–1826.
12. Li S. i wsp.: Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China. Infect. Genet. Evol. 2010, 10, 1286–1288
13. Li Y. i wsp.: New avian influenza virus (H5N1) in wild birds, Qinghai, China. Emerg. Infect. Dis. 2011, 17, 265–267.
14. Liu Y. i wsp.: Susceptibility and transmissibility of pigeons to Asian lineage highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. Avian Pathol. 2007, 36, 461–465.
15. Liu Y. i wsp.: Influenza A virus receptors in the respiratory and intestinal tracts of pigeons. Avian Pathol. 2009, 38, 263-266.
16. Meissner W. i Bzoma S.: Pierwsze lęgi bernikli kanadyjskiej *Branta canadensis* w Polsce oraz problemy związane ze wzrostem jej liczebności na świecie. Not. Ornitol. 2009, 50, 21-28.
17. Minta Z. i wsp.: Wysoce zjadliwa grypa ptaków H5N1 u dzikich ptaków w Polsce - analiza pierwszych przypadków. Medycyna Weter. 2007, 63, 1349-1352.
18. Munster V.J. i wsp.: Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. PLoS Pathogens 2007, 11, e61.
19. Nagy A. i wsp.: Highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in Mute swans in the Czech Republic. Vet. Microbiol. 2007, 120, 9-16.

20. Niqueux E. i wsp.: Presence of serum antibodies to influenza A subtypes H5 and N1 in swans and ibises in French wetlands, irrespective of highly pathogenic H5N1 natural infection. *Avian Dis.* 2010, 54, 502-508.
21. Pybus O.G. i wsp.: The ecology and age structure of a highly pathogenic avian influenza virus outbreak in wild mute swans. *Parasitology* 2012, 139, 1914-1923.
22. Sims L. D., Brown I.H.: Multicontinental epidemic of H5N1 HPAI virus (1996–2007). W: *Avian influenza*, 1st ed. D. E. Swayne, 2008, ed. Blackwell Publishing Ames, IA.
23. Song M.S.: Ecology of H3 avian influenza viruses in Korea and assessment of their pathogenic potentials. *J. Gen. Virol.* 2008, 89, 949–957.
24. Songserm T. i wsp.: Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 681–683.
25. Śmietanka K., Minta Z.: Wirusy grypy ptaków - molekularne determinanty patogenności, lekooporności i adaptacji do organizmu gospodarza. *Medycyna Weter.* 2011, 67, 372-375.
26. Śmietanka i wsp., 2009: Przypadki wysoce zjadliwej grypy ptaków H5N1 w Polsce w 2007 roku. *Medycyna Weter.* 2009, 65, 115-118.
27. Werner O. i wsp.: Minute excretion of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) from experimentally infected domestic pigeons (*Columba livia*) and lack of transmission to sentinel chickens. *J. Gen. Virol.* 2007, 88, 3089–3093.
28. Xu X. i wsp.: Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 1999, 261, 15–19.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Po ukończeniu studiów na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie w 2000 r. podjąłem pracę w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – PIB w Puławach pod kierownictwem prof. dr hab. Zenona Minty. W pierwszym okresie pracy włączyłem się w działalność naukowo-badawczą związaną z zakaźnym zapaleniem torby Fabrycjusza (chorobą Gumboro) kurcząt (IBD), co wynikało w dużej mierze z aktywnego uczestnictwa Zakładu w programie unijnym COST 828 „Immunosuppressive viral diseases of poultry” („Immunosupresyjne choroby drobiu”). W tym okresie byłem odpowiedzialny m.in. za eksperymentalne zakażenia kurcząt SPF krajowymi izolatami IBDV o różnej zjadliwości, oceną kliniczną oraz anatomo-patologiczną zmian indukowanych przez te wirusy oraz przygotowaniem materiału do jego dalszej charakterystyki antygenowej molekularnej. Głównym osiągnięciem w tym okresie było opisanie nowej grupy genetycznej wirusów IBD, którą tworzą szczepy izolowane na przełomie lat 70/80-tych XX wieku w Polsce i na Węgrzech. Uczestniczyłem również w zastosowaniu metody analizy restrykcyjnej (REA) do różnicowania zjadliwości izolatów IBDV oraz przy produkcji przeciwciał monoklonalnych dla IBDV. W 2004 roku wziąłem udział w tygodniowym szkoleniu (Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Wirusologii, Lipsk, prof. H. Müller) w zakresie metody real time RT-PCR do wykrywania wirusów IBD oraz wykorzystania metody REA i sekwencjonowania w ich dalszej charakterystyce.

Badania nad IBD zbiegły się w czasie z nawrotem epidemii zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy kur (infectious laryngotracheitis, ILT). Brałem aktywny udział w rozpoznaniu tych przypadków u kur niosek towarowych i kur stad reprodukcyjnych oraz dokonałem wstępnej charakterystyce izolatów.

Również od początku pracy brałem udział w badaniach nad wirusami grypy ptaków (AI) i rzekomego pomoru drobiu (ND). Od 2003 roku moja główna uwaga skupiona była nad zagadnieniami związanymi z ND, gdyż ta jednostka chorobowa była tematem mojej pracy doktorskiej, którą obroniłem w 2007 r. Temat dotyczył zastosowania metod biologii molekularnej do diagnostyki ND oraz molekularnej analizy krajowych szczepów NDV izolowanych w latach 1970-2005 od kur, indyków i gołębi. W mojej pracy wdrożyłem do rutynowego stosowania metodę RT-PCR (należy podkreślić, że jest ona wykorzystywana do dziś w ramach działalności usługowej i referencyjnej Zakładu) oraz dokonałem klasyfikacji krajowych izolatów na 3 grupy: do pierwszej z nich (określanej w nomenklaturze jako grupa 2) zaliczyłem wirusy lentogeniczne izolowane od kurcząt i indyków od początku lat 90-tych. Jedyny zarchiwizowany wirus welogeniczny z 1970 r. należał do grupy 3b, a grupa 4b objęła wirusy wykryte u gołębi w latach 1988-2005. W odniesieniu do izolatów z grupy 2 udało się ustalić, że wszystkie stanowią jednorodną grupę pochodzącą od wirusa szczepionkowego typu LaSota i ich cykliczne wykrywanie u kurcząt brojlerów jest związane z masowym stosowaniem szczepień. Z kolei stwierdzenie obecności tych wirusów również w stadach nieszczepionych świadczy o tym, że szczepy „La Sota-podobne” których źródłem są żywe szczepionki, mogą krążyć pomiędzy fermami drobiu. W swojej pracy postulowałem potrzebę stałego monitorowania sytuacji w tym zakresie, gdyż w efekcie niekontrolowanej cyrkulacji wirusów (nawet szczepionkowych) może dojść do powstania mutacji w RNA, prowadzących do negatywnych konsekwencji epidemiologicznych. Badania nad rzekomym pomorem drobiu kontynuowałem w kolejnych latach. Ich wymiernym efektem jest m.in. pierwsze w Polsce wykrycie atypowego wirusa ND u gołębi oraz kierowanie dwoma projektami badawczymi: „Wrażliwość różnych gatunków drobiu na zakażenie wariantem gołębiem wirusa rzekomego pomoru drobiu” (MNiSW, 2010-2013) oraz „Opracowanie i wdrożenie technologii produkcji szczepionki wektorowej przeciwko chorobie Newcastle u kur” (NCBiR, 2012-2015).

Jeszcze podczas pracy nad doktoratem zająłem się tematyką, która zdominowała moją późniejszą aktywność naukową, czyli grypą ptaków. Należy podkreślić, że mój pierwszy, chociaż epizodyczny kontakt z tym zagadnieniem, miał miejsce na samym początku mojej kariery zawodowej, kiedy uczestniczyłem w pionierskich w skali kraju badaniach seroepidemiologicznych dotyczących zakażeń wirusem grypy drobiu w rodzimych stadach kur i indyków. W kolejnych latach uczestniczyłem we wdrażaniu metod biologii molekularnej do diagnostyki AI oraz programu nadzoru nad grypą w populacji drobiu i ptaków dzikich w Polsce. Niezwykle istotnym momentem zwrotnym był rok 2005, kiedy wirus H5N1 zaczął stwarzać poważne zagrożenie dla Europy (ostatecznie pojawił się w Europie jesienią tego roku), ja natomiast nadzorowałem dużą

część badań dzikich ptaków i drobiu, od których próbki trafiały do Zakładu Chorób Drobiu, które krótko przedtem uzyskało status laboratorium referencyjnego ds. AI.

Punktem kulminacyjnym mojej działalności w tym okresie były lata 2006-2007, kiedy odegrałem znaczącą rolę w rozpoznaniu pierwszych przypadków HPAI/H5N1 w kraju. Godny podkreślenia jest fakt, że szybka i skuteczna diagnostyka grypy ptaków odbyła się dzięki wprowadzeniu do rutynowego stosowania metod biologii molekularnych, walidację których nadzorowałem, potwierdzając ich przydatność.

Badania nad grypą, które kontynuowałem po 2007 r. (rok uzyskania doktoratu), są tematem habilitacji i zostały szczegółowo opisane w pierwszej części autoreferatu. Nie uwzględniłem jednak w tym opisie szeregu opublikowanych badań, w których mój udział był drugorzędny. Należą tutaj badania dotyczące przeżywalności wirusa H5N1 w środowisku wodnym (Domańska i wsp., 2010), analiza epidemii HPAI w Europie w szerszym kontekście (Harder i wsp., 2009; Haase i wsp., 2010), jak również dalsze doskonalenie metod diagnostyki grypy, w tym zastosowanie metody MSSCP oraz one-step RT-PCR (Gromadzka i wsp., 2008; Nidzworski i wsp., 2013).

Z innych badań w zakresie awiopatologii, w których uczestniczyłem, zaliczyć należy współudział w wykryciu tzw. wariantu chińskiego (QX) wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur (IB) oraz analiza filogenetyczna szczepów IBV izolowanych w latach 1997-2006 jak również badania nad adenowirusem powodującym wrzodziejące zapalenie żołądka mięśniowego (ang. gizzard erosions – GE).

W 2011 r. podjąłem nowe wyzwanie w mojej karierze zawodowej, które wiązało się z częściową zmianą profilu badawczego. Nie rezygnując z pracy w Zakładzie Chorób Drobiu (jednak ograniczając zakres obowiązków), podjąłem pracę w Zakładzie Epidemiologii i Oceny Ryzyka PIWet-PIB jako kierownik tej jednostki. W mojej nowej pracy staram się połączyć wiedzę ekspertów reprezentujących różne, pozornie odległe dziedziny, takie jak np. epidemiologia, wirusologia, ornitologia, a przede wszystkim matematyka i statystyka. Częściowo korzystam z już zdobytych doświadczeń w Zakładzie Chorób Drobiu. Wymiernym efektem jest realizowany od 2012 r. projekt badawczy finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Ocena ryzyka introdukcji i rozprzestrzenienia wirusów grypy ptaków w Polsce”, który polega m.in. na ocenie roli kaczek krzyżówek w epidemiologii grypy ptaków w oparciu o badania telemetryczne (śledzenie szybkości i kierunków przemieszczeń kaczek przy użyciu nadajników GPS/GSM). Nadzoruję również proces wdrażania narzędzi geograficznego systemu informacji (GIS) w badaniach epidemiologicznych oraz zastosowania modeli matematycznych do oceny ryzyka wprowadzenia chorób zakaźnych do Polski za pośrednictwem importu. Ponadto analizuję wyniki badań zgromadzone w centralnej bazie danych CELAB.

**6. Sumaryczne podsumowanie dorobku naukowego
(szczegółowy wykaz znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o
przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego)**

Czasopismo (alfabetycznie)	Rok publikacji	Liczba publikacji	Impact Factor w roku publikacji	Sumaryczny Impact Factor
Acta Veterinaria Hungarica	2013	1	1,173	1,173
Archives of Virology	2004	1	2,159	2,159
Avian Diseases	2010	2	1,623	3,246
	2011	1	1,462	1,462
Avian Pathology	2011	1	1,711	1,711
Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy	2002	1	0,244	0,244
	2003	2	0,190	0,380
	2005	1	0,290	0,290
	2006	3	0,402	1,206
	2007	1	0,273	0,273
2008	1	0,337	0,337	
Central European Journal of Biology	2013	1	1,0	1,0
Emerging Infectious Diseases	2009	1	6,794	6,794
Infection Genetics and Evolution	2010	1	3,086	3,086
Molecular and Cellular Probes	2008	1	2,196	2,196
Polish Journal of Veterinary Sciences	2011	1	0,565	0,565
	2012	1	0,565	0,565
Poultry Science	2011	1	1,728	1,728
Veterinary Microbiology	2012	1	3,327	3,327
	2013	1	3,327	3,327
Veterinary Record	2006	1	1,540	1,540
Ogółem liczba publikacji w czasopismach z listy JCR				25
Ogółem liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR oraz monografii i rozdziałów w książkach				44
Ogółem liczba komunikatów konferencyjnych				64
Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)				36,609
Sumaryczny IF przed uzyskaniem doktoratu				6,092
Sumaryczny IF po uzyskaniu doktoratu				30,517
Liczba cytowań (bez autocytowań) wg Web of Science				78
Indeks Hirscha wg Web of Science				5

Krzysztof Śmietanka