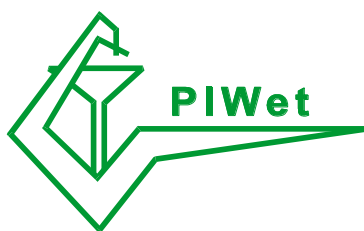


**dr n. wet. Grzegorz Jan Woźniakowski**

Państwowy Instytut Weterynaryjny

Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Chorób Wirusowych Drobiu



## **Autoreferat**

**„Zastosowanie metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej do  
identyfikacji i analizy herpeswirusów ptaków”**

**Puławy, styczeń 2015**

## SPIS TREŚCI

|                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Życiorys naukowy .....                                                                                                                                                                               | 3  |
| 1.1. Wykształcenie.....                                                                                                                                                                                 | 3  |
| 2. Przebieg pracy naukowo-badawczej .....                                                                                                                                                               | 4  |
| 3. Osiągnięcie 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.)..... | 9  |
| 3.1. Wstęp .....                                                                                                                                                                                        | 10 |
| 3.2. Cel pracy .....                                                                                                                                                                                    | 11 |
| 3.3. Omówienie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników .....                                                                                                                                        | 11 |
| 3.4. Wnioski .....                                                                                                                                                                                      | 22 |
| 4. Ważniejsze osiągnięcia w zakresie badań prowadzonych poza zgłaszanym cyklem tematycznym .....                                                                                                        | 22 |
| 4.1. Choroba Mareka (MD) .....                                                                                                                                                                          | 22 |
| 4.2. Choroba Derzsy'ego .....                                                                                                                                                                           | 26 |
| 4.3. Cirkowirusy gęsi.....                                                                                                                                                                              | 30 |
| 4.4. Parwowirusy u kur.....                                                                                                                                                                             | 31 |
| 4.5. Reowirusy i polyomawirusy ptaków .....                                                                                                                                                             | 32 |
| 4.6. Identyfikacja pasożytów z rodzaju <i>Nosema</i> u pszczoł miodnych metodą LAMP.....                                                                                                                | 36 |
| 4.7. Piśmienictwo związane z tematyką badań.....                                                                                                                                                        | 37 |
| 5. Podsumowanie dorobku naukowego .....                                                                                                                                                                 | 40 |
| 6. Recenzje publikacji naukowych.....                                                                                                                                                                   | 41 |
| 7. Realizowane projekty badawcze .....                                                                                                                                                                  | 41 |
| 8. Staże naukowe, kursy .....                                                                                                                                                                           | 42 |
| 9. Nagrody i wyróżnienia krajowe i międzynarodowe .....                                                                                                                                                 | 43 |
| 10. Przynależność do towarzystw i organizacji naukowych .....                                                                                                                                           | 44 |
| 11. Promotorstwo pomocnicze .....                                                                                                                                                                       | 45 |
| 12. Uczestnictwo w konferencjach krajowych i zagranicznych .....                                                                                                                                        | 45 |

## 1. Życiorys naukowy

Grzegorz Jan Woźniakowski

Państwowy Instytut Weterynaryjny

Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Chorób Wirusowych Drobiu

Al. Partyzantów 57

24-100 Puławy

grzegorz.wozniakowski@piwet.pulawy.pl

tel. +48 889 33 70, fax. +48 81 886 25 95

### 1.1. Wykształcenie

| <i>Miesiąc, rok</i>             | <i>Dyplom/Stopień naukowy</i>                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wrzesień 2001-<br>czerwiec 2006 | <b>Studia magisterskie na kierunku biologia specjalność mikrobiologia,</b><br>Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej<br>w Lublinie                                                                                         |
| Czerwiec 2006                   | <b>Magister biologii, specjalność Mikrobiologia</b><br>Praca magisterska pt.: „Analiza filogenetyczna mikrosymbiontów<br><i>Genista tinctoria</i> na podstawie metody RFLP 16S rDNA”. Uniwersytet<br>Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie                  |
| Lipiec 2006                     | <b>Dyplom ukończenia studiów podyplomowych:</b> „Zarządzanie Jakością<br>w Produkcji Żywności”. Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział<br>Nauk o Żywności i Biotechnologii.                                                                         |
| Kwiecień 2012                   | <b>Doktor nauk weterynaryjnych</b><br>Rozprawa doktorska pt: „Występowanie i analiza molekularna<br>wybranych genów wirusa choroby Mareka w przebiegu zakażenia<br>kurcząt”. Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut<br>Badawczy w Puławach |

## Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

| Miesiąc, rok       | Sprawowane stanowisko, nazwa jednostki naukowej                                                        |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 02.2007-04.2010    | Specjalista inżynierijno-techniczny, Zakład Chorób Wirusowych Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny |
| 05.2010-09-09.2012 | Asystent, Zakład Chorób Wirusowych Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny                            |
| Od 10.2012         | Adiunkt, Zakład Chorób Wirusowych Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny                             |

## 2. Przebieg pracy naukowo-badawczej

Pracę naukowo-badawczą rozpocząłem w 2005 roku pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Małek, kierownika ówczesnego Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Głównym zagadnieniem badawczym w ramach działalności Zakładu były badania prowadzone w celu identyfikacji i różnicowania bakterii brodawkowych z rodzaju *Rhizobium*, *Mesorhizobium* i *Bradyrhizobium* tworzących układy symbiotyczne z roślinami zasiedlającymi gleby ubogie w przyswajalne formy azotu, takie jak: azotany, azotyny czy sole amonowe. Prowadzone przeze mnie badania w ramach pracy magisterskiej związane były z działalnością Zakładu i oceną zróżnicowania genu kodującego 16S rRNA pośród mikrosymbiontów Janowca Barwierskiego (*Genista tinctoria*) rosnącego na terenie Polski, Anglii oraz Ukrainy. Podjęte badania filogenetyczne prowadzono przy wykorzystaniu metody PCR-RFLP (technika łańcuchowej reakcji polimerazy połączona z analizą restrykcyjną uzyskanych produktów) dla 16S rDNA bakterii pochodzących z różnych regionów geograficznych. Użyto pięciu enzymów restrykcyjnych: *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *MspI* i *RsaI*. Dodatkowo przeprowadzono eksperymentalne badania nad zdolnością tworzenia brodawek korzeniowych u Janowca Barwierskiego przez mikrosymbionta *Phyllobacterium trifolii*, w celu określenia ich zdolności do infekowania włóśników korzeniowych tej rośliny. Wynikiem przeprowadzonej analizy 16S rDNA (PCR-RFLP) były profile fragmentów restrykcyjnych, pozwalające na identyfikację izolatów bakteryjnych pozyskanych z brodawek korzeniowych *G.tinctoria* do poziomu rodzaju i gatunku. Uzyskane wyniki przeprowadzonej analizy filogenetycznej pozwoliły na stwierdzenie wysokiego podobieństwa sekwencji 16S rDNA niezależnie od pochodzenia

geograficznego izolatów mikrosymbiontów. Porównując wzory restrykcyjne 16S rDNA badanych izolatów z wzorami szczepów referencyjnych mikrosymbiontów stwierdzono, że należą one do rodzaju *Bradyrhizobium* i potwierdzono skuteczność wykorzystanej metody PCR-RFLP do identyfikacji i różnicowania bakterii brodawkowych na poziomie rodzaju. W celu bardziej dogłębnej analizy filogenetycznej mikrosymbiontów roślin motylkowatych korzystniejszą metodą jest sekwencjonowanie specyficznych gatunkowo sekwencji DNA. Z kolei przeprowadzone próby zakażenia włośników *G.tinctoria* przez bakterię *Phyllobacterium trifolii* subsp. PETP02<sup>T</sup> wykazały brak jej zdolności do tworzenia brodawek na korzeniach tej rośliny. Badania zostały przedstawione w pracy magisterskiej pt.: „Analiza filogenetyczna mikrosymbiontów *Genista tinctoria* na podstawie metody RFLP 16S rDNA”, którą obroniłem w czerwcu 2006 roku z wynikiem bardzo dobrym.

Po uzyskaniu tytułu magistra w lutym 2007 roku zostałem zatrudniony na stanowisku specjalisty inżynierjno-technicznego w Zakładzie Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Moje badania naukowe prowadzone pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Samorek-Salamonowicz dotyczyły opracowania i doskonalenia metod diagnostyki i analizy molekularnej choroby Mareka u kur oraz patogenezы chorób drobiu wodnego, takich jak: choroba Derzsy’ego, czy cirkowiroza u gęsi i kaczek piżmowych. Prowadzone przeze mnie badania były początkowo skupione nad techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz jej modyfikacjami, takimi jak: multiplex-PCR, czy touchdown-PCR a następnie po odbytym stażu zagranicznym w Lohmann Animal Health w Cuxhaven w Niemczech nad metodą PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Nabyte doświadczenie oraz wstępne wyniki badań pozwoliły mi w 2010 roku na otwarcie przewodu doktorskiego, którego promotorem była prof. Elżbieta Samorek-Salamonowicz i dalszą realizację badań nad występowaniem i charakterystyką onkogenów krajowych szczepów wirusa choroby Mareka za pomocą opracowanych metod biologii molekularnej, takich jak PCR, real-time PCR oraz amplifikacji w warunkach stałej temperatury (LAMP). Dzięki uzyskaniu w 2009 roku stypendium FEMS Research Fellowship w Freie Universität Berlin możliwa była realizacja badań nad konstrukcją rekombinowanej szczepionki przeciwko chorobie Mareka opartej na sztucznym chromosomie bakteryjnym (BAC) zawierającym DNA delecyjnego terenowego szczepu o wysokiej zjadliwości, pozbawionego onkogenów *meq* oraz wirusowej telomerazy (*vTR*). Pierwszy etap badań w

ramach pracy doktorskiej zrealizowano po opracowaniu metody LAMP i identyfikacji 98 materiałów pozyskanych od ptaków wykazujących objawy kliniczne MD. Następnie w celu spełnienia przyjętych zasad w wirusologii weterynaryjnej ze wszystkich tych materiałów izolowano szczepy MDV. Wyniki potwierdzono metodą immunofluorescencji pośredniej. W dalszej części rozprawy doktorskiej opracowano kilka metod PCR oraz real-time PCR do wykrywania i różnicowania szczepów MDV, a następnie do określenia występowania genów ICP4, pp38, *meq*, LAT i L-*meq* szczepów należących do serotypu 1 i SORF1 szczepów serotypu 3. Wyniki badań wykazały obecność genów ICP4, pp38, *meq* i LAT charakterystycznych dla zjadliwych szczepów MDV. Ponadto w 26 izolatach oprócz onkogenów specyficznych dla MDV stwierdzono obecność genu SORF1 charakterystycznego dla szczepu FC126 HVT stosowanego, w profilaktyce MD dla kurcząt brojlerów, natomiast w 33 izolatach oprócz onkogenów MDV występował gen L-*meq* obecny w genomie szczepu szczepionkowego CVI988/Rispens. Opracowana technika real-time PCR oprócz możliwości szybkiego różnicowania szczepów MDV pozwoliła na określenie liczby kopii onkogenów w badanych szczepach. Przeprowadzona analiza sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej onkogenu *meq* MDV szczepów terenowych MDV wykazała występowanie motywów sekwencji charakterystycznych dla szczepów o podwyższonej patogenności (vvMDV i vv+MDV). Z kolei analiza sekwencji aminokwasowej białka Meq wykazała występowanie specyficznej substytucji fenyloalaniny w serynę w pozycji 32, delecji proliny, kwasu glutaminowego i lizyny w pozycjach 33, 42 i 39 oraz insercji kwasu glutaminowego w pozycji 52 łańcucha aminokwasowego. Mutacje te były również obecne w sekwencjach aminokwasowych szczepów referencyjnych o podwyższonej patogenności. Wykazano też występowanie insercji fragmentu LTR retrowirusów u 8 izolowanych obecnie szczepów MDV. Ważną częścią podjętych w ramach pracy doktorskiej badań było też otrzymanie BAC klonu zjadliwego szczepu delecyjnego, pozbawionego dwóch ważnych onkoprotein *meq* i vTR. Skonstruowany BAC klon został użyty do przygotowania szczepionki przeciwko MD, którą użyto do uodpornienia piskląt. Wyniki badań wykazały, że szczepionka była nieszkodliwa dla kurcząt i zapewniła protekcję po zakażeniu szczepem zjadliwym vv+MDV.

Rozprawę doktorską obroniłem 16 kwietnia 2012 roku. Recenzenci wnioskowali o nagrodzenie pracy.

Przeprowadzone badania w ramach rozprawy doktorskiej opublikowano częściowo w czterech publikacjach o zasięgu międzynarodowym, których jestem głównym autorem.

*Praca została nagrodzona przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych jako najlepsza rozprawa doktorska w roku 2012.*

## **Publikacje**

- 1) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Occurrence of main Marek's disease genes during infection of chickens. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2010, 54, 123-127, **IF<sub>2010</sub>=0,321, MNiSW=20 pkt**
- 2) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Sequence analysis of meq oncogene among Polish strains of Marek's disease. **Pol J Vet Sci**, 2010, 13, 263-267, **IF<sub>2010</sub>=0,507, MNiSW=20 pkt**
- 3) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens. **Acta Vet Scand**, 2011, 53:10, **IF<sub>2011</sub>=1,367, MNiSW=27 pkt**
- 4) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Rapid detection of Marek's disease virus in feather follicles by loop-mediated amplification. **Avian Dis** 2011, 55, 462-467, **IF<sub>2011</sub>=1,462 MNiSW=32 pkt**

Wyniki badań były również prezentowane w trzech rozdziałach monograficznych o tematyce chorób drobiu oraz w formie siedmiu doniesień ustnych i plakatowych podczas konferencji krajowych i zagranicznych.

## **Rozdziały w monografiach**

- 1) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. „New recombinants of Marek's disease virus field strains with insertion of sequence from avian retroviruses”. Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology. **Monografia, SGGW**, Warszawa, s. 148-151

- 2) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Nowe metody szybkiego wykrywania zjadliwych szczepów wirusa choroby Mareka”. **Aktualne problemy w patologii drobiu. Monografia, Wrocław**, s. 114
- 3) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz E, W. Kozdruń. Lokalizacja wirusa choroby Mareka w tkankach kurcząt szczepionych przeciwko chorobie Mareka. **Aktualne problemy w patologii drobiu. Monografia, Wrocław 2011**, s. 90-93

#### **Doniesienia na konferencje naukowe**

- 1) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Preparation of the Polish Marek’s disease field strains for the construction of deletive BAC clones. **Abstracts oral and poster presentations of 4<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE**, 2010, Saint Malo, France, p. 100
- 2) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. BAC DNA of recombinant Marek’s disease virus confers protection against very virulent plus strain of MDV. **Proceedings of 5<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE “Science on alert”**, Arnhem, Netherlands, p.43
- 3) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz. New chimeric field strains of Marek’s disease in Poland. **36<sup>th</sup> Proceedings of Annual International Herpesvirus Workshop**, Gdańsk, p. 814
- 4) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Influence of FC126 (HVT) and Rispens strain on the virulent MDV-1 replication. **The 5<sup>th</sup> International Workshop of the Molecular Pathogenesis of Marek’s Disease Virus and 1<sup>st</sup> Symposium of Avian Herpesviruses**. The University of Georgia, Athens, Georgia, USA, 2010, p. 25
- 5) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Rapid detection of Marek’s disease virulent virus by loop-mediated amplification (LAMP). **The 5<sup>th</sup> International Workshop of the Molecular Pathogenesis of Marek’s Disease Virus and 1<sup>st</sup> Symposium of Avian Herpesviruses**. The University of Georgia, Athens, Georgia, USA, 2010, p. 99
- 6) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Occurrence of new virulent strains of Marek’s disease in Poland. **5<sup>th</sup> EPIZONE Theme 5 meeting**, 2010, Copenhagen, p. 26
- 7) **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Comparison of loop mediated amplification (LAMP) and PCR as a rapid tools for the detection of Marek’s disease virus. **5<sup>th</sup> EPIZONE Theme 5 meeting, 2010**, Copenhagen, p.30



### **3. Osiągnięcie 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.)**

Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „Zastosowanie metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej do identyfikacji i analizy herpeswirusów ptaków”.

Cykl publikacji obejmuje 6 prac umieszczonych w bazie danych JCR o łącznym IF=10,17 punkty MNiSW = 150 pkt. Oświadczam, że w przedstawionych publikacjach opisane badania były moją autorską koncepcją, we wszystkich publikacjach byłem autorem tekstu, autorem korespondencyjnym i głównym wykonawcą badań. Przedstawione publikacje podlegały rygorystycznym recenzjom w celu spełnienia szczegółowych wymagań recenzentów. Swój udział w powstanie i opublikowanie przedstawionych prac oceniam na 80-95%.

**1) G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and polymerase chain reaction (PCR) for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotype 1,2 and 3. **Avian Dis.** 2013, 57, 539-543. **IF<sub>2012</sub>=1,73. Punkty MNiSW<sub>2013</sub>=35.** Mój wkład w autorstwo to 80% - koncepcja badań, planowanie i wykonanie doświadczeń, analiza i podsumowanie wyników oraz napisanie pracy naukowej.

**2) G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz. Direct detection of Marek's disease virus in poultry dust by loop-mediated isothermal amplification. **Arch Virol.** 2014, DOI 10.1007/s00705-014-2157-5. **IF<sub>2013</sub>=2,28. Punkty MNiSW<sub>2013</sub>=20.** Mój wkład w autorstwo to 95% - koncepcja badań, planowanie i wykonanie doświadczeń, analiza i podsumowanie wyników oraz napisanie pracy naukowej.

**3) G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz. *In vitro* replication of recombinant Marek's disease viruses constructed from strains lacking meq and vTR oncogenes. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2013, 57, 141-147. **IF<sub>2013</sub>=0,37. Punkty MNiSW<sub>2013</sub>=20.** Mój wkład w autorstwo to

90% - koncepcja badań, planowanie i wykonanie doświadczeń, analiza i podsumowanie wyników oraz napisanie pracy naukowej.

**4) G. Woźniakowski,** E. Samorek-Salamonowicz, P. Szymański, P. Wencel , M. Houszka. Phylogenetic analysis of Columbidae herpesvirus-1 in rock pigeons, birds of prey and non-raptorial birds in Poland. **BMC Vet Res.** 2013, 9:52, IF<sub>2012</sub>=**2,00**. Punkty MNiSW<sub>2013</sub>-**35**. Mój wkład w autorstwo to 85% - koncepcja badań, planowanie i wykonanie doświadczeń, analiza i podsumowanie wyników oraz napisanie pracy naukowej.

*Praca nagrodzona nagrodą II stopnia Dyrektora PIWet za najlepszą publikację w roku 2013.*

**5) G. Woźniakowski,** P. Wencel, E. Samorek-Salamonowicz. Detection of CoHV-1 by loop-mediated amplification (LAMP). Application of LAMP for CoHV-1 incidence monitoring in domestic pigeons. Lett Appl Microbiol 2014, doi:10.1111/lam.12317 IF<sub>2013</sub>=**1,74**. Punkty MNiSW<sub>2013</sub>-**20**. Mój wkład w autorstwo to 90% - koncepcja badań, planowanie i wykonanie doświadczeń, analiza i podsumowanie wyników oraz napisanie pracy naukowej.

**6) G. Woźniakowski,** E. Samorek-Salamonowicz. First survey of the occurrence of duck enteritis virus (DEV) in free-ranging Polish water birds. **Arch Virol.** 2013 DOI:10.1007/s00705-013-1936-8 IF<sub>2012</sub>=**2,03**. Punkty MNiSW<sub>2013</sub>-**20**. Mój wkład w autorstwo to 95% - koncepcja badań, planowanie i wykonanie doświadczeń, analiza i podsumowanie wyników oraz napisanie pracy naukowej.

### **3.1. Wstęp**

Przemysł drobiarski w Polsce ulega stałemu i szybkiemu rozwojowi. Szacowana produkcja mięsa drobiowego w Polsce według Krajowej Rady Drobiarstwa (KRD) wynosi około 1,5 mln ton rocznie. W odniesieniu do drobiu grzebiącego podczas ostatnich 4 lat wylężono 2985,6 mln piskląt brojlerów, 109692 tyś. piskląt przeznaczonych na stada nieśne oraz 40190,4 tyś. piskląt ogólnoużytkowych. Co więcej obserwuje się coroczny wzrost produkcji kurcząt o kilka procent. Jeszcze większe znaczenie ma hodowla drobiu wodnego. Polska zajmuje obecnie drugie miejsce w produkcji piskląt gęsich w Unii Europejskiej z roczną produkcją 4,6 mln szt., natomiast w skali światowej Polska produkcja gęsi stanowi 3%. W roku 2013 zaobserwowano 63% wzrostu wylęgu gąsiąt w stosunku do ubiegłego roku wskazując na istotne znaczenie produkcji drobiu wodnego dla gospodarki rynkowej w Polsce.

Większość krajowej produkcji jest przeznaczona na eksport. Tuszki gęsie są eksportowane w 95% do Niemiec oraz Anglii i Danii, natomiast puch i pierze do Szwajcarii, USA, Japonii i Tajlandii.

Bardzo duże znaczenie dla zachowania odpowiedniej dynamiki produkcji drobiarskiej mają biopreparaty i szczepionki ochronne, jak również skuteczna diagnostyka laboratoryjna. Występowanie chorób wirusowych drobiu stanowi ważny problem również biorąc pod uwagę epidemiologiczne aspekty szerzenia się zakażeń pomiędzy ptakami wolno żyjącymi a drobiem hodowlanym. Diagnostyka oraz badanie etiologii chorób wirusowych ptaków stanowią istotne ekonomiczne zagadnienie. Pod szerokim określeniem „ptaki” używanym w ramach niniejszego opracowania należy rozumieć nie tylko drób grzebiący i wodny, lecz również gołębie i ptaki drapieżne, takie jak: sokół wędrowny, jastrząb gołębiarz, czy myszołów. Badanie materiału pochodzącego od padłych ptaków wolno żyjących ma swoje uzasadnienie biorąc pod uwagę fakt, iż bardzo często są one rezerwuarem zakażeń wirusowych. Dowodem tego stwierdzenia są badania dotyczące transmisji wielu różnych czynników patogennych ze szczególnym uwzględnieniem herpeswirusów. Istnieją bowiem dowody na transmisję wirusa choroby Mareka, będącego czynnikiem etiologicznym nowotworowej choroby drobiu grzebiącego pomiędzy bażantami a kurami domowymi. W przypadku ptaków drapieżnych, których ofiarami są często zasiedlające szerokie nisze geograficzne gołębie możliwa jest również transmisja zakażeń o etiologii herpeswirusowej.

### **3.2. Cel pracy**

Celem przedstawionych w ramach osiągnięcia naukowego badań było opracowanie i zastosowanie metod biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej do identyfikacji i analizy herpeswirusów ptaków.

### **3.3. Omówienie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników**

Jednym z największych problemów ekonomicznych w hodowli kur, indyków i przepiórek japońskich jest choroba Mareka (MD) [5,8,30]. Biorąc pod uwagę straty ekonomiczne, powodowane przez MD, które na całym świecie wynoszą rocznie około 2 mld dolarów bardzo istotna jest jej profilaktyka, która realizowana jest poprzez szczepienia ochronne. MDV należący do rodzaju *Mardivirus*, podrodziny *Alphaherpesvirinae*, reprezentowany jest przez trzy odrębne serotypy. Pomimo stosowania od ponad 40 lat

szczepień ochronnych dużym zagrożeniem są nowo pojawiające się szczepy o podwyższonej patogenności (very virulent vvMDV i very virulent plus vv+MDV) [27]. Serotypowanie oparte jest na różnicach występujących w ich antygenach powierzchniowych oraz we właściwościach biologicznych, takich jak wielkość tworzonych *in vitro* łysek, tempo replikacji oraz różnice w sekwencji i poziomie ekspresji głównych białek wirusowych. Szczepionki przeciwko MD zawierają najczęściej atenuowany szczep CVI988/Rispens, będący jak dotąd złotym standardem, szczep SB1, który nie jest dopuszczony do stosowania w wielu krajach Europy oraz szczep herpeswirusa indyków HVT FC126 [16]. Coraz częściej stosowane są szczepionki biwalentne, a nawet trójwalentne stanowiące mieszaninę serotypów I, II i III MDV. Równie często spotykane są przełamania protekcji poszczepiennej przez zjadliwe szczepy vv+MDV.

W związku z możliwością występowania wszystkich trzech serotypów u szczepionych i zakażonych kurcząt istotna jest ich skuteczna identyfikacja za pomocą nowej generacji metod biologii molekularnej. Wszystkie trzy serotypy MDV posiadają genomy o różnych wielkościach (od 159 do 180 kbp), w których kodowane są geny homologiczne, jak również unikalne dla danego serotypu. Różnice w budowie molekularnej wszystkich trzech serotypów MDV zostały użyte w podjętych w ramach cyklu badań do zaprojektowania i opracowania trzech niezależnych reakcji LAMP. Opisane poprzednio w literaturze badania wykazały, że metody takie jak PCR oraz real-time PCR pozwalają na identyfikację i różnicowanie szczepów MDV [1-3,13,17,22]. Pomimo wielkiej przydatności metod opartych na PCR bywają one niedostępne bądź też zbyt skomplikowane dla niektórych laboratoriów weterynaryjnych. Z tego względu przyszłość skutecznej diagnostyki MD oraz różnicowania serotypów MDV może zrewolucjonizować metoda LAMP, która nie wymaga rozbudowanego zaplecza laboratoryjnego [18-19,23-26,28,32]. W ostatnich kilku latach obserwuje się wyraźny wzrost zastosowania tej metody do szybkiej identyfikacji zarówno patogenów wirusowych, jak i bakteryjnych, grzybiczych oraz pasożytów ludzi, zwierząt i roślin. Przyczyną dużego zainteresowania metodą LAMP są jej walory ekonomiczne, ponieważ nie wymaga ona zastosowania termocyklerów a jedynie łaźni wodnej o stałej temperaturze około 60°C, natomiast wynik końcowy otrzymywany jest jako fluorescencja probówek zawierających DNA lub RNA badanego patogenu pod wpływem promieni ultrafioletowych (UV). Zasada jej działania oparta jest na właściwościach polimerazy DNA pozyskanej z bakterii *Bacillus smithi* lub *Bacillus stearothermophilus* [24,25]. Dzięki zaprojektowanym dwóm lub trzem parom

specyficznych starterów oligonukleotydowych możliwe jest uzyskanie bardzo wysokich koncentracji potomnych fragmentów DNA o stężeniu nawet 10 µg w czasie poniżej 1 godziny. Tak wysokie stężenie DNA po dodaniu interkalarnego barwnika, takiego jak SYBR Green®, czy GelRed™ prowadzi do zmiany zabarwienia mieszanin reakcyjnych zawierających specyficzny amplikon, a w promieniach UV do silnej iluminacji.

Przeprowadzone badania pozwoliły na optymalizację parametrów przebiegu wszystkich trzech metod LAMP. Wiarygodne wyniki uzyskiwano już po 30 min. w temperaturze 62,3°C. Stwierdzono, że metoda LAMP może działać przy użyciu 2 lub 3 par specyficznych starterów, jednakże trzecia para starterów tworząca dodatkowe pętle inicjowała dodatkowy etap amplifikacji, co w efekcie pozwoliło na skrócenie czasu analizy z 90 do 30 min. Oceny występowania DNA szczepów należącego do określonego serotypu dokonano na podstawie zielonej lub pomarańczowej fluorescencji probówek w zależności od użytego barwnika tj. SYBR Green® lub GelRed™. Czułość opracowanej metody określono, jako  $2\log_{10}$  PFU dla serotypu I oraz III (HVT) oraz  $3\log_{10}$  w przypadku szczepów należących do serotypu II. Ustalono też, że opracowane metody były specyficzne wyłącznie dla określonego serotypu i nie obserwowano niespecyficznych reakcji krzyżowych. W porównaniu do metody PCR opracowana metoda LAMP okazała się być bardziej czuła a różnice wynosiły od 1 do 2  $\log_{10}$  PFU. Jak wykazały dalsze badania szczepów terenowych należących do trzech różnych serotypów wyniki LAMP były w 100% zgodne z wynikami PCR, ponadto uzyskiwano je wielokrotnie szybciej, bez konieczności użycia termocyklera. Przedstawione badania świadczą, iż stosowanie nowych metod biologii molekularnej, takich jak LAMP w diagnostyce chorób wirusowych ptaków pozwala na znaczne oszczędności czasu oraz ogranicza koszty ich wykonania. (Praca nr 1 w ramach prezentowanego osiągnięcia).

Z uwagi na oryginalny model replikacji MDV w folikulach piór oraz siewstwo wirusa do otoczenia wraz z fragmentami naskórka i piór podjęto próbę wykorzystania opracowanej w poprzednim etapie badań metody LAMP do bezpośredniego wykrywania DNA tego wirusa. (Praca nr 2 w ramach prezentowanego osiągnięcia).

Produktywna faza repikacji MDV prowadząca do powstania w pełni zakaźnych cząstek wirusowych zachodzi w warstwie epitelialnej folikul piór (FFE). Wraz ze złuszczeniem naskórki zakażonych ptaków oraz fragmentami piór zakaźne cząstki MDV występują w pyłach i kurzu pomieszczeń hodowlanych. Cząstki MDV są obecne w komórkach folikul piór już w 7 dniu po zakażeniu [1,2,17]. Jak wykazały wcześniej

przeprowadzone badania kurzu pomieszczeń hodowlanych może zawierać cząstki wirusowe, które w sprzyjających warunkach środowiska pozostają zakaźne dla kurcząt i indyków nawet do kilku lat.

Przeprowadzone w ramach niniejszego osiągnięcia naukowego badania wykazały bardzo dużą odporność LAMP na inhibitory obecne w próbkach kurzu pomieszczeń hodowlanych. Stosowane dotychczas metody biologii molekularnej do identyfikacji zjadliwych szczepów MDV, takie jak PCR, czy real-time PCR wymagają izolacji wirusowego DNA. Etap ten jest konieczny aby wyeliminować obecne w materiale pochodzącym od ptaków inhibitory reakcji amplifikacji. Opracowaną metodę LAMP specyficzną dla zjadliwych szczepów MDV należących do serotypu I zastosowano do amplifikacji materiału genetycznego pochodzącego bezpośrednio z próbek kurzu pomieszczeń hodowlanych dla ptaków. Próbkę kurzu pochodziły z 12 ferm z których przysyłano ptaki do badania w kierunku MD. Kurz zbierano z powierzchni nawiewów powietrza, parapetów okien oraz podłóg. Badania przeprowadzone z użyciem metody LAMP i polimerazy *GspSSD* izolowanej z bakterii *Geobacillus sp.* wykazały obecność materiału genetycznego MDV w 11 na 12 badanych ferm kurzych. Co istotne, izolacja kwasu nukleinowego z próbek kurzu przesłanych do badań nie była konieczna. DNA z próbek kurzu otrzymano po zawieszeniu materiału w zbuforowanym roztworze soli fosforanowych (PBS) i inkubacji w temperaturze 95°C przez 5 min. a następnie krótkim odwirowaniu i dziesięciokrotnym rozcieńczeniu zawiesiny. Pozyskany supernatant stosowano bezpośrednio jako matrycę kwasu nukleinowego do metody LAMP. Pomimo niskiej koncentracji uzyskanego DNA zmierzonej przy różnicy fali świetlnej o długości  $\lambda=260/280$  nm wynoszącej od 7,9 do 27,5 nanograma (ng) i czystości równej 0,38 to 1,0 dzięki dużej odporności metody LAMP wynik pozytywny uzyskano w prawie 91% badanych próbek. Przy użyciu konwencjonalnej metody PCR nie było możliwe wykrycie wirusowego DNA w żadnej z badanych próbek kurzu. Otrzymane metodą LAMP amplikony sprawdzono podczas analizy temperatury topnienia produktów, która wykazała wspólny punkt topnienia przy 87,8°C. Uzyskane wyniki badań potwierdzają wcześniejsze doniesienia dotyczące przydatności kurzu pomieszczeń hodowlanych dla drobiu, jako dobrego źródła kwasu nukleinowego MDV. Badanie tego typu matrycy pozwala na stwierdzenie obecności zjadliwych szczepów MDV w środowisku ferm i podjęcie odpowiednich działań dezynfekcyjnych, jak również może dostarczyć informacji na temat dynamiki replikacji i siewstwa wirusa do otoczenia. Wyniki badań pozwalają na użycie w przyszłości metody

LAMP jako prostej techniki identyfikacji MDV w środowisku ferm bez zastosowania etapu izolacji materiału genetycznego wirusa i niedostępnych w prostych warunkach laboratoryjnych. termocyklorów do PCR.

Kontynuując badania nad zastosowaniem technik biologii molekularnej do analizy molekularnej MDV w odniesieniu do funkcji jego dwóch najważniejszych onkogenów, takich, jak onkoproteina Meq oraz wirusowa telomeraza (vTR) podjęto próbę otrzymania pięciu delecyjnych klonów MDV pozbawionych tych genów. Meq posiada motyw suwaka leucynowego b-ZIP (ang. zipper), który występuje u białek biorących udział w regulacji procesów komórkowych. Ta właściwość pozwala na tworzenie dimerów z innymi czynnikami regulującymi apoptozę [27]. Rola tego białka jest bardzo istotna w transformacji nowotworowej zakażonych komórek, co potwierdzono badaniami z zastosowaniem klonów delecyjnych pozbawionych fragmentu genu *meq*, jak również interferencji siRNA.

Z kolei telomeraza MDV jest kompleksem zbudowanym z RNA i białek [6]. Jedną z jej funkcji jest zachowanie stałej długości telomerów, które są ochronnymi odcinkami DNA, występującymi na końcach liniowych chromosomów [4,9,21]. Telomeraza wirusowa MDV (ang. viral telomerase - vTR) występuje w genomie MDV w 2 kopiach podobnie jak Meq. Pierwszym komponentem vTR jest odwrotna transkryptaza (ang. telomerase - reverse transcriptase - TERT) oraz telomeraza RNA (TR). Składnik TR działa, jako matryca dla aktywnej enzymatycznie podjednostki podczas wydłużania powtórzeń telomerów na końcach chromosomów [21]. W zdrowych, niezmiennych nowotworowo komórkach somatycznych jej aktywność jest niska, natomiast w tkankach objętych procesem nowotworowym wykazano jej nadekspresję.

Rozwój nowoczesnych technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwolił na badanie funkcji poszczególnych genów MDV. Technika klonowania kompletnych genomów MDV w sztucznym chromosomie bakteryjnym (BAC) jest obecnie najczęściej opisywaną metodą wykorzystywaną do tworzenia szczepów MDV pozbawionych genów związanych z replikacją, wnikaniem do komórki oraz onkogenezą MD [9,21,27,30]. Z kolei wykorzystanie techniki Red/ET zapożyczonej z faga lambda pozwoliło na dowolne kierunkowe modyfikacje genów MDV z wykorzystaniem konstruktów o sekwencji nukleotydowej komplementarnej do badanego genu. W tym celu wykorzystywane są komórki *E.coli* zawierające plazmid, na którym kodowane są geny faga lambda ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) biorące udział w rekombinacji Red/ET [30]. Przeprowadzone w ramach prezentowanego

cyklu badania miały na celu zastosowanie metody klonowania genomu pięciu terenowych szczepów MDV o różnej patogenności w sztucznym chromosomie bakteryjnym (BAC). Następnie w komórkach *E.coli* GS1783 posiadających plazmid pYEbac102, kodujący geny faga lambda, przeprowadzono etap homologicznej rekombinacji Red/ET z użyciem fragmentów dwuniciowego DNA o sekwencji komplementarnej do onkogenów *meq* i *vTR*. Pierwszym etapem badań było przeprowadzenie trzech szybkich pasaży wybranych szczepów terenowych MDV: 31/07, 23/07, 7/08, 12/09 i 42/09 w hodowlach fibroblastów zarodków kurzych (CEF). Z komórek zakażonych każdym z pięciu szczepów izolowano całkowity DNA. Następnie w celu identyfikacji wirusowego DNA przeprowadzono PCR ze starterami specyficznymi do sekwencji 132 bp, która występuje wyłącznie u szczepów MDV należących do serotypu 1 i pozwala na odróżnienie szczepów o niskiej patogenności od szczepów zjadliwych. Przeprowadzono transfekcję hodowli CEF wyizolowanym DNA szczepów terenowych oraz plazmidem pDS-pHA1 w celu otrzymania klonów BAC. Otrzymany materiał genetyczny pięciu klonów BAC wprowadzono poprzez elektroporację do komórek kompetentnych *E.coli* DH10B. Komórki bakterii wysiewano na podłoże LB z dodatkiem chloramfenikolu, co pozwoliło na wzrost kolonii zawierających jedynie klony BAC z wprowadzonym plazmidem pDS-pHA1 zawierającym gen oporności na ten antybiotyk (acetylotransferazę chloramfenikolu). Po namnożeniu rekombinowanych komórek *E.coli* przeprowadzano izolację BAC DNA, który trawiono przy użyciu endonukleaz *EcoRI* i *BamHI*. W ostatnim etapie badań przeprowadzono homologiczną rekombinację pomiędzy uzyskanymi klonami BAC oraz opracowanymi produktami PCR zawierającymi kompletne ramki odczytu genów oporności na antybiotyki – ampicylinę oraz kanamycynę. W ten sposób skonstruowano pięć rekombinowanych klonów BAC pozbawionych dwóch najważniejszych onkoprotein.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że pomimo usunięcia metodami inżynierii genetycznej genów *meq* i *vTR* nadal możliwe było odtworzenie szczepów delecyjnych MDV w hodowlach komórkowych CEF, co świadczy o zachowaniu ich zdolności do replikacji. Otrzymane klony delecyjne będą mogły być w przyszłości użyte jako prototypowa szczepionka DNA przeciwko MD. (Praca nr 3 w ramach prezentowanego osiągnięcia).

Równolegle w ramach realizowanych badań podjęto próbę opracowania metody real-time PCR do identyfikacji herpeswirusów występujących u gołębi i ptaków wolno żyjących na



terenie kraju oraz scharakteryzowanie ich właściwości molekularnych przez sekwencjonowanie produktów PCR specyficznych dla genu DNA-zależnej polimerazy DNA.

Herpeswirusy są mało jednorodną grupą wirusów i zakażają zarówno drób hodowlany, jak również wiele ptaków drapieżnych m.in. z rodziny Jastrzębiowatych (*Accipiteridae*), Sokołowatych (*Falconidae*), Sów (*Stigriiformes*) oraz przedstawicieli rodziny Papugowatych (*Psittacidae*) [12,20]. W hodowli drobiu grzebiącego największe znaczenie ekonomiczne ma opisana w poprzednich dwóch pracach choroba Mareka (MD) oraz zakaźne zapalenie krtani i tchawicy (ILT), u kacząt występuje wirusowe zapalenie jelit (DVE), u gołębi choroba Smadela (SD) objawiająca się jako zapalenie dróg oddechowych i spojówek oraz objawy porażenne [29].

Z kolei u ptaków drapieżnych i sów zakażenie herpeswirusami może przebiegać bezobjawowo, bądź też występują objawy porażenne [20]. Jako charakterystyczne zmiany anatomopatologiczne obserwowane są ciała wtrętowe w wątrobie i śledzionie widoczne jako drobne rozsiane punkty. Najważniejsze są jednak immunosupresyjne skutki zakażenia herpeswirusami, wklajające wtórne zakażenia cirko-, adeno- i paramyksowirusami lub innymi patogenami bakteryjnymi, którymi są najczęściej *Salmonella typhimurium*, *Chlamydia psittaci*, *E.coli* oraz kokcydiami: *Eimeria columbanum* lub *Eimeria labbeana*. U papug występuje zaś choroba Pacheco (PD), która może objawiać się objawami porażenymi skrzydeł, nastroszeniem piór i osowiałością ptaków. W związku z problemami występującymi w hodowli udomowionych gołębi zaczęto prowadzić badania nad czynnikiem etiologicznym wywołującym herpeswirozę i nadano mu nazwę herpeswirusa gołębi (Columbid herpesvirus-1 - CoHV-1). Jednocześnie stwierdzono, że ptaki drapieżne polujące na gołębie skalne, bądź też skarmiane mięsem gołębi ulegają zakażeniu herpeswirusem. W związku z tym podział taksonomiczny tych dwóch herpeswirusów pozostaje do końca niewyjaśniony. Dotychczas również nie było wiadomo, czy herpeswirusy mogą również zakażać ptaki nienależące do drapieżników z takich rodzin, jak krukowate (*Corvidae*), mewowate (*Laridae*) czy drozdowate (*Turdidae*) zajmujące niekiedy wspólne nisze etiologiczne z gołębiami. Podtrzymując tę ideę należy zwrócić uwagę na wyjątkowo długi czas przeżywalności herpeswirusów w środowisku. Z tego względu badania nad występowaniem herpeswirusów w populacjach ptaków dzikich w Polsce mają ważną rolę w zrozumieniu rozprzestrzeniania się zakażeń wirusowych i

zacieraniu się cienkiej granicy pomiędzy herpeswirusami występującymi u gołębi i ptaków drapieżnych.

Materiał do badań nad identyfikacją i właściwościami molekularnymi herpeswirusów pochodził od 88 padłych ptaków wolno żyjących przesłanych przez centra rehabilitacji i azyle dla ptaków na terenie kraju w kierunku wykrywania obecności wirusa Zachodniego Nilu (WNV). Podczas badania sekcyjnego od ptaków tych pobierano wycinki mózgu. Przyczyna padnięć ptaków była nieznana, jakkolwiek w przypadku jednego z nadesłanych osobników sokoła wędrownego (*Falco peregrinus*) przed śmiercią obserwowano objawy porażenne oraz zmętnienie rogówki, co mogłoby wskazywać na zakażenie CoHV-1. Nie stwierdzono występowania zakażeń WNV. Przeprowadzono izolację w hodowlach fibroblastów zarodków kurzych (CEF) oraz opracowano metodę real-time PCR ze starterami komplementarnymi do genu DNA zależnej polimerazy CoHV-1. Jako kontrole dodatnie stosowano skonstruowany plazmid z wprowadzonym produktem PCR dla szczepu standardowego GW1126. Przeprowadzone badania wykazały, że opracowana metoda real-time PCR była specyficzna dla szczepów CoHV-1 i charakteryzowała się też wysoką czułością, pozwalającą na wykrycie 100 pg wirusowego DNA. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono występowanie CoHV-1 w 18. (20,4%) badanych próbkach. Uzyskane wartości  $C_T$  (cycle threshold) proporcjonalne do koncentracji wirusowego DNA w próbce wahały się w granicach od 17,1 do 36,1. W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy stwierdzono występowanie CoHV-1 u mewy srebrzystej (*Larus argentatus*), czapli siwej (*Ardea cinirea*), wrony siwej (*Corvus cornix*) oraz drozda śpiewaka (*Turdus philomelos*). Dotychczas brak było doniesień w literaturze na temat występowania CoHV-1 u ptaków nienależących do drapieżników z rodzin krukowatych (*Corvidae*), mewowatych (*Laridae*) czy drozdowatych (*Turdidae*) zajmujących niekiedy wspólne nisze etiologiczne z gołębiami. Dodatkowo przeprowadzona analiza filogenetyczna na podstawie sekwencjonowania produktów PCR dla genu DNA-zależnej DNA polimerazy ujawniła, że wszystkie izolaty CoHV-1 występujące na terenie Polski wykazywały 100% identyczności sekwencji nukleotydowej. W porównaniu do izolatów występujących w Niemczech stwierdzono 99,1% podobieństwa sekwencji. W odniesieniu do innych przedstawicieli *Herpesviridae*, takich jak wirus choroby Mareka (MDV), herpeswirus indyjski (HVT), wirus zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy (ILTV) czy wirus choroby Pacheco (PsHV-1) podobieństwo izolatów polskich CoHV-1 wynosiło od 37,3 do 44,9%. Wyniki badań wykazały,

że herpeswirusy izolowane od gołębi i ptaków wolno żyjących charakteryzują się wysokim stopniem identyczności sekwencji nukleotydowej niezależnie od ich pochodzenia geograficznego. Stwierdzono również, że stanowią one odrębną grupę w obrębie podrodziny *Alphaherpesvirinae*. Przeprowadzone badania weryfikują hipotezę dotyczącą pochodzenia obu herpeswirusów i mechanizmu transferu zakażenia z gołębi na ptaki drapieżne oraz inne ptaki wolno żyjące. (Praca nr 4 w ramach prezentowanego osiągnięcia).

Prowadząc dalsze badania nad występowaniem herpeswirusów u gołębi hodowlanych opracowano szybką metodę LAMP do identyfikacji CoHV-1. Metodę LAMP użyto do identyfikacji materiału genetycznego tego wirusa zastosowano do wykrywania fragmentu genu DNA-zależnej polimierazy przy użyciu trzech komplementarnych par starterów. Występowanie zakażeń CoHV-1 u gołębi hodowlanych może stanowić poważne zagrożenie w ich hodowli oraz w potencjalnym handlu dla hodowców oraz kolekcjonerów rzadkich egzemplarzy tych ptaków. Materiał do badań pochodził od 42 ptaków przesłanych do badań na przełomie 2011 i 2013 roku do prywatnej lecznicy weterynaryjnej ptaków "Avi Expert" w Lublinie. U przesłanych do badań gołębi obserwowano obecność białego nalotu w jamie dziobowej oraz tchawicy, który powodował u ptaków objawy duszności. Podczas badania sekcijnego u niektórych ptaków stwierdzono znaczne powiększenie wątroby z obecnością ognisk martwiczych. Przeprowadzona analiza rozmazów krwi wg. metodyki Romanowskiego wykazała obecność ciałek wtrętowych. Prowadzone dotychczas badania w wielu innych ośrodkach naukowych w Europie i całym na świecie wykazały występowanie zakażeń CoHV-1 u gołębi na poziomie około 20%. Zastosowana przeze mnie po raz pierwszy na świecie metoda LAMP do identyfikacji CoHV-1 u gołębi hodowlanych wykazała obecność wirusa u 8 na 42 przebadanych ptaków, co stanowiło około 19% badanych gołębi. Analiza czułości diagnostycznej opracowanej metody LAMP wykazała, że pozwala ona na wykrycie nawet 10 fg DNA szczepu standardowego CoHV-1 GJW1126. Wyniki badań potwierdzono rozdziałem elektroforetycznym produktów LAMP, po którym w próbkach zawierających DNA CoHV-1 obserwowano obecność prążków o układzie tzw. "drabinki". Wyniki badań potwierdzono metodą real-time PCR, której czułość wynosiła 100 pg. Dodatkowo w metodzie LAMP próbki przeznaczono do zakażenia hodowli komórkowych fibroblastów zarodków kurzych (CEF) w celu izolacji wirusa. Charakterystyczny dla herpeswirusów efekt cytopatyczny (CPE) w zakażonych hodowlach komórkowych w postaci komórek tworzących

skupiska obserwowano począwszy od 72 h.p.i. Opracowana w toku badań metoda LAMP jest pierwszym jej zastosowaniem do identyfikacji CoHV-1 i będzie mogła być w przyszłości wykorzystana przez laboratoria badawcze z ograniczonym dostępem do technik biologii molekularnych (Praca nr 5 w ramach prezentowanego osiągnięcia).

Prowadząc dalsze badania nad molekularną diagnostyką i badaniami nad patogenezą herpeswirusów ptaków podjęto pierwszą w kraju próbę ustalenia aktualnej sytuacji epidemiologicznej w odniesieniu do wirusa zapalenia jelit kacząt (DVE) pośród ptaków wodnych żyjących na terenie kraju przy użyciu metody LAMP.

Zapalenie jelit kacząt (duck plague - DP) jest jednym z najpoważniejszych i ostrych w przebiegu zakażeń wirusowych występujących u ptaków wodnych [20]. Wrażliwe na zakażenie wirusem zapalenia jelit (DEV) są ptaki należące do 48 różnych gatunków zaliczając gęsi, kaczki oraz łabędzie. Co istotne, zakażenie może szerzyć się pomiędzy dzikim ptactwem wodnym oraz hodowlanym drobiem wodnym (gęsi i kaczki). Śmiertelność spowodowana zakażeniem DEV może dochodzić nawet do 100% w stadzie. DEV należy do Alfaherpeswirusów w obrębie rodziny *Herpesviridae*. Dosyć rzadkie doniesienia dotyczące występowania DEV u hodowlanego drobiu wodnego są związane ze specyfiką wirusa i faktem, że jego antygen może być wykrywany wyłącznie podczas przejściowej fazy siewstwa do otoczenia. Może być to również związane z nieco niższą czułością diagnostyczną stosowanych w przeszłości metod serologicznych, takich jak izolacja wirusa w hodowlach komórkowych fibroblastów zarodków kurzych SPF (CEF), fibroblastów zarodków gęsich (DEF), testów immunoenzymatycznych ELISA, czy metod mikroskopii elektronowej. Wraz z wprowadzeniem metod biologii molekularnej, takich jak PCR, czy PCR w czasie rzeczywistym wykrywanie materiału genetycznego DEV stało się o wiele łatwiejsze. Dalszy rozwój metod biologii molekularnej pozwolił w roku 2009 na opracowanie metody LAMP, co znacznie bardziej usprawniło badania nad identyfikacją DEV. Opracowana w toku badań metoda własna real-time LAMP charakteryzowała się ponad dwukrotnie krótszym czasem analizy oraz możliwością rejestracji wyników w systemie do real-time PCR. Badania przeprowadzono na 132 próbkach terenowych pochodzących od wolno żyjących ptaków wodnych, głównie były to dzikie kaczki (*Anas platyrhynchos*) oraz łabędzie nieme (*Cygnus olor*). Materiał genetyczny DEV stwierdzono w przypadku 96 ptaków, co stanowiło 72,7% badanych ptaków wodnych wolno żyjących. Oprócz wymienionych wyżej gatunków materiał genetyczny wirusa

został stwierdzony u gęsi gęgawy (*Anser anser*), gęsi zbożowej (*Anser fabalis*) oraz wyjątkowo u czapli siwej (*Ardea cinerea*), co nie było dotychczas opisywane w literaturze fachowej. Opracowana metoda real-time LAMP pozwoliła na potwierdzenie obecności herpeswirusowego DNA na podstawie zmiany barwy mieszanin reakcyjnych LAMP na zieloną w świetle widzialnym, jasnej zielonkawej fluorescencji pod wpływem lampy UV, jak również przyrostu sygnału fluorescencyjnego obserwowanego w systemie do real-time PCR Applied Biosystems 7500. Co więcej badania uzyskane metodą real-time LAMP zostały potwierdzone izolacją wirusa w hodowlach CEF, w których po przeprowadzeniu 3 pasażów każdego ze szczepów obserwowano występowanie charakterystycznego efektu cytopatycznego (CPE).

Tak wysoki odsetek wyników dodatnich był zaskakujący z uwagi, iż w badaniach przeprowadzonych na przełomie lat 80. i 90. w Wielkiej Brytanii przy użyciu metod serologicznych obecność specyficznych przeciwciał anti-DEV stwierdzono w przypadku 46,6% badanych ptaków. Dotychczas w Polsce występowanie DEV u ptaków wolno żyjących nie było badane a wysoki odsetek wyników dodatnich wskazuje na szerokie rozprzestrzenienie tego wirusa wśród ptaków wolno żyjących. Czułość opracowanej metody real-time LAMP wynosiła 1 pg DNA szczepu standardowego DEV 1227. Biorąc pod uwagę wysoki odsetek ptaków wolno żyjących, u których stwierdzono obecność DNA DEV w przyszłości planuje się rozszerzyć badania w kierunku określenia transmisji tego wirusa na hodowlany drób wodny. (Praca nr 6 w ramach prezentowanego osiągnięcia).

Podsumowując badania przedstawione w ramach przedłożonych 6 prac naukowych mają one duże znaczenie dla ciągłego rozwoju diagnostyki i badań nad etiologią i patogenezą chorób ptaków o etiologii herpeswirusowej. W większości przypadków opracowane własne metody biologii molekularnej ze szczególnym uwzględnieniem techniki LAMP były opisane po raz pierwszy na świecie. Ponadto opracowane techniki służyły poznaniu aktualnej sytuacji epidemiologicznej w odniesieniu do herpeswirusów występujących u ptaków drapieżnych i gołębi (CoHV-1), czy wirusa zapalenia jelit kacząt (DEV). W przypadku choroby Mareka (MD) przeprowadzone badania pozwoliły na usprawnienie identyfikacji poszczególnych serotypów MDV, jak również na otrzymanie rekombinowanych klonów BAC tego wirusa pozbawionych regionów onkogennych. W przyszłości może to pozwolić na opracowanie rekombinowanych szczepionek przeciwko MD i wdrożenie ich do stosowania w profilaktyce tej choroby.

### **3.4. Wnioski**

- opracowanie metody LAMP do identyfikacji szczepów MDV należących do różnych serotypów jest pierwszym na świecie przykładem użycia tej techniki, do wykrywania 3 różnych serotypów tego wirusa,
- metoda LAMP pozwoliła na wykrywanie zjadliwych szczepów MDV w kurzu pomieszczeń hodowlanych pochodzących z 12 różnych ferm bez konieczności wcześniejszej izolacji DNA,
- otrzymane delecyjne klony BAC szczepów terenowych MDV pozbawionych onkogenów meq i vTR zachowały zdolność do namnażania się w hodowlach komórkowych i będą mogły być w przyszłości wykorzystane w szczepionkach nowej generacji przeciwko MD,
- badania nad występowaniem CoHV-1 pośród ptaków drapieżnych oraz gołębi i ptaków wolno żyjących przeprowadzone przy użyciu metody real-time PCR i sekwencjonowania produktów specyficznych dla genu DNA-zależnej DNA polimerazy potwierdzają hipotezę dotyczącą pochodzenia obu herpeswirusów oraz mechanizmu transferu zakażenia od gołębi na ptaki drapieżne oraz inne ptaki wolno żyjące,
- opracowana specyficzna metoda LAMP do identyfikacji CoHV-1 pozwoliła na znacznie szybsze i prostsze wykrycie zakażeń tym wirusem u gołębi domowych i jest pierwszym opisanym użyciem tej techniki do identyfikacji herpeswirusów u gołębi,
- badania nad występowaniem DEV u wolno żyjących ptaków wodnych przy użyciu metody real-time LAMP były pierwszymi badaniami tego typu przeprowadzonymi u wodnych ptaków wolno żyjących i wykazały wysoki odsetek wyników dodatnich, co może mieć wpływ na transfer zakażeń tym wirusem na hodowlane ptactwo domowe.

## **4. Ważniejsze osiągnięcia w zakresie badań prowadzonych poza zgłaszanym cyklem tematycznym**

### **4.1. Choroba Mareka (MD)**

Oprócz badań realizowanych w ramach prezentowanego osiągnięcia od początku mojego okresu zatrudnienia w Zakładzie Chorób Wirusowych Drobiu tj. od 2007 roku prowadziłem badania nad diagnostyką i patogenezą choroby Mareka (MD). Badania te pozwoliły mi na głębsze poznanie klasycznych technik wirusologicznych, takich jak izolacja wirusa na zarodkach kurzych SPF (specific-pathogen free), izolacji wirusa w hodowlach

komórkowych fibroblastów zarodków kurzych (CEF), komórek nerki zarodków kurzych (CEK) oraz komórek nerki kurcząt (CK). Ponadto zapoznałem się ze stosowaniem oznaczania miana wirusów (TCID<sub>50</sub>, EID<sub>50</sub>, PFU) oraz techniką immunofluorescencji pośredniej (IF). W swoich pierwszych badaniach stosowałem również metody serologiczne do wykrywania przeciwciał anty-MDV testem immunodyfuzji w żelu agarowym (AGID) oraz antygenu specyficznego dla MDV w brodawkach piór zakażonych ptaków testem immunodyfuzji radialnej w żelu agarowym (RID). Jednakże moje zainteresowania skupione były bardziej wokół molekularnych czynników warunkujących patogenność zjadliwych szczepów terenowych MDV oraz możliwości różnicowania izolatów terenowych wirusa choroby Mareka za pomocą metod biologii molekularnej, takich jak PCR, real-time PCR, czy amplifikacja w warunkach stałej temperatury (LAMP). Byłem pierwszym badaczem na świecie, który opracował i zastosował metodę LAMP do wykrywania zjadliwych szczepów MDV. Ponadto w ramach realizowanej działalności badawczej Zakładu prowadziłem badania nad występowaniem wybranych genów MDV w przebiegu zakażenia kurcząt metodą real-time PCR. Badania te były realizowane w latach 2009-2011 jako temat działalności statutowej S/022 „Wykrywanie wirusa choroby Mareka przy użyciu real-time PCR”. Podobną technikę zastosowano w ramach prowadzonych przeze mnie badań do oceny występowania onkogenów *meq* i LAT w przebiegu zakażenia hodowli komórkowych CEF szczepami MDV o różnej patogenności. Badania te realizowałem, jako główny wykonawca w ramach projektu badawczego własnego nr N N308 090337 pt: „Występowanie onkogenów podczas zakażenia wirusem choroby Mareka”. Uzyskane wyniki badań miały na celu określenie związku występującego pomiędzy patogennością zjadliwych szczepów terenowych MDV a intensywnością i długością trwania fazy latencji i nowotworowej w przebiegu zakażenia MDV *in vitro*. Do analizy występowania onkogenów *meq* i LAT w przebiegu zakażenia hodowli komórkowych badanymi szczepami MDV o różnej patogenności opracowano ilościową metodę triplex real-time PCR. Stwierdzono, że szczepy MDV o podwyższonej patogenności vvMDV i vv+MDV wykazywały ponad 25 - 100 razy niższą o dynamikę replikacji. Różnice były istotne na poziomie istotności  $\alpha=0,05$ . Wykazano, że wykrywanie onkogenów *meq* i LAT pozwala na wiarygodną identyfikację zakażeń latentnych i transformujących począwszy od 6 godziny po zakażeniu. Stwierdzono też że występowanie onkogenów *meq* i LAT jest zależne od patotypu zjadliwych szczepów terenowych MDV. Wyraźny wzrost dynamiki replikacji obserwowano po 72 godzinach inkubacji we wszystkich badanych szczepach MDV. Otrzymane badania pozwoliły

na zrozumienie dynamiki replikacji zjadliwych szczepów MDV *in vitro* i w przyszłości będą mogły być potwierdzone przez badania na kurczętach.

Podobne badania *in vitro* w hodowlach komórkowych prowadziłem razem z dr Katarzyną Szatraj (Król) w celu ustalenia profili ekspresji wirusowej interleukiny 8 (vIL-8) pośród szczepów o różnej patogenności. Wyniki te wykazały, że poziom ekspresji vIL-8 *in vitro* zależy od patotypu użytych szczepów zjadliwych MDV. Obserwowane różnice w ekspresji nie były jednak wystarczające, aby jednoznacznie wyciągnąć wnioski co do roli vIL-8 w fazie cytolitycznego zakażenia, w związku z tym wyniki tego typu badań powinny być weryfikowane przez badania na kurczętach.

W związku z obserwowaną podwyższoną patogennością szczepów terenowych MDV izolowanych w kraju podjąłem również badania nad scharakteryzowaniem szczepów pod względem sekwencji nukleotydowej onkogenu *meq* MDV. Przeprowadzone badania wykazały wysokie podobieństwo sekwencji nukleotydowych krajowych izolatów do szczepów referencyjnych MDV o podwyższonej patogenności (vvMDV/vv+MDV). Stwierdziłem również, że 12 szczepów izolowanych w latach 2007-2010 posiadało insercję długości 68 par zasad, która była skutkiem rekombinacji z terenowym szczepem wirusa retikuloendoteliozy (REV). Wyniki tych badań potwierdzono również klasyczną metodą PCR, która pozwoliła na identyfikację regionu długich powtórzonych sekwencji (LTR) REV.

Również w roku 2013 opublikowałem jako współautor pracę dotyczącą badań nad występowaniem choroby nowotworowej u gęsi spowodowanej zakażeniem MDV u gęsi. Był to pierwszy w kraju i drugi na świecie przypadek stwierdzenia występowania klinicznej postaci MD u gęsi.

Dodatkowo w 2013 i 2014 roku prowadzono badania nad występowaniem interakcji pomiędzy herpeswirusem indyjskim oraz szczepem terenowym adenowirusa w warunkach *in vitro*. Badania te miały na celu określenie wpływu występowania zakażeń wirusowych u kurcząt szczepionych przeciwko MD na zahamowanie replikacji szczepu stosowanego w profilaktyce tej choroby. Wyniki badań wykazały największe zahamowanie replikacji szczepu CVI988/Rispens po zastosowaniu eksperymentalnego zakażenia ptaków szczepem adenowirusa JN-5/10j przed szczepieniem profilaktycznym przeciwko MD. Badania te realizowano w ramach projektu badawczego NN308 571240 pt: „Interakcje pomiędzy adenowirusami ptasimi a szczepami wirusa choroby Mareka stosowanymi w immunoprofilaktyce”.



Wyniki kolejnych badań dotyczących molekularnej ewolucji genów MDV związanych z onkogennością MDV opublikowano w 2014 roku w renomowanym czasopiśmie drobiarskim *Avian Diseases*. Badania wykazały występowanie charakterystycznych motywów sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej w obrębie regionów kodujących białko Meq, białko kodujące alfa-enolazę (białko o masie 23 kDa) oraz sekwencję MDV077.5 o nie wyjaśnionej funkcji. Stwierdzono, że sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa tych genów pozwala na zaliczenie badanych szczepów do grup o umiarkowanej (mMDV), średniej (vMDV), wysokiej (vvMDV) i bardzo wysokiej patogenności (vv+MDV), jednakże wyniki analiz *in vitro* winny być potwierdzone przez patotypowanie badanych szczepów na kurczętach. Badania te realizowano w ramach projektu badawczego własnego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr. 2011/01/B/NZ7/01561: pt: "Ewolucja genów wirusa choroby Mareka związanych z onkogennością", w którym byłem głównym wykonawcą. Poniżej przedstawiono listę prac, które opublikowano w ramach opisanej działalności. Badania nad molekularną analizą MDV były również częściowo wykorzystane w mojej pracy doktorskiej. (Ramką zaznaczono prace opublikowane po zakończeniu rozprawy doktorskiej).

K. Król , E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń, **G. Woźniakowski**. Comparison of different methods for the detection of Marek's disease virus. **Medycyna Wet**, 2009, 65, 99-101. **Bez wskaźnika impact factor.**

K. Król , E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń, **G. Woźniakowski**. Duplex PCR assay for detection and differentiation of pathogenic and vaccine strains of MDV serotype 1. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2009, 51, 331-335. **IF<sub>2009</sub>= 0,273**

K. Król , **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz. Expression patterns of viral interleukin 8 among different MDV pathotypes. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2009, 53, 333-336. **IF<sub>2009</sub>= 0,218**

**G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Occurrence of main Marek's disease genes during infection of chickens. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2010, 54, 123-127, **IF<sub>2010</sub>= 0,321**

**G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Sequence analysis of meq oncogene among Polish strains of Marek's disease. **Pol J Vet Sci**, 2010, 13, 263-267, **IF<sub>2010</sub>=0,507**

**G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Rapid detection of Marek's disease virus in feather follicles by loop-mediated amplification. **Avian Dis** 2011, 55, 462-467, **IF<sub>2011</sub>=1,462**

**G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens. **Acta Vet Scand**, 2011, 53:10, **IF<sub>2011</sub>=1,367**

J.S. Niczyporuk, **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, H. Czekaj. Effect of fowl adenovirus (FaDV-7) infection on the replication of Turkey herpesvirus FC126 in chicken embryo fibroblast cultures. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2012, 56, 441-446, **IF<sub>2013</sub>= 0,414**

J.S. Niczyporuk, **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, H. Czekaj. Effect of fowl adenovirus on replication of vaccine strain of Marek's disease virus in chickens. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2013, 57, 467-472 **IF<sub>2013</sub>= 0,377**

W. Kozdruń, **G. Woźniakowski**, H. Czekaj, W. Kozaczyński, E. Samorek-Salamonowicz. New herpesvirus isolated from geese in Poland. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2013, 57, 301-304, **IF<sub>2013</sub>= 0,377**

J.S. Niczyporuk, **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, H. Czekaj. Interactions between Marek's disease virus Rispens/CVI988 vaccine strain and adenovirus field strain in chicken embryo fibroblast (CEF) cultures. **Pol J Vet Sci**. 2014;17, 3-8, **IF<sub>2013</sub>=0,71**

**G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz. Molecular evolution of Marek's disease virus (MDV) field strains in forty years time period. **Avian Dis**, 2014, 58, 550-557 **IF<sub>2013</sub>=1,10**

## **4.2. Choroba Derzsy'ego**

W przypadku drobiu wodnego największe znaczenie ekonomiczne ma choroba Derzsy'ego (DD) u gęsi oraz kaczek piżmowych (*Cairina moschata*) [7,14-15,18]. Szybka i skuteczna diagnostyka tej choroby jest bardzo istotna, biorąc pod uwagę możliwość

horyzontalnego i wertykalnego szerzenia się zakażeniem wirusa choroby Derzsy'ego (DDV) w stadzie. DD rozprzestrzenia się poprzez bezpośredni kontakt zainfekowanych ptaków lub pośrednio przez zakażoną paszę, wodę oraz fekalia. Śmiertelność zależna jest od wieku zakażonych ptaków i wynosi od 30 do 100%. Czynnikiem etiologicznym DD jest parwovirus gęsi (GPV), natomiast u kaczek piżmowych występuje zbliżony pod względem budowy molekularnej parwovirus kaczki piżmowej (MDPV) wywołujący chorobę 3-tygodnia (3<sup>rd</sup>-week disease). Zwiększone nasilenie występowania GPV i MDPV obserwowano w połowie lat 60. ubiegłego wieku, a charakterystycznymi objawami parwoviroz u kaczek i gęsi było znaczne wychudzenie oraz problemy z układem lokomotorycznym. Charakterystycznymi zmianami anatomopatologicznymi obserwowanymi w przebiegu zakażenia GPV i MDPV są powiększenie wątroby i obecność zmian nekrotycznych, wybroczyny podtorebkowe, zaokrąglony i blade koniuszek serca, powiększone nerki i trzustka. Skutecznym sposobem zapobiegania szerzeniu się choroby Derzsy'ego są szczepienia ochronne. Największe znaczenie w profilaktyce wirusa choroby Derzsy'ego ma szczepienie dorosłych gęsi pochodzących ze stad reprodukcyjnych, przed okresem lęgowym ze względu na ochronne działanie matczynych przeciwciał u młodych gąsiąt. Klasyczne metody identyfikacji GPV i MDPV związane są z izolacją wirusa na zarodkach gęsich lub kaczych oraz odczynu serologiczne, takie jak test immunoenzymatyczny ELISA i test seroneutralizacji. Metody te pomimo dużej przydatności i wiarygodności są pracochłonne i czasochłonne a ponadto są zależne od okresu lęgowego drobiu wodnego. Te ograniczenia zostały przezwyciężone po wprowadzeniu do diagnostyki parwoviroz drobiu wodnego metody PCR, która pozwoliła na identyfikację i różnicowanie obu wirusów [34]. Kolejnym krokiem było opracowanie metody amplifikacji w warunkach stałej temperatury (LAMP), co jeszcze bardziej uprościło i usprawniło diagnostykę tej choroby [19]. Jednakże w przebiegu choroby należy wziąć też pod uwagę jej stopień zaawansowania oraz możliwość skorelowania obserwowanych objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych z poziomem replikacji wirusa. Przeprowadzone w ramach opisywanego osiągnięcia naukowego badania miały na celu opracowanie ujednoliconej metody molekularnej real-time PCR do wykrywania zarówno GPV, jak i MDPV oraz określenie korelacji pomiędzy wiekiem zakażonych ptaków, występowaniem objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych a liczbą kopii DNA obu wirusów.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wykazały, że objawy kliniczne takie jak: utrata upierzenia, osowienie były obserwowane u ptaków począwszy od 3 tygodnia życia.

Podobną zależność obserwowano w przypadku występowania zmian anatomopatologicznych. Wyliczony wskaźnik korelacji Spearmana  $R_s$  wynosił w tym przypadku 0,5699 na poziomie istotności 5% co skutkowało odrzuceniem hipotezy zerowej mówiącej o braku zależności pomiędzy obserwowanymi objawami a wiekiem ptaków. Opracowana ilościowa metoda real-time PCR została następnie użyta do oznaczania liczby kopii fragmentu odwróconych i powtórzonych sekwencji - ITR genomu GPV i MDPV w 16 izolatach terenowych. W tym celu homologiczny region ITR genomu GPV i MDPV wklonowano do wektora pGEM-T Easy, a następnie sporządzono seryjne rozcieńczenia powstałego plazmidu pITR do konstrukcji krzywej standardowej. Najwyższą liczbę kopii tego fragmentu wykrywano w wątrobie i sercu gęsi i kaczek w wieku 4-9 tygodni. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano dodatnią korelację  $R_s=0,8294$  w przypadku próbek wątroby oraz  $R_s=0,8176$  na poziomie istotności 5% pomiędzy liczbą kopii fragmentu ITR GPV i MDPV a stopniem zaawansowania objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, że opracowana ilościowa metoda real-time PCR poza jej dużą wartością w skutecznej diagnostyce zakażeń GPV i MDPV może być również zastosowana do badań nad mechanizmem zakażeń parwowirusami u drobiu wodnego oraz przebiegiem patogenezy choroby Derzsy'ego u gęsi i parwowiroy u kaczek. Ponadto wyniki prowadzonych przeze mnie badań pozwoliły na opracowanie metody touchdown-PCR oraz analizy restrykcyjnej oraz identyfikacji i oceny zróżnicowania genetycznego szczepów GPV na podstawie jego genów kodujących białka kapsydu VP1, VP2 oraz VP3. Badania te realizowane były przeze mnie jako wykonawcę w ramach projektu badawczego własnego N 308 045 32/4223 pt: „Analiza filogenetyczna krajowych izolatów wirusa choroby Derzsy'ego” 2007 –2010. W 2013 roku razem z lek. wet. Karoliną Tarasiuk podjęliśmy również zakończoną sukcesem próbę opracowania metody LAMP do szybkiej identyfikacji terenowych izolatów GPV. Tą samą metodę zaadaptowano w 2014 roku do szybkiej identyfikacji wirusa powodującego pomór kaczek (DEV). Wyniki badań nad molekularną patogenezą GPV oraz doskonaleniem metod diagnostycznych przedstawiono w poniższych pracach. (Ramką zaznaczono prace opublikowane po zakończeniu rozprawy doktorskiej).

W. Kozdruń, T. Mato, V. Palya, E. Samorek-Salamonowicz, K. Król, **G. Woźniakowski** Phylogenetic analysis of Derzsy's disease virus isolated from geese in Poland. **Medycyna Wet**, 2008, 64, 1051-1054. **Bez wskaźnika impact factor.**

**G. Woźniakowski**, W. Kozdruń , E. Samorek-Salamonowicz, K. Król. Derzsy's disease – currently still a problem. **Medycyna Wet**, 2009, 65, 9-11. **Bez wskaźnika impact factor.**

**G. Woźniakowski**, W. Kozdruń, E. Samorek-Salamonowicz. Genetic variance of Derzsy's disease strains isolated in Poland. **J Mol Genet Med**, 2009, 3, 210–216. **Bez wskaźnika impact factor.**

**G. Woźniakowski**, W. Kozdruń, E. Samorek-Salamonowicz, K. Król. Touchdown PCR for the detection of waterfowl parvoviruses. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2009, 53, 3-7, **IF<sub>2009</sub>= 0,218**

**G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Characteristics of genes encoding structural protein of Polish strains of goose parvovirus. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2010, 54, 119-122, **IF<sub>2010</sub>= 0,321**

**G. Woźniakowski**, W. Kozdruń, E. Samorek-Salamonowicz. Detection and differentiation of waterfowl parvoviruses by PCR. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2010, 54, 283-288, **IF<sub>2010</sub>= 0,321**

**G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń. Quantitative analysis of waterfowl parvoviruses in geese and Muscovy ducks by real-time polymerase chain reaction: correlation between age, clinical symptoms and DNA copy number of waterfowl parvoviruses. **BMC Vet Res**. 2012, 8:29, **IF<sub>2012</sub>=2,37.**

*Praca nagrodzona Doroczną Nagrodą PTNW II stopnia za rok 2012 oraz Nagrodą II stopnia Dyrektora PIWet za najlepszą publikację w roku 2012.*

K. Tarasiuk, **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz. Loop-Mediated Isothermal Amplification as a Simple Molecular Method for the Detection of Derzsy's Disease Virus. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2013, 57, 19-23 **IF<sub>2013</sub>= 0,414**

**G. Wozniakowski**. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of duck enteritis virus (DEV). **Medycyna Wet**. 2014, 7, 169-171 **IF<sub>2013</sub>= 0,196**

### 4.3. Cirkowirusy gęsi

Podobnie jak choroba Derzy'ego duże znacznie w hodowli gęsi i kaczek mają zakażenia cirkowirusami. Cirkowirusy pomimo małych rozmiarów wynoszących 20 nm stanowią istotny problem immunosupresyjny w masowej hodowli gęsi i kaczek. Rodzina *Circoviridae* jest reprezentowana przez dwa rodzaje: *Gyrovirus* i *Circovirus*, do którego należy będący przedmiotem zainteresowania tej części badań cirkowirus gęsi (GCV) [31]. Wirus ten po raz pierwszy opisano w 1998 roku w stadzie komercyjnych gęsi, w którym obserwowano znaczne zahamowanie wzrostu ptaków oraz wysoką śmiertelność. Wiadomym jednak jest, że GCV stanowi przede wszystkim czynnik immunosupresyjny wnikający wtórne zakażenia innymi patogenami wirusowymi, bakteryjnymi i grzybiczymi. Przykładem jest opisywany wcześniej wirus choroby Derzsy'ego (DDV), wirus krwotocznego zapalenia jelit kacząt (GHPV), bakterie z rodzaju *Riemerella*, czy występujący, jako czynnik etiologiczny grzybic u gęsi *Aspergillus fumigatus*. Najczęściej występujące objawy kliniczne wywołane przez zakażenie GCV obejmują zahamowanie wzrostu oraz nieprawidłowe upierzenie. W obrazie anatomopatologicznym najczęściej występuje znaczny zanik limfocytów T w narządach limfatycznych, co prowadzi do immunosupresji. W związku z dużym wpływem tego czynnika na odporność ptaków w stadzie stosowane są różne metody diagnostyczne. W przypadku GCV izolacja wirusa w hodowlach komórkowych jest bardzo trudna i często kończy się niepowodzeniem. Z kolei mało specyficzne zmiany anatomopatologiczne wymagają dużego doświadczenia od lekarza weterynarii – patologa. Podobnie jak w przypadku innych jednostek chorobowych występujących u gęsi skuteczną metodą okazał się PCR oraz opisana w ostatnich latach metoda real-time-PCR. Metody te pomimo ich wysokiej przydatności są kosztowne i wymagają posiadania specjalistycznej aparatury i odpowiednio przeszkolonego personelu. W celu uproszczenia diagnostyki zakażeń GCV podjęto próbę opracowania metody LAMP do szybkiej identyfikacji izolatów terenowych GCV. Specyficzne trzy pary starterów oligonukleotydowych zaprojektowano w obrębie genu Vgp4 kodującego jedno z głównych białek kapsydu GCV. Amplifikacja tego specyficznego regionu była możliwa w szerokim zakresie temperatur od 56°C do 65°C. Metoda LAMP pozwalała na amplifikację genu Vgp4 w czasie od 30 do 90 min i była ona specyficzna wyłącznie dla GCV, gdyż nie obserwowano fluorescencji w próbkach zawierających DNA innych wirusów występujących u gęsi, takich jak wspomniany wcześniej GPV, MDPV, GHPV, czy adenowirusów ptaków (FaDV-1). Wyniki potwierdzono rozdziałem elektroforetycznym oraz dodatkowo opracowaną

metodą real-time PCR. Metodę uznano również za czułą, gdyż wykrywała ona 100 pg szczepu standardowego P\_1\_03 GCV. Opracowany test LAMP użyto do identyfikacji materiału genetycznego GCV, który wykryto w 37 na 38 badanych izolatów terenowych. Wyniki badań zostały potwierdzone metodą real-time PCR i stwierdzono, że otrzymywany w reakcji produkt posiada wspólną temperaturę topnienia (79,9-80,8°C) pośród wszystkich badanych izolatów, co świadczyło o wiarygodności uzyskanych wyników. Opracowanie testu LAMP do wykrywania zakażeń GCV u gęsi wykazało jego wysoką specyficzność, czułość oraz wiarygodność uzyskiwanych wyników. Co bardzo istotne metoda ta może znaleźć zastosowanie w laboratoriach i lecznicach weterynaryjnych, w których inne metody biologii molekularnej, takie jak PCR czy real-time PCR są niedostępne. W roku 2013 przedstawiono też pracę dotyczącą aktualnej sytuacji epidemiologicznej w odniesieniu do wirusa choroby Derzsy'ego ora cirkowirusów gęsi (GCV) i wirusa krwotocznego zapalenia jelit gęsi (GHPV).

**G. Woźniakowski**, W. Kozdruń, E. Samorek-Salamonowicz. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. **Virol J.** 2012, 9:110, **IF<sub>2011</sub>=2,55**.

*Praca nagrodzona Doroczną Nagrodą PTNW II stopnia za rok 2012 oraz Nagrodą II stopnia Dyrektora PIWet na najlepszą publikację.*

W. Kozdruń, **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, Czekaj H. Viral infections in goose flocks in Poland. **Pol J Vet Sci.** 2012; 15:525-530 **IF<sub>2013</sub>= 0,565**

#### **4.4. Parwowirusy u kur**

Innym prowadzonym obok przedstawionych badań tematem było badanie występowania parwowirusów (ChPV) u kur jako jednego z czynników enteropatii u drobiu grzebiącego. Enteropatie drobiu grzebiącego stanowią poważny problem mający ekonomiczne znaczenie. Są one jedną z przyczyn występowania enteropatii u kur znanych, jako syndrom złego wchłaniania (MS), zahamowania wzrostu i skarłowacenia (RSS). Zakażeniom kurcząt przez ChPV często towarzyszą również zakażenia innymi wirusami z rodziny: *Coronaviridae*, *Reoviridae*, *Calciviridae*, *Circoviridae* i *Astroviridae*. Obecnie w Europie obserwuje się występowanie enteropatii u kur i podejrzewa się, że mogą one mieć związek z występowaniem parwowirusów. Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym od kur izolowanym w latach 2002-2011. Były to kurczęta brojlery w wieku od 1 do 6,5 tyg oraz kury nioski w wieku od 14 do 37 tygodni. U ptaków tych obserwowano

objawy wychudzenia i zahamowania wzrostu. Do badań pobierano wycinki jelit, z których izolowano całkowity DNA. W celu identyfikacji ChPV zastosowano startery oligonukleotydowe komplementarne do genu kodującego białko niestrukturalne NS ChPV. Jako kontrolę dodatnią sporządzono plazmid pNS114 zawierający amplifikowany produkt PCR szczepu standardowego 114/10 izolowanego w kraju. Następnie opracowano metodę real-time PCR pozwalającą na powielenie specyficznego fragmentu genu NS ChPV. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że opracowana metoda real-time PCR z użyciem opublikowanych wcześniej w literaturze starterów była skuteczna do identyfikacji ChPV w 25 stadach kur, co stanowiło 17,6% wszystkich przebadanych stad. Czulość tej metody pozwalała na wykrywanie 10 kopii plazmidu pNS114. Najwyższą koncentrację wirusowego DNA stwierdzono w materiale pochodzącym od kurcząt brojlerów w wieku od 3 – 6 tygodni oraz kur niosek w wieku 14-21 tygodni. Przeprowadzona analiza sekwencyjna produktu PCR dla genu NS krajowego izolatu 114/10 wykazała 93% podobieństwa do szczepów ChPV izolowanych na Węgrzech. Wyniki badań wskazują na udział ChPV w enteropatiach w hodowli drobiu grzebiącego w Polsce. W roku 2013 opublikowałem pracę dotyczącą występowania jednoczesnych zakażeń MDV oraz parwowirusów u kur. Jednoczesne zakażenia tymi dwoma wirusami stwierdzano w przypadku 20% badanych ptaków i w związku z immunosupresyjnym charakterem ChPV może mieć to potencjalny wpływ na efektywność szczepień stosowanych przeciwko MD. Wyniki badań zamieszczono w poniższych publikacjach:

K. Tarasiuk, **G. Woźniakowski**. Rola parwowirusów w zakażeniach kurcząt. **Życie Weterynaryjne**, 2011, 86, 872-873. **Bez wskaźnika impact factor**.

K. Tarasiuk, **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz. Occurrence of chicken parvovirus in Poland. **Open Virol J.** 2012; 6: 7-11. **Bez wskaźnika impact factor**.

|                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| K. Tarasiuk, <b>G. Woźniakowski</b> , E. Samorek-Salamonowicz. Incidence of parvoviruses in chickens infected with Marek's disease virus. <b>Pol J Vet Sci.</b> 2013; 16: 573-574. <b>IF<sub>2012</sub>= 0,57</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### **4.5. Reowirusy i polyomawirusy ptaków**

Moim kolejnym przedmiotem zainteresowania była nowoczesna diagnostyka i występowanie nowych wariantów reowirusów i polyomawirusów u drobiu wodnego. Reowirusy drobiu (ARV) należą do rodzaju *Orthoreovirus*. Na zakażenie ARV wrażliwe są kury,



indyki, gęsi, kaczki oraz inne gatunki ptaków. Objawy kliniczne powodowane przez ARV, występujące u kur dotyczą chorób układu oddechowego i pokarmowego, zapalenia stawów skokowych oraz syndromu zhamowania wzrostu i karłowatości (RSS). Obserwowane zmiany anatomopatologiczne obejmują ogniska martwicze wątrobie, splenomegalię, i puchliznę osierdzia. Największą rolę w zakażeniach reowirusami odgrywa ich immunosupresyjny wpływ na ogólny stan zdrowia ptaków. Zachorowalność w zakażonych stadach gąsiąt i kacząt może wynosić od 10 do 30%, natomiast śmiertelność od 15 do 30%. Kapsyd reowirusów ma kształt dwudziestościenny, natomiast materiał genetyczny stanowi dwuniciowy DNA podzielony na 3 klasy segmentów: duże (L1-L3), średnie (M1-M3) oraz małe (S1-S4). Osiem segmentów sekwencji koduje 3 kategorie białek strukturalnych tj. odpowiednio  $\lambda$ ,  $\mu$  oraz  $\sigma$ . Genom ARV zawiera również białka niestrukturalne  $\mu$ NS kodowane przez segment S4. Do innych genów niestrukturalnych zalicza się p10 i p17 kodowane przez segment S1. Najczęstsze doniesienia dotyczące występowania ARV u gąsiąt i kacząt piżmowych (*Cairina moschata*) pochodzą z Chin, gdzie produkcja drobiu wodnego stanowi ważny czynnik ekonomiczny całej gospodarki. Przeprowadzone przeze mnie badania miały na celu ustalenie przyczyny wysokiej śmiertelności wynoszącej 44% w stadzie kacząt piżmowych w wieku 3 i 5 tygodni. Obserwowane objawy kliniczne obejmowały znaczne zahamowanie wzrostu oraz problemy z układem lokomotorycznym u gąsiąt. Przeprowadzone badania metodami biologii molekularnej (PCR i real-time PCR) wykluczyły zakażenie innymi patogenami wirusowymi ptaków włączając wspomniane wcześniej wirusy GPV, GCV czy reowirus kaczki (DRV). Przeprowadzony odczyn immunodyszki w żelu agarowym (AGP) wykazał częściową reaktywność z antygenem szczepu standardowego S1133, co mogło by sugerować zakażenie kurzym wariantem reowirusa - ARV. Przeprowadzone badanie metodą real-time PCR w kierunku ARV potwierdziło występowanie specyficznego sygnału fluoroscencyjnego w zakresie  $C_T$  od 14,1 do 16,2 świadczącego o obecności wirusa. Po oczyszczeniu produktów o wielkości 522 bp z żelu agarozowego przeprowadzono sekwencjonowanie matryc PCR i stwierdzono, że otrzymane sekwencje wykazywały podobieństwo do sekwencji innych szczepów ARV, takich jak: S1133, 1733, TARV-MN2, czy GX/2010/1. Sekwencje te były również zbliżone do opisanego wcześniej w Chinach szczepu TH11. Wyniki izolacji w komórkach nerki zarodków kurzych SPF potwierdziły, iż wyizolowanym czynnikiem etiologicznym był reowirus.

Jako kontynuację badań nad reowirusami podjęto próbę zastosowania szybkiej metody amplifikacji krzyżowej (CPA) do identyfikacji terenowych izolatów ARV. Metoda CPA była kolejnym postępowaniem w stosowaniu metod amplifikacji w warunkach stałej temperatury. Po raz pierwszy opisano ją w 2009 roku do identyfikacji *Mycobacterium tuberculosis*. Zasada działania tej metody jest zbliżona do LAMP, jednakże nie jest konieczna denaturacja kwasów nukleinowych, która w przypadku LAMP okazuje się niekiedy kluczowa do uzyskania zadowalających wyników. CPA wykorzystuje 5-8 par starterów nukleotydowych, które przyłączając się do matrycy DNA tworzą struktury spinek do włosów i powodują oddzielanie podwójnych nici matrycowego DNA i amplifikację potomnych fragmentów katalizowaną przez polimerazę. Z tego względu etap denaturacji DNA nie jest konieczny. Odczyt uzyskanych wyników jest analogiczny jak w przypadku metody LAMP, jednakże przez pominięcie etapu denaturacji możliwe jest skrócenie i uproszczenie jej przebiegu. W podjętych przeze mnie badaniach metodę CPA opracowano i zastosowano do specyficznego wykrywania fragmentu  $\sigma$ NS ARV. Na podstawie przeprowadzonej optymalizacji metody stwierdzono, że jest ona specyficzna wyłącznie dla ARV, ponieważ nie obserwowano reakcji krzyżowych z innymi RNA-wirusami drobiu grzebiącego, takimi jak: CAV czy REV. Podobnie jak w przypadku opracowywanych wcześniej metod LAMP czułość CPA wynosiła 0,5 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml szczepu standardowego S1133 i była ona odpowiednio 1000 i 10 wyższa w stosunku do metod RT-PCR, czy real-time RT-PCR. Dodatkowo z uwagi na podwójną aktywność enzymatyczną użytej polimerazy *GspSSD* etap odwrotnej transkrypcji nie był konieczny. Dodatkową zaletą był krótki czas reakcji wynoszący 45 min. Opracowana metoda została użyta do wykrywania obecności materiału genetycznego ARV w 32 próbkach wątroby pochodzących od kur przesłanych do badań. Wyniki wykazały obecność ARV w 4 (12,5%) badanych próbek. Technika ta była znacznie prostsza a co istotne jej czułość diagnostyczna znacznie wyższa niż w przypadku konwencjonalnej metody RT-PCR, czy nawet real-time RT-PCR.

Interesujące badania prowadzono również razem z zespołem badawczym dr hab. Andrzeja Gawła z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu nad ustaleniem przyczyny występujących objawów klinicznych oraz śmiertelności wynoszącej 32% w stadzie 2-tygodniowych gąsiąt. Czynnikiem etiologicznym jednostki określanej jako syndrom krwotocznego zapalenia nerek i jelit (HNEG) okazał się polyomavirus gęsi (GHPV). GHPV

należy do rodziny *Papovaviridae* a jego 20 –ścienny wirion ma około 40-50 nm średnicy. GHPV jest DNA-wirusem i koduje dwa typy białek – regulatorowe (T) oraz białka strukturalne (VP). Po raz pierwszy występowanie HNEG u gąsiat opisano w 1969 na Węgrzech, lecz czynnik etiologiczny zidentyfikowano dopiero w roku 2000 [10-11]. Potwierdzeniem przynależności czynnika etiologicznego tej choroby do polyomawirusów było wyizolowanie jego kwasu nukleinowego w warunkach laboratoryjnych. Późniejsze doniesienia dotyczyły występowania polyomawirusów drobiu wodnego ponownie na Węgrzech w Niemczech i we Francji. Przeprowadzone dotychczas badania na terenie kraju wskazywały na możliwość występowania zakażeń GHPV, jednakże nie potwierdzono występowania klasycznej formy HNEG u gęsi, co było przedmiotem opisywanej pracy, która ukazała się w 2014 roku w czasopiśmie *Avian Diseases*. Uzyskane wyniki badań wykluczyły zakażenia innymi patogenami bakteryjnymi i wirusowymi, występującymi u gęsi. Przeprowadzone testy biologii molekularnej włączając PCR powielający kompletny genom GHPV i jego sekwencjonowanie potwierdziły iż Wyizolowany szczep GHPV wykazywał wysokie podobieństwo (99,5-100%) ze szczepami izolowanymi dotychczas w Europie. Prawdopodobnym przodkiem filogenetycznym wyizolowanego w kraju szczepu był szczep Toulouse 2000 wyizolowany we Francji z przebiegu HNEG.

Wyniki badań dotyczących występowania nowego wariantu reowirusa ptasiego ARV, opracowania metody CPA ARV oraz przypadku HNEG u gęsi opublikowano w następujących pracach:

**G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, A. Gawel. Occurrence of reovirus infection in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) in south western Poland. **Pol J Vet Sci.** 2014; 17, 299-305. **IF<sub>2012</sub> = 0,71**

**G. Woźniakowski**, J.S.Niczyporuk, E. Samorek-Salamonowicz , A. Gawel . The development and evaluation of cross-priming amplification (CPA) for the detection of avian reovirus (ARV). **J Appl Microbiol.** 2014 doi: 10.1111/jam.12705. **IF<sub>2014</sub>=2,38**

A. Gawel, **G. Woźniakowski**, E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń, M. Nowak, K. Bobusia, K. Bobrek. Hemorrhagic nephritis and enteritis in goose flock in Poland - disease course analysis and characterization of etiologic agent. **Avian Dis.** 2014, 58, 518-522. **IF<sub>2013</sub> = 1,10**

#### 4.6. Identyfikacja pasożytów z rodzaju *Nosema* u pszczoł miodnych metodą LAMP

W ramach współpracy pomiędzy PIWet-PIB a Zakładem Botaniki i Mykologii UMCS w Lublinie podjęto próbę opracowania metody LAMP do identyfikacji i różnicowania sporowców z rodzaju *Nosema* u pszczoł miodnych (*Apis mellifera*). Obecnie nosemoza jest jedną z najpoważniejszych chorób pszczoł o pochodzeniu grzybiczym wywoływanym przez mikrosporydia, która powoduje poważne straty w hodowli oraz obniżone zbiory miodu. Zakażenia wywoływane przez gatunki *Nosema apis* i *Nosema ceranae* prowadzą do skrócenia czasu życia zakażonych pszczoł oraz ograniczenie produkcji miodu do 40%. Obecna diagnostyka zakażeń tymi dwoma patogenami obejmuje obserwację mikroskopową, transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) oraz metody biologii molekularnej, takie jak PCR oraz real-time PCR. Pomimo użyteczności tych metod są one nadal praco- i czasochłonne oraz wymagają zastosowania zaawansowanej aparatury laboratoryjnej. Również w tym przypadku ciekawą alternatywą jest opracowany po raz pierwszy przez nasz zespół test LAMP do wykrywania i różnicowania *N. apis* od *N. ceranae* w niespełna 30 min z użyciem prostej łaźni wodnej oraz lampy UV. Czułość opracowanej metody była bardzo wysoka i wynosiła 100 fg DNA. Co więcej była ona 1000 razy czulsza niż zastosowany konwencjonalny PCR. Opracowana technika pozwoliła na sprawne różnicowanie obu gatunków *Nosema sp.* bez zastosowania dodatkowego specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego, co czyni ją wyjątkowo atrakcyjną i możliwą do wykonania w praktycznie każdych warunkach. Wyniki badań opisano w 2014 roku w poniższej pracy:

AA. Ptaszyńska, G. Borsuk, **G. Woźniakowski**, S. Gnat, W. Małek. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees. **FEMS Microbiol Lett.** 2014, 357, 40-48, IF<sub>2014</sub> = **2,046**

Podsumowując moją działalność naukową poza zgłaszanym osiągnięciem naukowym po ukończeniu doktoratu uczestniczyłem w pracach i byłem współautorem 14 publikacji naukowych w czasopiśmie z listy JCR.

#### **4.7. Piśmienictwo związane z tematyką badań.**

- 1) Abdul-Careem M.F., Hunter B.D., Nagy E., Read L.R., Sanei B., Spencer J.L., Sharif S.: Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *J. Virol. Methods* 133, 34-40, 2005.
- 2) Baigent S.J., Petherbridge L.J., Howes K., Smith L.P., Currie R.J., Nair V.K.: Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feathers and lymphocyte samples using real-time PCR. *J. Virol. Methods* 123, 53-64, 2005.
- 3) Becker Y., Asher Y., Tabor E., Davidson I., Malkinson M., Weisman Y.: Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV - serotypes 2 and 3. *J. Virol. Methods* 40, 307 – 322, 1992.
- 4) Bellon M., Nicot C.: Regulation of telomerase and telomeres: human tumor viruses take control. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 98-108, 2008.
- 5) Biggs P.M.: Marek's disease. W: *The Herpesviruses* (Eds), Kaplan A.S., Academic Press, New York, 557-594, 1973.
- 6) Blasco M.A.: Mouse models to study the role of telomeres in cancer, aging and DNA repair. *Eur. J. Cancer* 38, 2222-2228, 2002.
- 7) Brown K.E., Green S.W., Young NS.: Goose parvovirus-An autonomous member of the dependovirus genus? *Virology* 210, 283-291. 1995.
- 8) Calnek B.: Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255, 25-55, 2001.
- 9) Chbab N., Egerer A., Veiga I., Jarosinski K.W., Osterrieder N.: Viral control of vTR expression is critical for efficient formation and dissemination of lymphoma induced by Marek's disease virus (MDV). *Vet. Res.* 41-56, 2010.
- 10) Corrand L., Gelfi J., Albaric O., Etievant M., Pingret J.L., Guerin J.L.: Pathological and epidemiological significance of goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks. *Avian Pathol.* 40, 355-360. 2011.
- 11) Dobos-Kovács M., Horváth E., Farsang A., Nagy E., Kovács, A., Szalai F., Bernáth S.: Haemorrhagic nephritis and enteritis of geese: pathomorphological investigations and proposed pathogenesis. *Acta Vet Hung.* 53, 213-223. 2005.

- 12) Gailbreath, KL, Oaks JL: Herpesviral inclusion body disease in owls and falcons is caused by the pigeon herpesvirus (columbid herpesvirus 1). *J Wildl Dis.* 44:427-433, 2008.
- 13) Handberg K.J., Nielsen O.L., Jorgensen P.H.: The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol.* 30, 243-249, 2001.
- 14) Gough R.E.: Goose parvovirus infections. In: *Diseases of Poultry.* Saif Y.M., Barnes H. J., Gilsson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D.E. 11<sup>th</sup> ed. Iowa State Univ. Press, Ames, USA. pp. 367-374, 2003.
- 15) Le Gall-Reculé G. and Jestin V.: Biochemical and genomic characterization of Muscovy duck parvovirus. *Arch. Virol.* 139,121-131. 1994.
- 16) Haq K., Faizal M., Sangitha A.C., Niroshan S., Dona T., Reada L.R., Sharif S.: Vaccine-induced host responses against very virulent Marek's disease virus infection in the lungs of chickens. *Vaccine* 28, 5565-5572, 2010.
- 17) Islam A., Harrison B., Cheetham B.F., Mahony T.J., Young P.L., Walkden-Brown S.W.: Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 119, 103-113, 2004.
- 18) Ji J., Xie Q.M., Chen C.Y., Bai S.W., Zou L.S., Zuo K.J., Cao Y.C., Xue C.Y., Ma Y., Bi Y.Z.: Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop-mediated isothermal amplification assay. *Poult. Sci.* 89, 477-483, 2010.
- 19) JinLong Y., Rui Y., AnChun Ch., MingShu W., LiZhi F., SongQuan Y., SuHui Z., Liu Y., ZhiYong X.: A simple and rapid method for detection of goose parvovirus in the field by loop-mediated isothermal amplification. *Virol. J.* 7, 14, 2010.
- 20) Kaleta E, Docherty D: Avian herpesviruses. In *Infectious Disease of Wild Birds.* Edited by Thomas N, Hunter D, Atkinson C. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2007:63-86.
- 21) Kaufer B.B., Trapp S., Jarosinski K.W., Osterrieder N.: Herpesvirus telomerase RNA (vTR)-dependent lymphoma formation does not require interaction of vTR with telomerase reverse transcriptase (TERT). *PLoS Pathog.* 6, e1001073, 2010.
- 22) Murata S., Chang K.S., Lee S., Konnai S., Onuma M., Ohashi K.: Development of a nested polymerase chain reaction method to detect oncogenic Marek's disease virus from feather tips. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 471-478, 2007.

- 23) Njiru Z.K., Mikosza A.S., Armstrong T., Enyaru J.C., Ndung'u J.C., Thompson A.R.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e147, 2008.
- 24) Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl. Ac. Res.* 28, 63, 2002.
- 25) Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K.: Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 42, 257-263, 2004.
- 26) Paris H.P., Imwong M., Faiz A.M., Hasan M., Yunus E.B., Silamut K., Lee S.J. Day N.P., Dondorp A.M.: Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 972-976, 2007.
- 27) Petherbridge L., Brown A.C., Baigent S.J., Howes K., Sacco M.A., Osterrieder N., Nair V.K.: Oncogenicity of virulent Marek's disease virus cloned as bacterial artificial chromosomes. *J. Virol.* 78, 13376-13380, 2004.
- 28) Pham H.M., Nakajima C., Ohashi K., Onuma M.: Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1646-1650, 2005.
- 29) Rahaus M, Dwsloges N, Probst S, Loebbert B, Lantermann W, Wolff MH: Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds. *Vet Med-Czech* 53:53-58, 2008.
- 30) Schumacher D., Tischer K., Fuchs W., Osterrieder N.: Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J. Virol.* 74, 11088-11098, 2000.
- 31) Todd D: Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet Microbiol.* 98:169-174, 2004.
- 32) Yang J., Yang R., Cheng A., Wang M., Fu L., Yang S., Zhang S., Yang L., Xu Z.: A simple and rapid method for detection of goose parvovirus in the field by loop-mediated isothermal amplification. *Virol. J.* 21, 7-14, 2010.
- 33) Yoda T., Suzuki Y., Yamazaki K., Sakon N., Kanki M., Aoyama I.: Evaluation and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of noroviruses. *J. Med. Virol.* 79, 326-334, 2007.

34) Zádori Z., Erdei J., Nagy J., Kisary J.: Characteristics of the genome of goose parvovirus. Avian Pathol. 23, 359-364. 1994.

## 5. 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 (IF) w roku publikacji            | Sumaryczny IF | Liczba punktów MNiSW | Razem punkty MNiSW |
|-----------------------------------------------------|----------------|-------------------|-------------------------------------------------|---------------|----------------------|--------------------|
| Acta Veterinaria Scandinavica                       | 2011           | 1                 | 1,367                                           | 1,367         | 27                   | 27                 |
| Archives of Virology                                | 2013           | 1                 | 2,03                                            | 2,03          | 20                   | 20                 |
|                                                     | 2014           | 1                 | 2,28                                            | 2,28          | 20                   | 20                 |
| Avian Diseases                                      | 2011           | 1                 | 1,462                                           | 1,462         | 32                   | 32                 |
|                                                     | 2013           | 1                 | 1,734                                           | 1,734         | 35                   | 35                 |
|                                                     | 2014           | 2                 | 1,107                                           | 2,214         | 35                   | 70                 |
| BMC Veterinary Research                             | 2012           | 1                 | 2,37                                            | 2,37          | 45                   | 45                 |
|                                                     | 2013           | 1                 | 2,00                                            | 2,00          | 35                   | 35                 |
| Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy      | 2007           | 1                 | 0,273                                           | 0,273         | 20                   | 20                 |
|                                                     | 2009           | 2                 | 0,218                                           | 0,436         | 20                   | 40                 |
|                                                     | 2010           | 3                 | 0,321                                           | 0,963         | 20                   | 60                 |
|                                                     | 2012           | 1                 | 0,377                                           | 0,377         | 20                   | 20                 |
|                                                     | 2013           | 4                 | 0,377                                           | 1,508         | 20                   | 80                 |
| FEMS Microbiology Letters                           | 2014           | 1                 | 2,046                                           | 2,046         | 25                   | 25                 |
| Journal of Applied Microbiology                     | 2014           | 1                 | 2,386                                           | 2,386         | 30                   | 30                 |
| Letters of Applied Microbiology                     | 2014           | 1                 | 1,749                                           | 1,749         | 20                   | 20                 |
| Medycyna Weterynaryjna                              | 2014           | 1                 | 0,196                                           | 0,196         | 15                   | 15                 |
| Polish Journal of Veterinary Science                | 2010           | 1                 | 0,507                                           | 0,507         | 20                   | 20                 |
|                                                     | 2012           | 1                 | 0,57                                            | 0,57          | 20                   | 20                 |
|                                                     | 2013           | 1                 | 0,57                                            | 0,57          | 20                   | 20                 |
|                                                     | 2014           | 2                 | 0,712                                           | 1,424         | 20                   | 40                 |
| Virology Journal                                    | 2012           | 1                 | 2,55                                            | 2,55          | 25                   | 25                 |
| Liczba komunikatów konferencyjnych                  | 31             |                   |                                                 |               |                      |                    |
| Ogółem liczba publikacji w czasopismach z listy JCR | 29             |                   | Ogółem liczba punktów za czasopisma z listy JCR |               |                      | 719                |
| Sumaryczny impact factor (IF) przed doktoratem      | 8,00           |                   |                                                 |               |                      |                    |
| Sumaryczny impact factor (IF) po doktoracie         | 23,62          |                   |                                                 |               |                      |                    |
| Sumaryczny IF                                       | 31,62          |                   |                                                 |               |                      |                    |
| Liczba cytowań według Web                           | 53             |                   |                                                 |               |                      |                    |



|                                                          |              |  |
|----------------------------------------------------------|--------------|--|
| of Science (WoS)                                         |              |  |
| Liczba cytowań według Google Scholar                     | <b>70</b>    |  |
| Indeks Hirscha WoS                                       | <b>5</b>     |  |
| Indeks Hirscha według Google Scholar                     | <b>6</b>     |  |
| Sumaryczny IF zgłaszanych w ramach osiągnięcia naukowego | <b>10,17</b> |  |
| Liczba punktów MNiSW w ramach osiągnięcia naukowego      | <b>150</b>   |  |

## 6. Recenzje publikacji naukowych

Dotychczas byłem recenzentem 40 publikacji naukowych w recenzowanych czasopismach zagranicznych o zasięgu międzynarodowym. Pełna lista opracowanych recenzji prac znajduje się w Załączniku nr 3 o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

## 7. Realizowane projekty badawcze

- N 308 045 32/4223:** Analiza filogenetyczna krajowych izolatów wirusa choroby Derzsy'ego. 2007-2010 (wykonawca).
- N 308 09 03 37:** Występowanie onkogenów w przebiegu zakażenia wirusem choroby Mareka, 2009-2012 (wykonawca).
- N N308 23 64 38:** Otrzymanie rekombinowanych szczepów wirusa choroby Mareka. 2010 -2013 (wykonawca).
- N N308 571240:** Interakcje pomiędzy adenowirusami ptasimi a szczepami wirusa choroby Mareka stosowanymi w immunoprofilaktyce. 2011-2014 (wykonawca).
- 2011/01/B/NZ7/01561:** Ewolucja genów wirusa choroby Mareka związanych z onkogennością. 2011-2014 (wykonawca).
- **Projekt badawczo-rozwojowy nr 12-012610 – zadanie nr 20:** „Ptaki wodne, wolno żyjące jako rezerwuar i wektor w szerzeniu się zakażeń parwowirusami (GPV), cirkowirusami, polyomawirusami (HNEG) oraz wirusem zakaźnego zapalenia wątroby kacząt (DFV) dla drobiu wodnego i wirusem Zachodniego Nilu dla człowieka”. 2011-2015 (wykonawca).
- **Projekt badawczo-usługowy nr U/406** „Bionanowłókna jako bariery wirusów”. Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu. 2013 (wykonawca).

- **Program wieloletni W/110** „Opracowanie metod diagnostyki i ocena zagrożenia występowania zakażeń wirusem Zachodniego Nilu u ptaków w Polsce”. 2009-2013 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/011.** „Ocena zmian w subpopulacjach limfocytów T we krwi kurcząt w przebiegu zakażenia wirusem choroby Mareka”. 2006-2008 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/012.** „Ocena sytuacji epizootycznej w stadach gęsi w Polsce” 2006-2008 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/018.** „Charakterystyka molekularna genów kodujących białka VP1, VP2 i VP3 wirusa choroby Derzsyego” 2008-2010 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/019.** „Zastosowanie technik PCR do określania rozprzestrzenienia szczepu szczepionkowego u piskląt uodpornianych przeciwko chorobie Mareka”. 2007-2009 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/021.** „Opracowanie reakcji amplifikacji (RT-PCR) do wykrywania wirusa zapalenia wątroby typu 1 u kacząt 2007-2009 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/022.** „Wykrywanie wirusa choroby Mareka przy użyciu Real-Time PCR”. 2009-2011 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/023.** „Wykrywanie adenowirusów ptasich za pomocą wybranych metod PCR”. 2009-2011 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/030.** „Opracowanie i zastosowanie Real-Time PCR do diagnostyki choroby Derzsyego. 2009-2011 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/092.** „Opracowanie rekombinowanej szczepionki przeciwko chorobie Mareka” 2012-2014 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/093** „Ocena występowania i patogenności adenowirusów w stadach kur w kraju”. 2012-2014 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/094** „Ocena sytuacji epidemiologicznej zakażeń parwowirusami u drobiu grzebiącego w Polsce. 2012-2014 (wykonawca).
- **Działalność statutowa. Temat S/099** „Występowanie zakażeń wirusowych w stadach kaczek w Polsce. 2012-2014 (wykonawca).

## **8. Staże naukowe, kursy**

Staż naukowy w Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG Niemcy, 2008 (1,5 miesiąca)

Staż naukowy w Laboratoire d'Etudes et de Recherchers en Pathologie et Zoonoses, AFFSA, Francja, 2008 (1 tydzień)

Staż (FEMS Research Fellowship) w Wolnym Uniwersytecie w Berlinie, Instytut Wirusologii, Niemcy, 2009 (1,5 miesiąca)

Kurs "Sekwencjonowanie DNA" Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, 2007

Kurs "Techniki wprowadzania DNA do komórek i analiza ekspresji" AR Poznań, 2007

Szkolenie "Real - Time PCR", UWM Olsztyn, 2008

Szkolenie "Molekularna filogenetyka", Warszawa, 2008

Szkolenie "Analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA" Łódź, 2008

## **9. Nagrody i wyróżnienia krajowe i międzynarodowe**

- Nagroda Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi za osiągnięcia w zakresie wdrażania postępu w rolnictwie, rozwoju wsi, rynkach rolnych i rybołówstwie w realizacji pracy zespołowej „Opracowanie i wdrożenie metody LAMP w diagnostyce chorób wirusowych ptaków”. Warszawa 2013 r.

- Nagroda Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi za osiągnięcia w zakresie wdrażania postępu w rolnictwie, rozwoju wsi, rynkach rolnych i rybołówstwie w realizacji pracy zespołowej „Opracowanie i wdrożenie metody multiplex PCR do diagnostyki chorób wirusowych drobiu wodnego”. Warszawa 2009 r.

-Stypendium FEMS Research Fellowship (Freie Universität, Berlin, Prof. Klaus Osterrieder Lab, 2009).

- Stypendium w Programie Urzędu Marszałkowskiego Województwa Lubelskiego pt: „Stypendia dla doktorantów II”, Lublin 2011 w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytet VIII Regionalne Kadry Gospodarki, Działanie 8.2 Transfer Wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji.

- Nagroda II stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych w roku 2009 za pracę naukową pt: „Genetic ariance of Derzsy;s disease strains isolated in Poland” opublikowaną w Journal of Molecular and Genetic Medicine 2, 2009.

- Nagroda III stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych w roku 2007 za współautorstwo w pracy „Duplex PCR fot detection and differentiation of pathogenic and vaccine strains of MDV serotype 1 opublikowanej w Bull. Vet. Inst. Puławy 51, 2007.
- Nagroda III stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych w roku 2011 za 2 prace dotyczące choroby Mareka opublikowane w czasopismach Acta Veterinaria Scandinavica 53:2011 oraz Avian Diseases 55:2011.
- Wyróżnienie za pracę przedstawioną w sesji plakatowej XXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Drobnoustroje bez granic”, Lublin 2011.
- Wyróżnienie za najlepszą prezentację pracy pt: „Determination of the virulence level of Polish Marek's disease strains on the basis of *meq* oncogene sequence” w sesji „Wirusologia” podczas X jubileuszowej Konferencji Naukowej „Biologia Molekularna w Diagnostyce Chorób Zakaźnych i Biotechnologii”. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 2009.
- Nagroda Fundacji "Centrum Mikrobiologii Klinicznej" za osiągnięcia naukowe w dziedzinie mikrobiologii klinicznej, Lublin 2012.
- Nagroda II stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych w 2012 roku za pracę pt: „Quantitative analysis of waterfowl parvoviruses in geese and Muscovy duck by real-time polymerase chain re action: correlation between Age, clinical symptoms and DNA copy number of waterfowl parvoviruses” opublikowanej w BMC Veterinary Research 8, 2012.
- Nagroda II stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych w 2012 roku w kategorii za pracę doktorską pt „Występowanie i analiza molekularna wybranych genów wirusa choroby Mareka w przebiegu zakażenia kurcząt”.
- Wielokrotnie byłem też nagradzany w konkursie Dyrektora PIWet-PIB na najlepszą publikację naukową w latach: 2009, 2010, 2011, 2012 i 2013 roku.

## **10. Przynależność do towarzystw i organizacji naukowych**

- jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów – Sekretarzem Oddziału PTM w Puławach
- należę do Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych oraz Polskiego Towarzystwa Wirusologicznego

- jestem członkiem World Veterinary Poultry Association oraz Europejskiego Stowarzyszenia Diagnostów Weterynaryjnych (EAVD)

## **11. Promotorstwo pomocnicze**

Jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim lek. wet. Karoliny Tarasiuk z Zakładu Chorób Wirusowych Drobiu PIWet-PIB. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Elżbieta Samorek-Salamonowicz prof. zw. Tytuł roboczy rozprawy brzmi: „Charakterystyka molekularna terenowych szczepów wirusa choroby Derzsy’ego”.

## **12. Uczestnictwo w konferencjach krajowych i zagranicznych**

XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Szczecin 2008 (1 prezentacja plakatu)

XVIth International World Veterinary Poultry Association Congress, Maroko, 2009

(1 wystąpienie ustne oraz 1 prezentacja plakatu)

3rd Annual Meeting EPIZONE, Turcja, 2009 (1 prezentacja plakatu)

Konferencja Drobiarska "Aktualne Problemy w Patologii Drobiu", Wrocław 2009

(1 prezentacja ustna)

5th International Workshop of Molecular Pathogenesis of Marek's disease, Athens, USA, 2010 (2 wystąpienia ustne)

4th Annual Meeting EPIZONE, Francja 2010 (2 prezentacje plakatów)

5<sup>th</sup> EPIZONE Theme 5 meeting, Kopenhaga, Dania 2010 (1 wystąpienie ustne, 1 prezentacja plakatu)

5th Annual Meeting EPIZONE, Holandia, 2011 (1wystąpienie ustne)

International Herpesvirus Workshop, Gdańsk 2011 (1 wystąpienie ustne)

XVIIth International World Veterinary Poultry Association Congress, Cancun, Meksyk 2011 (3 wystąpienia ustne, 2 prezentacje plakatów)

Konferencja drobiarska: Aktualne problemy w patologii drobiu, Wrocław 2011

6thAnnual Meeting EPIZONE, Anglia 2012 (1 wystąpienie ustne, 1 prezentacja plakatu)

9th International Meeting on Marek's Disease and Avian Herpesviruses. Niemcy 2012 (1 wystąpienie ustne, 1 prezentacja plakatu)

Konferencja drobiarska: Aktualne problemy w patologii drobiu, Wrocław 2012 (1

wystąpienie ustne)

XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Lublin, 2012 (2 prezentacje plakatów)

International Herpesvirus Workshop, Calgary, Kanada, 2012 (1 doniesienie ustne, 1 prezentacja plakatu)

International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA, 2013 (1 doniesienie ustne, 1 prezentacja plakatu)

XVIIIth International World Veterinary Poultry Association Congress, Nantes, Francja (2 wystąpienia ustne)

7th Annual Meeting EPIZONE, Bruksela, Holandia 2013 (1 wystąpienie ustne)

10th International Symposium on Marek's disease virus and avian herpesviruses, East Lansing, USA 2014 (2 wystąpienia ustne, 1 prezentacja plakatu).

### **13. Udział w organizacji konferencji naukowych**

Podczas konferencji 9th International Meeting on Marek's Disease and Avian Herpesviruses byłem zaangażowany w organizację konferencji, recenzję doniesień naukowych oraz udział jako „chairman” w sesji „Epidemiology”.

Udział w organizacji Międzynarodowego Seminarium “Immunoprofilaktyka choroby Mareka” dla lekarzy weterynarii – specjalistów chorób drobiu, PIWet-PIB, Intervet Schering-Plough Animal Health, Kazimierz-Dolny, 2011

Udział w programie „Symbiosis – nowoczesne narzędzie edukacji ekologicznej w oparciu o ośrodki rehabilitacji dzikich zwierząt”.

W latach 2009-2012 czynnie uczestniczyłem w organizacji corocznych konferencji w ramach działalności Young EPIZONE.

W roku 2009 uczestniczyłem w przygotowaniu konferencji pt: „Choroba Mareka u kur oraz choroba Derzsy'ego u gęsi” w PIWet-PIB.

Miejscowość, data:

*Putawy, 12.01.2015*

Podpis

*Gregorz Wójcikowski*