Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

dr n. wet. Tomasz Stenzel

Katedra Chorób Ptaków

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2017

1. **Imię i nazwisko**

   Tomasz Adam Stenzel

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

   2010 Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w zakresie chorób ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ różnych immunomodulatorów na wybrane parametry odporności nieswoistej i swoistej u gołębi (*Columba Livia domestica*), oraz przebieg zakażenia paramyksowirusem gołębim (PPMV-1).

   2006 Tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

01.03.2011 do chwili obecnej	Adiunkt, Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
10.10.2008 – 28.02.2011	Asystent, Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
01.10.2006 – 19.11.2010	Doktorant, Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)**

4. 1. Osiągnięcie pod tytułem

„Epidemiologia wybranych zakażeń wirusowych u gołębi w Polsce oraz charakterystyka molekularna krajowych izolatów cirkowirusa gołębiego (Pigeon circovirus, PiCV).”

tworzy jednotematyczny cykl następujących publikacji:

Publikacje oryginalne:

4. 1. 1. Stenzel T.*, Pestka D, Tykałowski B, Śmiałek M, Koncicki A.: Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland. Veterinary Record, 2012, 171, 562. DOI: 10.1136/vr.100932.

MNiSW$_{2012}$ 30 pkt, IF$_{2012}$ 1,803

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na ***80%.***

* *autor korespondencyjny*

4. 1. 2. Stenzel T.*, Pestka D.: Occurrence and genetic diversity of pigeon circovirus strains in Poland. Acta Veterinaria Hungarica, 2014, 62, 274-283.

MNiSW$_{2014}$ 20 pkt, IF$_{2014}$ 0,646

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na ***90%.***

* *autor korespondencyjny*

4. 1. 3. Stenzel T.*, Piasecki T., Chrząstek K., Julian L., Muhire B.M., Golden M., Martin D.P., Varsani A.*: Pigeon circoviruses display patterns of recombination, genomic secondary structure and selection similar to those of Beak and feather disease viruses, Journal of General Virology, 2014, 95, 1338-1351.

MNiSW$_{2014}$ 35 pkt, IF$_{2014}$ 3,183

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na częściowym opracowaniu koncepcji badań i metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji części wyników, formułowaniu wniosków oraz częściowym przygotowaniu manuskryptu.

*Mój udział procentowy szacuję na **40%**.*

* *autor korespondencyjny*

4. 1. 4. Stenzel T.*, Pestka D., Choszcz D.: The prevalence and genetic characterization of Chlamydia psittaci from domestic and feral pigeons in Poland and the correlation between infection rate and incidence of pigeon circovirus. Poultry Science, 2014, 93, 2991-3001.

MNiSW$_{2014}$ 40 pkt, IF$_{2014}$ 1,672

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

*Mój udział procentowy szacuję na **85%**.*

* *autor korespondencyjny*

4. 1. 5. Stenzel T.*, Woźniakowski G., Pestka D., Choszcz D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A.: Application of pigeon circovirus recombinant capsid protein for detecting anti-PiCV antibodies in the sera of asymptomatic domestic pigeons and the potential use of a combination of serological and molecular tests for controlling circovirus infections in pigeon breeding flocks. Poultry Science, 2016, 96, 303-308.

MNiSW$_{2014}$ 35 pkt, IF$_{2014}$ 1,685

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

*Mój udział procentowy szacuję na **70%**.*

* *autor korespondencyjny*

Łączna punktacja 5 prac, wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) wynosi **160 punktów MNiSW**, a współczynnik wpływu **(IF) 8,976**.

Publikacja 4.1.5 powstała jako efekt badań finansowanych z projektu badawczego realizowanego w ramach konkursu Sonata 8 (UMO-2014/15/D/NZ6/02416), przyznanego przez NCN na lata 2015-2018, którego jestem kierownikiem.

4. 2. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.2.1. Wprowadzenie i cel przeprowadzonych badań

Jednym z większych problemów zdrowotnych w hodowli gołębi są zespoły chorobowe będące następstwem immunosupresji mającej tło zakaźne. Zakażenia wirusowe przebiegające z dużą zachorowalnością i śmiertelnością, głównie u ptaków młodych nazwano zespołem chorobowym gołębi młodych (young pigeon disease syndrome, YPDS). Od młodych gołębi chorujących z objawami biegunki i zwracania z wola izolowano adenowirusy ptasie należące do grupy pierwszej, serotypu 4 (FadV-4). Histopatologicznie u gołębi padłych notowano wtrętowe zapalenie wątroby (Hess i wsp. 1998, Vereecken i wsp. 1998). Początkowo podejrzewano, że to właśnie adenowirusy mogą być odpowiedzialne za wywoływanie zespołu chorobowego gołębi młodych. Przeprowadzone przez Hessa i wsp. (1998) testy neutralizacji krzyżowej wykazały, że wirus ten różni się od adenowirusów występujących u drobiu, więc nazwano go adenowirusem gołębi (PiAV). Powyższe odkrycie stało się podstawą do opracowania szybkiej i czułej metody rozróżniania adenowirusów gołębich od FadV oraz innych wirusów za pomocą technik PCR (Raue i Hess 2002). Dzięki temu udało się wykazać, że z wszystkich przypadków klinicznych YPDS nie jest izolowany PiAV, za to w przeważającej ich liczbie stwierdzano obecność materiału genetycznego cirkowirusa gołębiego (Pigeon circovirus, PiCV, Columbid circovirus, CoCV) (Raue i wsp. 2005).

Zakażenia cirkowirusowe gołębi po raz pierwszy zdiagnozowano w 1986r. w Kanadzie (Woods i wsp. 1994, Paré i wsp. 1999). W krótkim czasie pojawiły się doniesienia o jego występowaniu u gołębi w innych krajach, między innymi Australii, USA i wielu krajach

europejskich (Woods i wsp. 1994, Smyth i Caroll 1995, Abadie i wsp. 2001, Todd i wsp. 2001, Roy i wsp. 2003, Taras i wsp. 2003, Franciosini i wsp. 2005, Duchatel i wsp. 2005, 2006, Raue i wsp. 2005). Zakażenia tym wirusem manifestują się szerokim spektrum objawów klinicznych takich jak utrata masy ciała, spadek formy lotowej, problemy oddechowe, zwracanie z wola, biegunka oraz sporadycznie problemy z opierzaniem się (Raue i wsp. 2005). Zespół chorobowy wywoływany przez PiCV jest zbliżony pod kątem patomechanizmu do występującego u prosiąt poodsadzeniowego, wielonarządowego zespołu wyniszczającego (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) (Darwich i Mateu, 2012), dlatego też coraz częściej cirkowiroza nazywana jest zespołem chorobowym gołębi młodych. Badanie histopatologiczne chorych ptaków pozwala na wykrycie charakterystycznych wewnątrzcytoplazmatycznych ciałek wtrętowych w komórkach tkanki limfatycznej (Shivaprasad i wsp. 1994, Gough i wsp. 1996, Caletti i wsp. 2000). Infekcja cirkowirusem gołębim powoduje zanik utkania limfatycznego, co jest główną przyczyną immunosupresji u zakażonych ptaków (Paré i wsp. 1999, Raue i wsp. 2005). Osłabiona reaktywność układu odpornościowego zainfekowanych gołębi sprzyja występowaniu zakażeń oportunistycznych wywołanych przez *Escherichia coli* czy *Klebsiella pneumoniae* (Abadie i wsp. 2001, Taras i wsp. 2003, Raue i wsp. 2005) oraz obniżeniu efektywności szczepień, co często skutkuje przełamywaniem odporności poszczepiennej przeciwko paramyksowirusowi gołębiemu (PPMV-1). Pomimo powszechnego występowania cirkowirusów u gołębi nie zawsze dochodzi do wykształcenia się wszystkich objawów choroby, stąd istnieje teoria, że do jej powstania konieczne są dodatkowe czynniki takie jak np. stres związany z odstawieniem piskląt od rodziców, czy rozpoczynającymi się treningami, lotami oraz szczepieniami (Schmidt i wsp. 2008).

Genom cirkowirusów występujących u ptaków stanowi kuliste jednoniciowe DNA zawierające około dwóch tysięcy par zasad (pz) tworzących pięć otwartych bramek odczytu (ORFs). Największa, ORF – V1 koduje białko związane z replikacją wirusa (białko Rep), druga co do wielkości, ORF – C1 koduje białko kapsydu wirusa (białko Cap, CP) (Mankertz i wsp. 2000, Johne i wsp., 2006). Pozostałe trzy mniejsze bramki odczytu kodują u PiCV białka o niewyjaśnionej dotychczas funkcji. Poza faktem, że CP jest głównym elementem budującym kapsyd cirkowirusów odgrywa ono pośrednią rolę we wnikaniu DNA wirusa do

jądra komórkowego żywiciela. Badania przeprowadzone nad cirkowirusem papug wykazały, że bogaty w argininę koniec-N tego białka ma zdolność wiązania się z DNA gospodarza za pomocą sekwencji lokalizującej jądro komórkowe (nuclear localisation sequence, NLS) co umożliwia przedostanie się wirusowego DNA do jądra komórkowego żywiciela poprzez kompleks porów jądrowych (Heath i wsp., 2006).

Badania przeprowadzone na świecie wykazały, że w przeciwieństwie do genu kodującego białko Rep, gen kodujący CP często podlega mutacjom (Zhang i wsp., 2011, Cságola i wsp., 2012). Podobieństwo nukleotydowe genu kodującego białko kapsydu u różnych szczepów PiCV wynosi średnio 87%, a obecność odrębnych kladów (grup filogenetycznych) utworzonych na podstawie przyrównania sekwencji całych genomów jest wynikiem różnic w sekwencjach nukleotydowych właśnie tego białka (Zhang i wsp., 2011). Powyższe stanowi podstawę w ewolucji cirkowirusów wynikającą z pozytywnej selekcji będącej następstwem kontaktu z układem odpornościowym gospodarza. Tłumaczyć to należy faktem, że białko kapsydu jako zewnętrzne białko wirusa eksponowane jest na komórki układu odpornościowego gospodarza, co stymuluje całą kaskadę reakcji immunologicznych. Wobec czego aby wirus nie tracił zdolności do wiązania się z receptorem komórki docelowej i tym samym zdolności zakażania komórek na skutek neutralizowania go przez przeciwciała, muszą pojawiać się mutacje skutkujące zmianą struktury CP (Benett i wsp., 2006). Ze względu na wspomniane wcześniej różnice w sekwencji nukleotydowej kodującej białko Cap będącej podstawą do podziału cirkowirusów gołębich na 5 głównych podgrup (kladów) oraz, że wiele z zakażonych ptaków nie wykazuje objawów chorobowych wysnuto hipotezę, że może istnieć korelacja pomiędzy grupą filogenetyczną PiCV a jego patogennością (Cságola i wsp., 2012). Teoria ta wymaga jednak weryfikacji.

Kapsyd cirkowirusów tworzą powtarzające się podjednostki CP, dzięki czemu uważa się, że jest to główne białko antygenowe tych wirusów (Crowther i wsp., 2003). Reakcje immunologiczne w odpowiedzi na kontakt z kapsydem cirkowirusa wykazano u wielu cirkowirusów, m. in. cirkowirusa świń (porcine circovirus type 2, PCV-2), cirkowirusa papug (psittacine beak and feather disease virus, PBFDV) oraz PiCV (Bonne i wsp., 2009, Daum i wsp., 2009, Trible i wsp., 2011). Dla przykładu odpowiedź immunologiczna w postaci pojawiających się przeciwciał występowała od 2 do 4 tygodni po ekspozycji prosiąt na wirus lub białko kapsydu cirkowirusa świń (Trible i wsp., 2011). Występowanie reakcji ze strony

układu odpornościowego żywiciela na kontakt z kapsydem cirkowirusa manifestującej się wytwarzaniem swoistych przeciwciał może być wykorzystane do opracowania testów serologicznych. Ze względu na brak możliwości hodowli PiCV, alternatywnym rozwiązaniem jest uzyskanie rekombinowanego białka kapsydu tego wirusa i wykorzystanie go jako antygen diagnostyczny (Daum i wsp., 2009, Duchatel i wsp., 2011, Lai i wsp., 2014). Wstępne badania przeprowadzone przez Daum i wsp. (2009) wykazały, że rekombinowane białko kapsydu może być z powodzeniem wykorzystywane do przeprowadzania monitoringu serologicznego w stadach gołębi. Przeprowadzone przez zespół tej Autorki badania retrospektywne na surowicach gołębich uzyskanych w latach 1989, 1991 oraz 2008 wykazały obecność przeciwciał przeciwko PiCV średnio w 78% (61-90%) badanych próbkach.

Jednym z wirusów często uczestniczących w YPDS jest herpeswirus gołębi (pigeon herpesvirus, PiHV). Zakażenia herpeswirusowe notowane były już wiele lat temu u gołębi chorujących z objawami nerwowymi, infekcjami górnych dróg oddechowych, zapaleniem spojówek, zwracaniem z wola oraz/lub zieloną biegunką (Saik i wsp., 1986). Bardzo często u gołębi stwierdza się również latentne zakażenia herpeswirusowe. Początkowo diagnozowanie zakażeń herpeswirusowych opierało się na wykonywaniu badań histopatologicznych, w których stwierdzano wewnątrzjądrowe eozynofilne ciałka wtrętowe w hepatocytach oraz w błonie śluzowej przełyku (Saik i wsp., 1986, Bernabé i wsp., 1994). Aktualnie zakażenia wirusami gołębimi są diagnozowane w mniej inwazyjny i bardziej czuły sposób, na co pozwala wykorzystanie technik biologii molekularnej (Hattermann i wsp., 2002, Todd i wsp., 2002, 2006, Raue i wsp., 2005, Freick i wsp., 2008, Duchatel i wsp., 2009).

Ze względu na niekontrolowany międzynarodowy obrót gołębiami (głównie gołębie pocztowe) oraz loty konkursowe tych ptaków, istnieje możliwość transmisji patogennych dla tego gatunku ptaków wirusów na duże odległości. Duże zagrożenie dla hodowli stwarza fakt importu do Polski gołębi pocztowych z praktycznie całego świata. Ptaki takie, o doskonałym rodowodzie często wykorzystywane są jako reproduktorzy w hodowlach. Stwarza to dodatkowe zagrożenie rozprzestrzenienia wirusów w stadach, ponieważ pomimo, że cirkowirus gołębi szerzy się głównie drogą poziomą poprzez połknięcie lub wdychanie zakontaminowanego wirusem kałomoczu lub pyłu powstałego z piór (Woods i wsp., 1993), udowodniono również możliwość transmisji pionowej PiCV (Duchatel i wsp., 2005, 2006,

Rahaus i wsp., 2008). Praktyki takie jak wspólny (niekiedy kilkudniowy) transport gołębi pocztowych w celu odbycia lotów konkursowych, wspólne, kilkudniowe przebywanie ptaków pochodzących z różnych regionów geograficznych na wystawach i pokazach, a także łączenie ptaków pochodzących z różnych rejonów świata w stada reprodukcyjne sprzyja nie tylko wzajemnej transmisji różnych patogoneów pomiędzy gołębiami, ale także może mieć wpływ na powstawanie nowych, zrekombinowanych szczepów PiCV. Rekombinacje genetyczne są stosunkowo powszechne w przypadku PBFDV występującego w hodowlach zarodowych papug (Julian i wsp., 2013), nie ma natomiast dowodów na to czy stwierdza się je również wśród izolatów PiCV pochodzących od gołębi domowych.

Pomimo wielu danych literaturowych dotyczących przebiegu YPDS ciągle brak jest informacji dotyczących sytuacji epizootycznej najważniejszych wirusów występujących u gołębi. Również niewiele jest danych w literaturze światowej dotyczących seroprewalencji PiCV u tych ptaków, a także zróżnicowania genetycznego polskich szczepów PiCV, oraz korelacji pomiędzy zakażeniem cirkowirusem gołębim a innymi drobnoustrojami.

Celem przeprowadzonych badań było oszacowanie sytuacji epizootycznej wybranych zakażeń wirusowych u gołębi różnych typów użytkowych hodowanych na terenie Polski, a także dokonanie charakterystyki molekularnej PiCV, określenie intensywności występowania rekombinacji genetycznych u tych wirusów, korelacji pomiędzy występowaniem infekcji wybranymi drobnoustrojami a obecnością PiCV oraz czy istnieje zależność między genotypem PiCV a jego patogennością.

Charakterystyka sytuacji epizootycznej wybranych zakażeń wirusowych na terenie Polski opublikowana została w pracy oryginalnej będącej wstępem do omawianego osiągnięcia (4.1.1). Natomiast wyniki badań molekularnych i serologicznych dotyczących krajowych szczepów PiCV oraz korelacji pomiędzy występowaniem cirkowirusa gołębiego a pojawianiem się zakażeń innymi drobnoustrojami u gołębi opublikowano w pozostałych pracach – oryginalnych (4.1.2, 4.1.3 – praca, która powstała w następstwie nawiązania współpracy z Uniwersytetem w Canterbury (Nowa Zelandia), 4.1.4, 4.1.5). Wyniki omawianych badań uzyskano przy zastosowaniu materiałów i metodyki opisanych poniżej.

4.2.2. Materiały i metody

4.2.2.1. Materiał badawczy

Materiał do badań pobrano łącznie od 447 gołębi domowych (*Columba livia domestica*) oraz od 161 zdziczałych gołębi miejskich (*Columba livia f. urbana*) pochodzących z różnych regionów Polski. Gołębie domowe pochodziły z hodowli współpracujących z Katedrą Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie, natomiast próbki od gołębi miejskich uzyskano z ośrodków rehabilitacji ptaków dzikich oraz przy współpracy z ornitologami z Grupy Badawczej Ptaków Wodnych KULING. Ptaki do badań podzielono na następujące grupy:

- gołębie domowe pocztowe, łącznie 330 ptaków;
- gołębie domowe ozdobne, łącznie 117 ptaków;
- gołębie zdziczałe (miejskie), łącznie 161 ptaków.

Ponadto badane ptaki klasyfikowano w zależności od stanu ich zdrowia w chwili badania. Gołębie nie wykazujące żadnych objawów chorobowych klasyfikowano jako zdrowe, natomiast do podgrupy ptaków chorych kwalifikowane były gołębie cechujące się występowaniem jednego lub kilku z wymienionych niżej nieswoistych objawów chorobowych: brak wyników lotowych, utrata kondycji, objawy oddechowe, objawy neurologiczne, rozrzedzony kałomocz, zmętnienie rogówki, kulawizny a także ptaki ze stad, w których stwierdzano nagłe padnięcia.

Materiał do badań stanowiły wymazy z kloaki oraz podniebienia pobierane od ptaków żywych za pomocą zestawu UTM-RT Mini swab system (Copan Diagnostic, USA) oraz wycinki narządów wewnętrznych (wątroba, śledziona, torba Fabrycjusza) pobierane w trakcie badania anatomopatologicznego ptaków padłych.

Dodatkowo od 171 zdrowych gołębi pocztowych pochodzących ze stad reprodukcyjnych pobrano również próbki krwi z żyły odłokciowej do badań serologicznych (praca 4.1.5.).

4.2.2.2. Izolacja DNA

Przed przystąpieniem do izolacji DNA próbki narządów wewnętrznych pobierane były w ilości 50 mg (wątroba, torba Fabrycjusza, nerka) oraz 10 mg (śledziona), a następnie homogenizowane w 500 µL PBS przy użyciu homogenizatora Tissuelyser II (Qiagen, Niemcy). Do dalszych etapów izolacji DNA wykorzystywano płynne podłoże transportowe z zestawu wymazów lub homogenat narządów w objętości po 200 µL z każdej próbki. DNA izolowano metodą magnetyczną przy użyciu automatycznej stacji Janus (Perkin Elmer, USA) i gotowego zestawu NucleoMag Tissue Kit (Macherey-Nagel, Niemcy) zgodnie z instrukcjami producenta. Koncentrację wyeluowanego DNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do chwili oznaczeń.

4.2.2.3. PCR

A. Wykrywanie materiału genetycznego PiCV, PiHV oraz FAdV metodą multiplex PCR

W celu wykrycia obecności materiału genetycznego PiHV, PiCV oraz FAdV zastosowano metodę multiplex PCR stosując startery opisane przez Freick i wsp. (2008). PCR przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Niemcy). Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 2 µL wyizolowanego DNA, 10 µL HotStar TaqPlus MasterMix2, po 0,1 µL każdego z primerów (stężenie 100µM), 2µL obciążnika CoralLoad10x, mieszaninę uzupełniano do objętości 20 µL za pomocą wody wolnej od rybonukleaz. PCR przeprowadzono w termocyklerze vapo.protect (Eppendorf, Niemcy). Warunki reakcji dla multiplex PCR były następujące: aktywacja polimerazy 95°C/ 5 min, następnie 40 cykli: denaturacja 94°C/ 30 s, przyłączanie primerów 60,5°C/ 90 s, wydłużanie łańcucha 72°C/ 90 s, po zakończeniu cykli elongacja końcowa 72°C/ 10 minut.

Opisaną metodę zastosowano w pracach 4.1.1., 4.1.2., 4.1.3. oraz 4.1.4.

B. Wykrywanie materiału genetycznego PiAV

Materiał genetyczny PiAV wykrywano za pomocą uniplex PCR opracowanej przez Raue i wsp. (2002). Proporcje składu mieszaniny reakcyjnej były identyczne jak w przypadku multiplex PCR, natomiast warunki przeprowadzenia reakcji były następujące: aktywacja polimerazy 95°C/ 5 min, 30 cykli: denaturacja 94°C/ 60 s, przyłączanie primerów 60°C/ 60 s, wydłużanie łańcucha 72°C/ 90 s, po zakończeniu cykli elongacja końcowa 72°C/ 10 minut.

Metodę tą zastosowano w pracy 4.1.1.

C. Wykrywanie materiału genetycznego PiCV metodą Sybr Green real-time PCR

Detekcję DNA PiCV przeprowadzano za pomocą metody opisanej przez Duchatel i wsp. (2009), w trakcie której amplifikowano fragment wielkości około 139 par zasad genu kodującego białko związane z replikacją wirusa (Rep). Reakcję przeprowadzono przy użyciu zestawu Power Sybr Green Master Mix kit (Life Technologies, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 25 µL Power Sybr Green Master Mix, 0,25 µL starterów (koncentracja10 µM) oraz 5 µL wyeluowanego DNA. Mieszaninę reakcyjną uzupełniano do końcowej objętości 50 µL za pomocą wody wolnej od rybonukleaz. Real-time PCR przeprowadzano w termocyklerze MX 3005P (Stratagene, USA), a warunki reakcji były następujące: 95°C/ 10 min, następnie 40 cykli po 95°C/ 15 s i 61°C/ 60 s. Próbki określano jako dodatnie w przypadku Ct ≤ 35.

Metodę zastosowano w pracy 4.1.5.

D. Amplifikacja całego genu kodującego białko kapsydu PiCV

W celu zamplifikowania całego genu kodującego białko kapsydu PiCV zaprojektowano startery posiadające miejsca restrykcyjne dla enzymów *Hind*III oraz *Sal*I. Startery zaprojektowano w oparciu o sekwencję genomu cirkowirusa gołębiego znajdującą się w bazie GenBank pod numerem akcesyjnym JF33089. Sekwencje starterów były następujące: PiCoV F: 5'-CCAAAGCTTATGAGGAGGCGGAGATTCAGACG-3' oraz PiCoV R: 5'-GTGGTCGACTTATTCAGAATCCACAGCTGAGT-3'. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 µL i zawierała: 2,5 µL 10 krotnie skoncentrowanego buforu do PCR (50 mM KCl, pH 9, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) (A&A Biotechnology, Polska), 0,5 µL (0,2 mM)

każdego ze starterów, 1 µL of dNTP (0,2 mM) (A&A Biotechnology, Polska), 4 µL betainy (1M), 0,5 µL polimerazy DNA *Taq* (5U/ mL) (A&A Biotechnology, Polska) oraz 14,5 µL wody wolnej od rybonukleaz. Następnie dodano 2 µL DNA wyizolowanego ze śledziony gołębia zdiagnozowanego metodą multiplex PCR jako zakażonego PiCV. Warunki reakcji były następujące: 95°C/ 15 min, następnie 40 cykli po: 94°C/ 1 min, 65°C/ 1 min, 72°C/ 1 min i 1 etap 72°C/ 10 min.

Metodę tą z zastosowano w publikacji 4.1.5.

E. Wykrywanie materiału genetycznego *Chlamydia (C.) psittaci* metodą TaqMan real-time PCR

Wykrywanie materiału genetycznego *C. psittaci* przeprowadzano przy użyciu starterów oraz sondy molekularnej TaqMan opisanej przez Ménard i wsp. (2006). W metodzie tej amplifikowano fragment genu *incA* (wielkość około 74 par zasad) za pomocą zestawu TaqMan Fast Universal PCR MasterMix (Life technologies, USA). Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µL, a jej skład był następujący: 10 µL TaqMan Fast Universal PCR MasterMix (2x), 2 µL starterów (koncentracja 3 µM), 2 µL sondy molekularnej Cpsi-*incA*-FT (koncentracja 2 µM) oraz 4 µL DNA. Rekację przeprowadzano w termocyklerze MX 300 5P (Stratagene, USA) w następujących warunkach: wstępna denaturacja 95°C/ 10 min, następnie 40 cykli 2 stopniowego profilu temperaturowego: 95°C/ 15 s oraz 60°C/ 1 min.
Metodę tą zastosowano w publikacji 4.1.4.

F. Amplifikacja fragment genu OmpA *C. psittaci* za pomocą nested PCR

We wszystkich próbkach oznaczonych jako dodatnie w metodzie TagMan real-time PCR podjęto próbę amplifikacji fragmentu genu OmpA metodą nested PCR opisaną przez Heddema i wsp. (2006) w modyfikacji własnej. Modyfikacja polegała na wprowadzeniu Tochdown PCR w pierwszej reakcji metody nested. Touchdown PCR przeprowadzano z użyciem zestawu HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, Niemcy) w termocyklerze vapo.protect (Eppendorf, Niemcy) w następujących warunkach: wstępna denaturacja 95°C/ 5 min, następnie 15 cykli, w których denaturacja wynosiła 95°C/ 1 min, natomiast przyłączanie starterów odbywało się w warunkach obniżania temperatury o 1°C (z 62°C do 47°C) w

każdym kolejnym cyklu. Wydłużanie łańcucha odbywało się w temperaturze 72°C i czasie 2 minut. Temperatura przyłączania starterów w drugim etapie metody wynosiła 52°C, natomiast końcowa elongacja w obu etapach wynosiła 10 minut w temperaturze 72°C.

Metodę tą zastosowano w pracy 4.1.4.

G. Elektroforeza w żelu agarozowym

Produkty amplifikacji w objętości 8 µL poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w 2% (multiplex PCR) lub 0,5% (uniplex PCR) żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny pod napięciem 120V przez 90 minut. Wyniki elektroforezy odczytywano za pomocą systemu do wizualizacji żeli GelDoc (Biorad, Włochy) i archiwizowano w postaci zdjęć cyfrowych.

Tą metodę wykorzystano w pracach 4.1.1.- 4.1.4.

4.2.2.4. Sekwencjonowanie fragmentów genów PiCV oraz *C. psittaci* i ich analiza filogenetyczna

W wybranych próbkach przeprowadzono sekwencjonowanie otrzymanych produktów PCR. Sekwencjonowaniu poddano 21 próbek amplikonów fragmentu genu kodującego gen *Cap* PiCV (około 325 par zasad) uzyskanych metodą multiplex PCR oraz 17 próbek amplikonów fragmentu genu *OmpA C. psittaci* uzyskanych metodą nested PCR. Sekwencjonowanie przeprowadzono w firmie Genomed (Polska). Sekwencje nukleotydowe zostały złożone i porównane za pomocą oprogramowania Lasergene, wersja 8.1.5. (DNASTAR, USA). Złożone sekwencje genu *Cap* PiCV zostały porównane z 18 sekwencjami tego genu należącymi do szczepów PiCV pochodzących z różnych części świata umieszczonych w bazie GenBank, natomiast sekwencje genu *OmpA C. psittaci* porównano z 6 sekwencjami szczepów referencyjnych reprezentujących genotypy A-F oraz 6BC *Chlamydia psittaci*. Analizę sekwencji przeprowadzano za pomocą metody Clustal W i oprogramowania Mega 5 oraz Bioedit 7.0.0. Drzewa filogenetyczne wygenerowano metodą

neighbor-joining przy użyciu oprogramowania Mega 5 (Tamura i wsp., 2011). Matryce podobieństwa nukleotydowego i aminokwasowego analizowanych sekwencji wygenerowano za pomocą oprogramowania BioEdit 7.0.0.

Powyższą metodę zastosowano w pracach 4.1.2. oraz 4.1.4.

4.2.2.5. Sekwencjonowanie całego genomu PiCV oraz jego analiza filogenetyczna

Całkowite DNA z wybranych próbek określonych jako dodatnie dla PiCV zamplifikowano metodą toczącego się koła (rolling circle amplification, RCA) za pomocą zestawu TempliPhi™ (GE Healthcare, USA) i protokołu opracowanego przez Julian i wsp. (2012). Uzyskane koliste DNA pofragmentowano za pomocą enzymu restrykcyjnego *Xmn*I (Thermo Fisher, USA). Uzyskane w ten sposób fragmenty wklonowano do wektora plazmidowego pJET1.2 (Thermo Fisher, USA). Otrzymane klony wektora pJET1.2 oraz fragmentów genomu PiCV poddano sekwencjonowaniu metodą primer walking w firmie Macrogen (Korea Południowa). Uzyskane w ten sposób sekwencje fragmentów genomów badanych szczepów cirkowirusa gołębiego porównano z 17 dostępnymi w bazie Genbank sekwencjami kompletnego genomu PiCV i na tej podstawie zaprojektowano startery amplifikujące produkt odpowiadający wielkością całemu genomowi cirkowirusa gołębiego. Sekwencje starterów były następujące: PiCV-AV-F 5'-TCG CGC GAG AST TCA GTG ARA T-3' oraz PiCV-AV-R 5'- CYT CSG YCA TTG CTC TTC CGG CTT TC-3'. PCR przeprowadzano za pomocą zestawu Kapa HiFi HotStart PCR (Kapa Biosystems, USA) w następujących warunkach: 94°C/ 2 min, następnie 25 cykli po 98°C/ 20 s, 60°C/ 20 s i 72°C/ 2 min. Końcowa elongacja odbywała się w czasie 2 minut i przebiegała w temperaturze 72°C. Uzyskane amplikony wklonowano do wektora pJET1.2 (Thermo Fisher, USA), następnie wektory te użyto do transformacji komórek kompetentnych *Escheria (E.) coli* w celu powielenia DNA PiCV. Plazmidy uzyskane z pojedynczej kolonii transformowanych bakterii poddano sekwencjonowaniu metodą Sanger w firmie Macrogen (Korea Południowa).

Sekwencje kompletnych genomów PiCV złożono za pomocą oprogramowania DNA baser (wersja 3.5.2; Heracle BioSoft S.R.L., Niemcy) oraz DNAMAN (wersja 5.2.9; Lynnon Biosoft, Kanada). Złożone sekwencje pełnego genomu 30 krajowych izolatów PiCV

porównano ze wszystkimi sekwencjami pełnego genomu PiCV dostępnymi w bazie GenBank za pomocą metody MUSCLE (Edgar, 2004) i oprogramowania Mega 5 (Tamura i wsp., 2011). Drzewo filogenetyczne wygenerowano metodą neighbor-joining za pomocą oprogramowania Mega 5. Maksymalne podobieństwo filogenetyczne pełnych genomów po usunięciu fragmentów zrekombinowanych opracowano za pomocą metody PHYML (Guindon i wsp., 2010) i modelu substytucji nukleotydowych GTR+G4. Gałęzie obu drzew filogenetycznych (sekwencje pełnych genomów oraz genomów po usunięciu fragmentów zrekombinowanych) z odsetkiem dopasowań (bootstrap) mniejszym niż 70% zostały zwinięte za pomocą oprogramowania Mesquite wersja 2.75 (http://mesquiteproject.org/). Oba drzewa zostały ukorzenione za pomocą sekwencji genomu cirkowirusa papug (PBFDV) (numer akcesyjny w bazie GenBank AF071878).

Opisana metodyka została przeprowadzona w Uniwersytecie w Canterbury (Nowa Zelandia) w ramach współpracy międzynarodowej habilitanta i wykorzystana w pracy nr 4.1.3.

4.2.2.6. Produkcja rekombinowanego białka kapsydu PiCV (rCP)

Otrzymane zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 4.2.2.3.D. produkty PCR oczyszczano po rozdziale elektroforetycznym za pomocą zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Niemcy), a następnie poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi *Hind*III oraz *Sal*I (Thermo-Scientific, USA) w celu uzyskania fragmentów umożliwiających wklonowanie amplikonów do wektora pET6xHN-N (Takara Bio Inc., Japonia). Po całonocnej ligacji w temperaturze 16°C za pomocą ligazy DNA T4 (1 µL/ 20 µL) (A&A Biotechnology, Polska) uzyskano plazmid ekspresyjny pET6xHN-N-PiCoV, który następnie użyto do transformacji komórek kompetentnych *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta blue (Novagen, Niemcy) metodą szoku temperaturowego. Transformowane bakterie hodowano w temperaturze 37°C przez 18 godzin na płytkach zawierających podłoże Luria-Bertani (LB) suplementowane ampicyliną (50 µg/ mL) (A&A Biotechnology, Polska), IPTG (20 mM) (A&A Biotechnology, Polska) oraz X-Gal (80 µg/ mL) (A&A Biotechnology, Polska). Zastosowane podłoże pozwala na selektywny wzrost bakterii transformowanych wektorem pET6xHN-N, w którym znajduje się gen oporności na ampicilinę. Insercja genu *cap* do wektora ekspresyjnego została zweryfikowana za pomocą PCR opisanego w punkcie 4.2.2.3.D. Jako matrycę wykorzystano DNA

plazmidowe uzyskane z transformowanych bakterii za pomocą zestawu Diaper Spin MiniPrep Kit (Qiagen, Niemcy). Następnie płynne podłoże LB suplementowane ampicyliną (50 µg/ mL) oraz glukozą (1%) inokulowano pojedynczą kolonią transformowanych bakterii i inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37ºC przy wytrząsaniu (250 rpm) (MaxQ 4450, Thermo Scientific, USA). Po tym etapie hodowla została rozcieńczona 1:100 w bulionie LB suplementowanym ampicyliną i inkubowana w warunkach opisanych powyżej do uzyskania gęstości optycznej OD_{600} = 0,5-0,6. W chwili uzyskania przez hodowlę docelowej gęstości optycznej do bakterii dodano wodny roztwór IPTG (do koncentracji 1mM) i kontynuowano inkubację przez kolejne 18 godzin. Następnie pobrano 1 mL hodowli, po czym obie próbki zwirowano (12 000 x g/ 1 min). Pobrany 1 mL opisanej hodowli bakteryjnej oraz 1 ml hodowli bakterii nie indukowanych IPTG (kontrola negatywna ekspresji) wykorzystano do przeprowadzenia SDS-PAGE w warunkach denaturujących z zastosowaniem 12% żelu poliakrylamidowego celem potwierdzenia ekspresji białka.

W celu wyeluowania rCP supernatant komórek oczyszczono metodą chromatografii powinowactwa w kolumnach zawierających złoża niklowe za pomocą odczynników HisTALON™ Gravity Column Purification Kit (Takara Bio Inc., Japonia). Koncentrację wyeluowanego białka mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Antygenowość uzyskanego białka określano metodą Dot Blot. Jako kontrole testu zastosowano surowice uzyskane od gołębi inokulowanych dwukrotnie rekombinowanym białkiem kapsydu PiCV (kontrola dodatnia) oraz gołębi nieinokulowanych rCP i określonych testem PCR jako niezakażone PiCV (kontrola ujemna). Pozostałą resztę białka przechowywano w temperaturze -70°C do czasu dalszych analiz.

Opisaną metodę zastosowano w pracy 4.1.5.

4.2.2.7. Wykrywanie przeciwciał przeciwko PiCV metodą in-house ELISA

Test przeprowadzono z wykorzystaniem odczynników Antibody Pair Buffer Kit (Invitrogen, USA). Płytki 96-dołkowe opłaszczono rekombinowanym białkiem kapsydu PiCV (koncentracja 20 µg/ mL). Po 24 godzinnej inkubacji, płukaniu i zablokowaniu płytki

(blocking buffer, 100 µL/ dołek) do każdego dołka zdeponowano próbki surowic kontrolnych oraz badanych, rozcieńczonych wcześniej w stosunku 1:50 w buforze opłaszczającym. Jako kontrolę negatywną testu użyto surowicę od gołębia niezakażonego PiCV, natomiast jako kontrolę pozytywną wykorzystano surowicę uzyskaną od gołębia dwukrotnie immunizowanego rCP PiCV. Po 30 minutowej inkubacji z wytrząsaniem (250 rpm/ min) przeprowadzonej w temperaturze pokojowej oraz trzykrotnym wypłukaniu płytki, do każdego dołka dodano koniugat przeciwciał przeciwko gołębim IgG w rozcieńczeniu 1:30 000 (Antibodies-online, USA). Po kolejnej inkubacji i płukaniu w warunkach analogicznych do opisanych powyżej do każdego dołka dodano tysiąckrotnie rozcieńczony koniugat przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z HRP (peroksydaza chrzanowa) (goat anti-rabbit –HRP, BD Biosciences, USA). Po kolejnym etapie inkubacji i płukania dodano 100 µL substratu dla HRP (Stabilized Chromogen TMB substrate buffer) i po 15 minutowej inkubacji w ciemności przebiegającej bez wytrząsania reakcja została zatrzymana poprzez dodanie 50 µL buforu stopującego. Wynik odczytano za pomocą spektrofotometru ELx 800 (Biotek, USA) przy długości fali 450 nm. Analizę wyniku odczytano na podstawie wartości O.D. (gęstość optyczna) i S/P. Surowice klasyfikowano jako dodatnie dla przeciwciał przeciwko PiCV w przypadku wartości S/P $\geq$ 0,2.

Opisaną metodę zastosowano w pracy 4.1.5.

4.2.2.8. Analiza wyników

A. Analiza statystyczna

W przypadkach, w których charakter wyników na to pozwalał opracowano je statystycznie stosując oprogramowanie STATISTICA PL wersja 10.0 oraz następujące testy:

- test nieparametryczny U Manna-Whitneya – prace 4.1.1. oraz 4.1.5.
- test chi – kwadrat Pearsona z poprawką Yatesa – praca 4.1.4.

Różnice określono jako istotne dla $p \leq 0,05$ oraz wysoko istotne dla $p \leq 0,01$.

B. Analiza występowania rekombinacji w genomach różnych szczepów PiCV

Analizie poddano 47 sekwencji pełnych genomów PiCV (30 izolatów krajowych oraz 17 dostępnych w bazie GenBank). Badania przeprowadzono za pomocą oprogramowania RDP4 (recombination detection program) (Martin i wsp., 2010) przy ustawieniach domyślnych dla następujących metod wykrywania rekombinacji: RDP (Martin i Rybicki, 2000), Geneconv (Padidam i wsp., 1999), Bootscan (Martin i wsp., 2005), Maxchi (Smith, 1992), Chimaera (Posada i Crandall, 2001), Siscan (Gibbs i wsp., 2000) oraz Seq (Boni i wsp., 2007). Jako wiarygodne dowody na wystąpienie rekombinacji uznawano tylko te, które zostały potwierdzone minimum trzema z powyższych metod.

Sekwencje wyjściowe najbardziej odpowiadające wykrytym fragmentom zrekombinowanym w genomach PiCV nazwane zostały "większym" lub "mniejszym rodzicem" w zależności od wielkości sekwencji przekazanej do genomu wirusa "potomnego".

Ta metoda została zastosowana w pracy 4.1.3.

C. Określenie mechanizmów ewolucji PiCV

Przyrównanie sekwencji genów *rep* i *cap* PiCV oraz PBFDV wygenerowano za pomocą oprogramowania Mega 5 na podstawie wszystkich dostępnych w bazie GenBank oraz uzyskanych w badaniach własnych sekwencji pełnych genomów tych wirusów w celu wykrycia sygnałów wskazujących na zaistnienie mechanizmów naturalnej selekcji w miejscach homologicznych dla obu gatunków. Dodatkowo sekwencje genów obu gatunków wirusów analizowano oddzielnie w celu zidentyfikowania wstawek rekombinacyjnych przy użyciu metody GARD (Kosakovsky Pond i wsp. 2006). Sekwencje te analizowano również pod kątem wykrycia kodonów (miejsc w genie) powstałych pod wpływem pozytywnej, jak i negatywnej selekcji za pomocą metod FUBAR (Murell i wsp. 2013) i MEME (Murell i wsp. 2012). Miejsca określone jako ewoluujące pod pływem pozytywnej selekcji za pomocą obu metod (FUBAR i MEME) uznawano za wspólne dla wszystkich linii genetycznych (działanie jednego, stałego czynnika), natomiast miejsca wykryte tylko a pomocą metody MEME uznano za ewoluujące pod wpływem pozytywnej selekcji tylko u pojedynczych linii.

4.2.3. Wyniki i dyskusja

4.2.3.1. Prewalencja wybranych zakażeń wirusowych u gołębi na terenie Polski

W celu wstępnego oszacowania sytuacji epizootycznej wybranych zakażeń wirusowych oraz określenia, który z wirusów stanowi największy problem w patologii gołębi przebadano ptaki pochodzące z łącznie 107 stad usytuowanych na terenie całego kraju. Wyniki badań jednoznacznie wskazują, że zakażenia cirkowirusowe gołębi należą do najliczniej notowanych (średnio 72% badanych populacji). Co ciekawe, duża częstotliwość infekcji PiCV stwierdzana jest u gołębi bez względu na stan ich zdrowia oraz wiek, co może sugerować istnienie różnych szczepów cirkowirusów gołębich różniących się patogennością. Wykazano jednak, że u gołębi wykazujących objawy chorobowe częstotliwość zakażeń cirkowirusowych była statystycznie istotnie wyższa niż u ptaków klinicznie zdrowych. Różnice te wykazano głównie wśród dorosłych gołębi pocztowych, u których stwierdzono 44,5% prewalencję PiCV u ptaków zdrowych oraz 80% u gołębi wykazujących nieswoiste objawy chorobowe. Uzyskane wyniki sugerują, że zakażenie cirkowirusem gołębim może być związane z występowaniem YPDS.

Drugim pod względem częstotliwości występowania okazał się herpeswirus gołębi (prewalencja 0 - 30 % w zależności od badanej grupy), przy czym jego materiał genetyczny stwierdzano częściej u młodych gołębi ozdobnych z nieswoistymi objawami chorobowymi (30%), niż u ptaków z pozostałych badanych grup (0 – 22%). Większość chorych gołębi, u których stwierdzono obecność materiału genetycznego PiHV okazała się jednocześnie zainfekowana PiCV.

Uwagę zwraca mała prewalencja zakażeń adenowirusowych wśród gołębi. U żadnego z badanych ptaków nie stwierdzono obecności materiału genetycznego FadV, natomiast gołębi adenowirus stwierdzono w zaledwie 2 stadach gołębi młodych (1 stado gołębi ozdobnych oraz 1 stado gołębi pocztowych), co stanowiło 5% z danej grupy. W omawianych przypadkach materiał genetyczny gołębiego adenowirusa stwierdzono w próbkach pochodzących od ptaków, które padły z wyraźnymi objawami YPDS. Zarówno w jednym, jak

i drugim stadzie gołębi zakażonych PiAV stwierdzono równoczesne zakażenie PiCV oraz PiHV.

Podsumowując należy stwierdzić, że najbardziej powszechnymi zakażeniami w polskiej populacji gołębi domowych są infekcje wywołane przez PiCV, a sytuacja epizootyczna w Polsce jest zbliżona do występującej w innych krajach świata. Ze względu na równie wysoką prewalencję zakażeń cirkowirusowych u gołębi zdrowych, jak i chorych potwierdzono hipotezę, że do rozwoju YPDS konieczne jest występowanie czynników dodatkowych takich jak stres (odsadzenie od rodziców, zbyt późno przeprowadzane pierwsze szczepienia piskląt, treningi, loty konkursowe, stres socjalny związany z przepełnieniem obiektów w miesiącach letnich) lub, że mogą występować szczepy cirkowirusów o różnej zjadliwości. Ponadto uzyskane wyniki badań własnych potwierdzają podejrzenia innych autorów, że pierwotną przyczyną YPDS nie są zakażenia adenowirusowe, tylko powszechne infekcje gołębim cirkowirusem.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pierwszej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Stenzel T., Pestka D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A.: Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland. Veterinary Record, 2012, 171, 562. doi: 10.1136/vr.100932.

4.2.3.2. Wstępna ocena zróżnicowania genetycznego krajowych izolatów PiCV

Wstępną ocenę zróżnicowania genetycznego krajowych izolatów PiCV przeprowadzono w oparciu o próbki uzyskane od gołębi pochodzących łącznie z 152 stad (88 stad gołębi pocztowych oraz 64 stada gołębi ozdobnych), usytuowanych w różnych regionach Polski. Ze względu na dane literaturowe wskazujące, że w genie kodującym białko kapsydu najczęściej dochodzi do mutacji, do analizy wykorzystano zamplifikowane za pomocą metody opisanej w punkcie 4.2.2.3.A fragmenty genu *cap* o wielkości około 326 par zasad. Analizowany fragment odpowiadał sekwencji znajdującej się w pozycji między 60 a 385 nukleotydem w genie *cap* i stanowił około 30% długości tego genu. Uzyskane sekwencje przyrównano za pomocą oprogramowania Mega 5 do znanych sekwencji genu *cap*

umieszczonych w bazie GenBank. Przeprowadzone badania wykazały, że w 107 próbkach stwierdzono obecność materiału genetycznego PiCV, co stanowi 70,39% badanej populacji i jest zbieżne z wynikami uzyskanymi wcześniej.

Tylko 21 ze wszystkich uzyskanych próbek dodatnich udało się skutecznie zsekwencjonować, czego przyczyną mogła być częściowa degradacja DNA. Analiza filogenetyczna polskich izolatów PiCV wykazała, że pomimo stosunkowo dużej zmienności w sekwencjach analizowanych fragmentów genów możliwe było wyodrębnienie grup filogenetycznych (kladów) posiadających hipotetycznych wspólnych przodków ze znanymi izolatami cirkowirusów gołębich umieszczonych w bazie GenBank. Cirkowirusy gołębie stanowią 5 odmiennych grup filogenetycznych określanych umownie A – E. W badaniach własnych wykazano, że krajowe izolaty PiCV nie wykazują przynależności do wszystkich kladów. Większość polskich izolatów należało do grupy A, która utworzona jest przez północnoamerykańskie oraz europejskie szczepy PiCV. Do kladów B oraz C tworzonych przez niektóre wirusy europejskie (głównie szczepy belgijskie, węgierskie oraz włoskie) należały jedynie po 4 krajowe izolaty PiCV. Natomiast żaden z Polskich izolatów nie należał do kladów D oraz E (szczepy australijskie, azjatyckie i nieliczne europejskie). Powyższe może być spowodowane intensywnym importem gołębi pocztowych reprodukcyjnych z różnych krajów europejskich do Polski. Analiza długości poszczególnych gałęzi drzewa filogenetycznego utworzonego na podstawie przyrównania omawianych sekwencji wykazała, że hipotetyczni wspólni przodkowie krajowych oraz znanych światowych izolatów PiCV występowali w odległej przeszłości lub, że PiCV ma zdolność do bardzo szybkiego mutowania się. Dodatkowa analiza przeprowadzona za pomocą oprogramowania Bioedit 7.0 potwierdziła powyższą hipotezę, ponieważ w badanym fragmencie genu stwierdzono występowanie licznych mutacji. Wszystkie izolaty należące do kladów A, B oraz C posiadały delecje 3 nukleotydów w pozycjach 157-159. Z kolei izolaty należące do kladów B i C posiadały delecje 6 nukleotydów w pozycjach 84-89, a izolat PL_168_F (podobnie jak znane szczepy belgijskie i węgierskie) charakteryzował się delecją 3 nukleotydów w pozycjach 103-105. Ponadto w analizowanym fragmencie genu stwierdzono bardzo liczne substytucje nukleotydowe (mutacje punktowe). Wszystkie stwierdzone delecje nukleotydowe miały wpływ na sekwencje aminokwasowe białka, co przejawiało się delecją aminokwasów w

pozycjach 29-30 (izolaty należące do kladów B oraz C), 35 (belgijskie i węgierskie izolaty należące do kladu B, a także izolat PL_168_F) oraz w pozycji 58 (izolaty z grup filogenetycznych A, B i C). Podobieństwo nukleotydowe krajowych izolatów PiCV określone na podstawie analizowanego fragmentu genu *cap* wynosiło średnio 86,57%, z kolei podobieństwo sekwencji aminokwasowych wygenerowanych na podstawie przyrównanych sekwencji nukleotydowych wynosiło 89,02%. Wszystkie sekwencje krajowych izolatów PiCV zostały umieszczone w bazie danych GenBank i uzyskały numery akcesyjne: KC691675 - KC691696.

Podsumowując należy stwierdzić, że mutacje występujące w genie kodującym białko kapsydu PiCV mają wpływ na jego sekwencję aminokwasową, co z kolei może wpływać na strukturę CP. Wobec tego wysnuto hipotezę, że mutacje te mogą mieć wpływ na powstawanie odporności swoistej przeciwko temu wirusowi (powstawanie przeciwciał skierowanych przeciwko kapsydowi PiCV) lub wpływać na zjadliwość poszczególnych izolatów cirkowirusów gołębich, czego dowodem może być fakt omówiony w poprzednim rozdziale wskazujący, że nie u wszystkich zakażonych gołębi stwierdza się objawy chorobowe YPDS.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w drugiej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład prezentowanego osiągnięcia:

Stenzel T., Pestka D.: Occurrence and genetic diversity of pigeon circovirus strains in Poland. Acta Veterinaria Hungarica, 2014, 62, 274-283.

4.2.3.3. Zróżnicowanie genetyczne krajowych izolatów PiCV w oparciu o analizę pełnego genomu oraz analizę mechanizmów ewolucji cirkowirusów (rekombinacje genetyczne, selekcja naturalna)

Wcześniejsze badania filogenetyczne przeprowadzone w oparciu o analizę fragmentu genu kodującego białko kapsydu wykazały, że wśród różnych izolatów PiCV bardzo często stwierdza się mutacje. Na uwagę zasługuje również fakt, że cirkowirusy posiadają stosunkowo mały genom (około 2 000 par zasad). W związku z tym, że nie u wszystkich zakażonych gołębi występują objawy YPDS, wysnuto hipotezę, że możliwa jest korelacja pomiędzy genotypem wirusa a jego zjadliwością. Uwzględniając powyższe fakty uznano, że dla pełnego zobrazowania zmienności genetycznej w obrębie krajowych izolatów PiCV

konieczna jest analiza filogenetyczna wykonana w oparciu o sekwencję kompletnego genomu różnych izolatów cirkowirusów gołębich. W związku z brakiem możliwości przeprowadzenia tak zaawansowanych analiz w kraju rozpoczęto współpracę z Uniwersytetem w Canterbury (Nowa Zelandia).

Na poczet planowanych badań zebrano materiał od łącznie 324 gołębi (próbki od 264 gołębi domowych, z których 152 były wykorzystane do analiz opisanych w punkcie 4.2.3.2. oraz 60 gołębi „miejskich"). Zebrane próbki zbadano w kierunku obecności materiału genetycznego PiCV za pomocą metody opisanej w punkcie 4.2.2.3.A. Badania wykazały, że około 64% próbek pochodzących od gołębi domowych było dodatnich w kierunku materiału genetycznego PiCV, natomiast prewalencja tego wirusa w populacji zdziczałych gołębi miejskich wynosiła 44,7%. Mniejszą częstotliwość występowania PiCV u gołębi miejskich należy tłumaczyć faktem, że dziko żyjąca populacja tych ptaków poddawana jest mechanizmom selekcji naturalnej. Wobec powyższego występuje u nich zdecydowanie wyższa śmiertelność, dotycząca przede wszystkim osobników chorych. U gołębi domowych śmiertelność jest niższa dzięki podejmowanym zabiegom lekarsko-weterynaryjnym. Leczenie ptaków niestety często prowadzi do przejścia infekcji w stan bezobjawowego nosicielstwa wirusa. Powyższe zyskało potwierdzenie w wynikach badań własnych, w których około połowa ptaków (53%) była zakażona PiCV podklinicznie.

W zaledwie 30 próbkach (8 pochodzących od gołębi pocztowych, 12 pochodzących od gołębi ozdobnych oraz 10 od gołębi miejskich) dodatnich w kierunku obecności materiału genetycznego PiCV udało się zamplifikować cały genom tego wirusa. Uzyskane sekwencje pełnego genomu krajowych izolatów PiCV porównano ze wszystkimi (n=17) sekwencjami pełnych genomów PiCV dostępnych w bazie GenBank (izolaty z Afryki, Ameryki Północnej, Australii i Europy) oraz między sobą. Podobieństwo nukleotydowe w obrębie genomów polskich izolatów PiCV wynosiło 86% natomiast pomiędzy izolatami krajowymi, a dostępnymi w bazie GenBank wynosiło nieco mniej, gdyż 83%. Omawiane w niniejszym rozdziale sekwencje kompletnego genomu polskich izolatów PiCV umieszczono w bazie GenBank pod numerami akcesyjnymi: KF738843 - KF738872.

Drzewo filogenetyczne utworzone po przyrównaniu wszystkich 47 sekwencji pełnego genomu PiCV wykazało, że wirusy te tworzą 5 kladów (podobnie jak w przypadku drzewa filogenetycznego opracowanego w oparciu o analizę fragmentu genu *cap*). Największą grupę stanowiło około 57% izolatów pochodzących z Afryki, Ameryki Północnej oraz Europy. Spośród nich wyodrębniono mniejsze podgrupy blisko ze sobą spokrewnionych wirusów pochodzących z tych samych regionów geograficznych. Jedną z takich podgrup tworzą polskie izolaty PiCV. Nie udało się niestety wykazać żadnego powiązania pomiędzy genotypem PiCV, a rodzajem żywiciela (gołębie pocztowe, ozdobne oraz „miejskie"- dzikie). Nie stwierdzono też zależności pomiędzy genotypem PiCV, a występowaniem u zakażonych gołębi objawów chorobowych. Powyższe wskazuje natomiast, że występują zarówno długodystansowe „migracje" wirusów (wraz z zakażonymi PiCV gołębiami pocztowymi biorącymi udział w lotach konkursowych oraz globalnym handlem tymi ptakami), jak i migracje pomiędzy populacjami żywicieli (z populacji gołębi pocztowych do np. populacji gołębi miejskich), które nie mają wpływu na ewolucję PiCV. Wiadomo jest jednak, że ważną rolę w ewolucji wirusów posiadających jednoniciowe DNA odgrywają procesy rekombinacji, co potwierdzono m. in. u cirkowirusów (Varsani i wsp., 2011, Julian i wsp., 2013). Analiza rekombinacji genetycznych w genomach PiCV przeprowadzona zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 4.2.2.8.B. wykazała, że wśród badanych wirusów zaistniały 23 niezależne zdarzenia wskazujące na ten proces. W kilku przypadkach odnotowano również 2 niezależne zdarzenia rekombinacyjne w obrębie jednego genomu (czyli dany izolat posiadał zrekombinowane fragmenty pochodzące od 2 różnych wirusów "rodzicielskich"). W większości przypadków zrekombinowane fragmenty były stosunkowo duże (97-985 par zasad). U zaledwie sześciu izolatów (jeden australijski, trzy europejskie oraz dwa północnoamerykańskie) nie stwierdzono dowodów na zaistnienie procesu rekombinacji genetycznych. Bardzo ciekawe wyniki uzyskano na podstawie analizy filogenetycznej wszystkich omawianych sekwencji przeprowadzonej po usunięciu z nich fragmentów zrekombinowanych. Okazało się wówczas, że wszystkie sekwencje genomów PiCV tworzą nie 5, a jedynie 2 grupy filogenetyczne (dwie linie genetyczne wirusa), a jeden z krajowych izolatów (PL53, numer akcesyjny: KF738860) różni się znacząco od wszystkich znanych cirkowirusów gołębich i jest jedynym reprezentantem nowej grupy filogenetycznej PiCV. Przeprowadzone analizy wykazały także, że podobnie jak to jest u PBFDV najczęstszym

miejscem występowania wstawek rekombinacyjnych w genomie PiCV są regiony pomiędzy kodonami stop genów *rep* i *cap* oraz w genie związanym z replikacją wirusa. Co ciekawe pomimo, że gen kodujący CP łatwo podlega mutacjom, stwierdzono w tym regionie znacznie mniej wstawek rekombinacyjnych niż w genie *Rep*.

Bardzo interesujące zależności zaobserwowano również po przeprowadzeniu analizy potencjalnych mechanizmów selekcji naturalnej w obrębie genów *rep* i *cap*. Wykazano, że w genie kodującym CP istnieje ponad dwa razy więcej fragmentów, będących następstwem selekcji pozytywnej (adaptacyjnej) niż w genie kodującym białko związane z replikacją wirusa. Jednym z podstawowych czynników mających wpływ na ewolucję na drodze selekcji pozytywnej wirusów infekujących kręgowce jest reaktywność układu immunologicznego gospodarza (Esteban i Hutchinson, 2011). Oczywistym jest, że białko kapsydu znacznie częściej bywa narażone na oddziaływanie mechanizmów immunologicznych u żywiciela niż białko Rep. Wytwarzane przez organizm gołębia przeciwciała skierowane przeciwko białku kapsydowemu mogą ograniczać zdolność replikacji wirusa, wobec czego naturalnym mechanizmem ewolucyjnym jest występowanie zmienności w genie kodującym to białko, co umożliwia utrzymanie się wirusa w populacji żywicieli.

Konkludując wyniki powyższych badań należy stwierdzić, że pomimo stosunkowo dużego zróżnicowania genetycznego w obrębie genomów PiCV nie istnieje żadna zależność pomiędzy genotypem a regionem geograficznym pochodzenia danego izolatu oraz rodzajem żywiciela. Cirkowirusy gołębie posiadają zdolności do szybkiego ewoluowania na drodze mutacji będących następstwem pozytywnej selekcji (mutacje adaptacyjne) oraz rekombinacji genetycznych, co czyni je podobnymi do o wiele lepiej zbadanych i spokrewnionych z nimi w zaledwie 64% cirkowirusów występujących u papug (PBFDV). Brak zależności pomiędzy genotypem PiCV, a stanem zdrowia żywicieli, od których dane szczepy wyizolowano jest potwierdzeniem dla teorii, mówiącej że do wystąpienia objawów klinicznych YPDS nie wystarczy samo zakażenie cirkowirusowe i potrzebne są dodatkowe czynniki. Tym samym hipoteza dotycząca możliwości występowania różnych patotypów PiCV nie uzyskała potwierdzenia.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w trzeciej pracy wchodzącej w skład niniejszego osiągnięcia naukowego:

Stenzel T., Piasecki T., Chrząstek K., Julian L, Muhire B. M., Golden M, Martin D. P., Varsani A.: Pigeon circoviruses display patterns of recombination, genomic secondary structure and selection similar to those of Beak and feather disease viruses. Journal of General Virology, 2014, 95, 1338-1351.

4.2.3.4. Korelacja pomiędzy występowaniem zakażenia PiCV a prewalencją *Chlamydia psittaci* u gołębi domowych oraz zdziczałych

Wcześniejsze badania własne oraz dane literaturowe (Raue i wsp., 2005) sugerują, że cirkowirus gołębi jako immunosupresor może predysponować zainfekowane nim ptaki do częstszych zakażeń innymi drobnoustrojami. Stosunkowo ważnym problemem z punktu widzenia hodowli gołębi (głównie pocztowych) jest występowanie infekcji dróg oddechowych. Mogą być one wywołane przez różne drobnoustroje, m. in. herpeswirus gołębi (praca 4.2.3.1.), *Klebsiella pneumoniae*, mykoplazmy oraz *Chlamydia (C.) psittaci*. W związku z faktem, że *C. psittaci* przypisuje się znaczącą rolę w patologii gołębi oraz, że drobnoustrój ten jest ważnym czynnikiem zoonotycznym (Saito i wsp., 2005, Heddema i wsp., 2006, Dickx i wsp., 2010) przeprowadzono badania mające na celu określenie zależności pomiędzy prewalencją *C. psiitaci*, a występowaniem PiCV. Przeprowadzono również analizę filogenetyczną uzyskanych izolatów *C. psittaci* w celu określenia dominującego w krajowej populacji gołębi genotypu tej bakterii. Badania wykonano na materiale genetycznym wyizolowanym łącznie od 276 gołębi domowych (159 gołębi pocztowych oraz 117 gołębi ozdobnych) i 101 gołębi miejskich z populacji pochodzących z różnych regionów Polski. Znaczącą część próbek uzyskano w celu przeprowadzenia wcześniejszych analiz opisanych w punktach 4.2.3.1 - 4.2.3.3. W omawianych badaniach wykorzystano metody molekularne opisane w punktach: 4.2.2.3.A, 4.2.2.3.E, 4.2.2.3.F oraz 4.2.2.4.

Przeprowadzone badania wykazały, że materiał genetyczny *C. psittaci* występował znacznie częściej u gołębi zakażonych PiCV (3,8% gołębi pocztowych, 9,4% gołębi ozdobnych oraz 3,0 % gołębi miejskich) niż wolnych od infekcji tym wirusem (1,9% gołębi pocztowych, 0,8% gołębi ozdobnych oraz 1,0 % gołębi miejskich). Tylko w przypadku gołębi ozdobnych różnice te były statystycznie istotne (p = 0,00). Trend ten obserwowano we wszystkich badanych grupach gołębi bez względu na ich stan zdrowia, ale był on bardziej wyraźny u ptaków wykazujących objawy chorobowe. Uzyskane wyniki badań sugerują, że prewalencja *C. psittaci* u gołębi może być skorelowana z bardzo powszechnymi w populacji tych ptaków zakażeniami cirkowirusowymi, których konsekwencją jest immunosupresja (Todd, 2000, Abadie i wsp., 2001).

Ze względu na fakt, że *C. psittaci* jest ważnym czynnikiem zoonotycznym, przeanalizowano również prewalencję zakażeń tą bakterią u gołębi w Polsce z pominięciem występowania PiCV. Częstotliwość zakażeń *C. psittaci* wyniosła średnio 7,6% u ptaków domowych (21 próbek dodatnich), przy czym u gołębi ozdobnych była prawie dwukrotnie wyższa niż u gołębi pocztowych. Prewalencja u gołębi miejskich wynosiła 3,9%. Genotypowanie uzyskanych w trakcie badań izolatów *C. psittaci* przeprowadzone w oparciu o sekwencjonowanie fragmentu genu OmpA wykazało, że zdecydowana większość z nich należy do typowego dla gołębi genotypu B, natomiast tylko 2 izolaty sklasyfikowano do genotypu E. Badane izolaty charakteryzowały się bardzo niskim zróżnicowaniem genetycznym zarówno w porównaniu ze szczepami referencyjnymi (99,9 - 100% homologii ze szczepem referencyjnym w przypadku genotypu B oraz 96,6 - 99,8% homologii ze szczepem referencyjnym w przypadku genotypu E), jak i między sobą (99,4% homologii), co jest zgodne z danymi literaturowymi (Sachse i wsp., 2012, Dolz i wsp., 2013). Fakt, że większość ptaków (bez względu na status zakażenia PiCV), u których stwierdzono materiał genetyczny *C. psittaci* nie wykazywała objawów chorobowych potwierdza stosunkowo niską patogenność chlamydii należących do genotypu B (Vanrompay i wsp., 1994). Trzy z izolatów należących do genotypu B (Ni_D_200, PL_F_22 i PL_F_72) wyizolowano od ptaków badanych tuż po zaimportowaniu ich z Holandii, co wskazuje na znaczenie międzynarodowego obrotu ptakami w szerzeniu się chorób zakaźnych groźnych dla człowieka.

Reasumując przeprowadzone badania należy stwierdzić, że prewalencja *Chlamydia psittaci* w polskiej populacji gołębi jest stosunkowo niska i skorelowana z występowaniem immunosupresyjnego cirkowirusa gołębiego.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w czwartej pracy oryginalnej, stanowiącej kompilację osiągnięcia:

Stenzel T., Pestka D., Choszcz D.: The prevalence and genetic characterization of Chlamydia psittaci from domestic and feral pigeons in Poland and the correlation between infection rate and incidence of pigeon circovirus. Poultry Science, 2014, 93, 2991-3001.

4.2.3.5. Określenie statusu immunologicznego PiCV u gołębi klinicznie zdrowych

Prewalencja zakażeń cirkowirusowych w Polsce została gruntownie zbadana i przedstawiona w omawianych w powyższych rozdziałach badaniach własnych, istnieją też prace z tego zakresu z innych części świata (Zhang i wsp., 2011, 2015, Cságola i wsp., 2012, Phan i wsp., 2013, Mahzounieh i wsp., 2014). Natomiast nadal niewiele wiadomo na temat statusu immunologicznego PiCV u gołębi. Wcześniejsze badania wykazały, że znaczna część ptaków (około 53%) zakażona jest bezobjawowo (praca 4.2.3.3.). W związku z powyższym zaplanowano dalsze badania zmierzające do określenia statusu immunologicznego PiCV gołębi nie wykazujących klinicznych objawów choroby. Uwzględniając fakt, że cirkowirus gołębi może być transmitowany drogą pionową (Duchatel i wsp., 2005, 2006) badania przeprowadzono na klinicznie zdrowych gołębiach reprodukcyjnych. W tym celu określono u nich stopień zakażenia PiCV bardziej czułą niż konwencjonalny PCR metodą real-time PCR (pkt. 4.2.2.3.C) oraz obecność przeciwciał przeciwko antygenowi zewnętrznemu PiCV jakim jest białko kapsydu. Do określenia przeciwciał przeciwko cirkowirusowi gołębiemu użyto metody in-house ELISA (pkt. 4.2.2.7). W związku z faktem braku opracowanej metody hodowli laboratoryjnej PiCV, jako antygen do opłaszczania płytek wielodołkowych wykorzystano rekombinowane białko kapsydu PiCV (rCP) uzyskane za pomocą metodyki opisanej w punkcie 4.2.2.6. Badania przeprowadzono na 171 klinicznie zdrowych gołębiach pocztowych pochodzących z 3 stad reprodukcyjnych, w których w ciągu ostatnich 3 lat nie stwierdzono problemu YPDS w trakcie odchowu piskląt. Badane ptaki stanowiły 100% pogłowia tych stad.

Badania wykazały, że 61 z 171 badanych ptaków było zakażonych PiCV, co stanowi jedynie 35,67% badanej populacji i jest niezgodne z wynikami uzyskanymi wcześniej. Powyższa różnica może wynikać z faktu, że omawiane wcześniej badania prowadzone były na ptakach o różnym statusie zdrowotnym (zarówno klinicznie zdrowe, jak i chore). Omawiane w tym rozdziale badania przeprowadzono na klinicznie zdrowych dorosłych gołębiach pocztowych. Z tego względu uzyskane wyniki są zgodne z wynikami wybranych badań opisanych wcześniej, które wykazały, że prewalencja PiCV jest niższa u dorosłych gołębi pocztowych niż u młodych (praca 4.2.3.1). Monitoring serologiczny przeprowadzony za pomocą in-house ELISA wykazał natomiast, że aż 123 ptaki posiadały przeciwciała przeciwko PiCV, co stanowiło 71,92% badanej populacji. Odsetek gołębi seropozytywnych był podobny u ptaków bezobjawowo zakażonych oraz niezakażonych i wynosił odpowiednio 73,78% i 70,91%. Wyniki te korespondują z badaniami retrospektywnymi przeprowadzonymi przez Daum i wsp. (2009), którzy wykazali, że w średnio 78% (61-90%) surowic pobranych od gołębi domowych w latach 1989, 1991 i 2008 znajdowały się przeciwciała przeciwko PiCV. W badaniach własnych współczynnik S/P różnił się statystycznie ($p \leq 0,01$) pomiędzy ptakami określonymi jako zakażone (średnie S/P = 0,48) i niezakażone (średnie S/P = 0,28). Wysoki odsetek ptaków seropozytywnych wśród gołębi niezakażonych, przy jednocześnie dwukrotnie niższym współczynniku S/P może sugerować, że badane ptaki przebyły infekcję PiCV wcześniej lub były nadal zainfekowane, ale nie siały wirusa w trakcie pobierania próbek do badań. W grupie ptaków zakażonych stwierdzono, że odchylenie standardowe (SD) uśrednionych wyników oraz współczynnik zmienności (CV) były znacznie wyższe (SD = 0,35, CV = 72,41%) niż w grupie ptaków określonych jako niezakażone (SD = 0,17, CV = 59,5%). Powyższe wyniki są typowe dla infekcji terenowych i mogą wskazywać, że gołębie u których stwierdzono obecność materiału genetycznego PiCV w chwili badania znajdowały sie na różnych etapach zakażenia.

Reasumując powyższe badania należy stwierdzić, że wskazują one nie tylko na wysoki odsetek gołębi seropozytywnych w badanych stadach reprodukcyjnych, ale również, że opracowany test in-house ELISA z zastosowaniem rekombinowanego białka kapsydu PiCV jako antygenu do opłaszczania płytek wielodołkowych, może stanowić uzupełniające metody molekularne narzędzie diagnostyczne służące do określenia statusu infekcji PiCV u gołębi

domowych. W związku z globalną skalą problemu jaką są zakażenia PiCV u gołębi i brakiem szczepionki przeciwko cirkowirozie gołębi, jedynym sposobem kontroli tej choroby wydaje się być uzyskanie i utrzymywanie stad rodzicielskich wolnych od PiCV. Uzyskanie takich stad może być możliwe dzięki regularnemu monitoringowi przeprowadzanemu za pomocą badań serologicznych i molekularnych oraz systematycznej selekcji ptaków reagujących dodatnio w obu wymienionych testach.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w piątej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład prezentowanego osiągnięcia:

Stenzel T., Woźniakowski G., Pestka D., Choszcz D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A.: Application of pigeon circovirus recombinant capsid protein for detecting anti-PiCV antibodies in the sera of asymptomatic domestic pigeons and the potential use of a combination of serological and molecular tests for controlling circovirus infections in pigeon breeding flocks. Poultry Science, 2016, 96, 303-308.

Uzyskanie rekombinowanego białka kapsydu niezbędnego do przeprowadzenia monitoringu serologicznego było możliwe dzięki grantowi przyznanemu habilitantowi przez NCN (Numer 2014/15/D/NZ6/02416).

Podsumowanie i wnioski

Badania mające na celu ocenę rozprzestrzenienia PiCV w populacji gołębi, ich zróżnicowania genetycznego oraz korelacji z zakażeniami innymi drobnoustrojami są istotne zarówno z naukowego punktu widzenia, ale również z punktu widzenia praktykujących lekarzy weterynarii zajmujących się tą grupą pacjentów. Uzyskane wyniki badań nad określeniem zmienności genetycznej oraz mechanizmów mutacji, są jak dotąd jedynymi w świecie danymi uzyskanymi po przeanalizowaniu pełnego genomu PiCV. Określenie nowej, nie znanej do tej pory grupy filogenetycznej PiCV, której podstawę i zarazem jedynego przedstawiciela stanowi szczep PL53, pierwsze w świecie badania mające na celu określenie statusu immunologicznego PiCV gołębi reprodukcyjnych, a także stosowane w badaniach nowoczesne metody laboratoryjne świadczą o nowatorskim charakterze przedstawianego do oceny osiągnięcia. Przedstawione badania oprócz aspektu naukowego posiadają także ważny

aspekt aplikacyjny, ponieważ opracowane na potrzeby badań rekombinowane białko kapsydu może znaleźć zastosowanie w rutynowej diagnostyce serologicznej PiCV oraz immunoprofilaktyce cirkowirozy gołębi.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

1. Najbardziej prewalentnym z uwzględnionych w badaniach własnych wirusem w polskiej populacji gołębi jest PiCV.
2. Szczepy cirkowirusów gołębich charakteryzują się bardzo dużą zmiennością genetyczną i tworzą 5 grup filogenetycznych. Izolaty krajowe należą do kladów A, B oraz C.
3. Wirtualne usunięcie z genomów PiCV sekwencji zrekombinowanych pozwala na sklasyfikowanie izolatów PiCV do tylko 2 głównych kladów.
4. Szczep PL53 stanowi podstawę dla nowej grupy filogenetycznej PiCV.
5. O zmienności genetycznej PiCV decyduje sekwencja genu kodującego białko kapsydu.
6. Głównymi elementami ewolucji PiCV są procesy rekombinacji genetycznych oraz mutacje będące efektem selekcji pozytywnej (mutacje adaptacyjne).
7. Zakażenie PiCV u gołębi i związana z tym immunosupresja sprzyja infekcjom patogenami powodującymi choroby dróg oddechowych (PiHV, *Chlamydia psittaci*).
8. Kontrola cirkowirozy w stadach gołębi może być prowadzona przez utrzymywanie ptaków reprodukcyjnych wolnych od zakażenia tym wirusem, a uzyskanie takich ptaków powinno polegać na selekcji stad reprodukcyjnych opartej na monitoringu serologicznym i badaniach molekularnych.

4.2.4. Piśmiennictwo

1. Abadie J., Nguyen F., Groizeleau C., Amenna N., Fernandez B., Guereaud C., Guigand L., Robart P., Lefebvre B., Wyers, M. (2001): Pigeon circovirus infection: pathological observations and suggested pathogenesis. Avian Pathology, 30, 149-158.
2. Bennett S.N., Holmes E.C., Chirivella M., Rodriguez D.M., Beltran M., Vorndam V., Gubler D.J., McMillan W.O. (2006): Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto

Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. Journal of GenerealVirology, 87, 885-893.

3. Bernabé A., Gómez M.A., Navarro J.A., Gómez S., Sánchez J. (1994): Herpesvirus hepatitis in pigeon in Spain. Annales de Veterinaria de Murcia, 10, 57-60.
4. Boni M.F., Posada D., Feldman M.W. (2007). An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. Genetics, 176, 1035-1047.
5. Bonne N., Shearer P., Sharp M., Clark P., Raidal S. (2009): Assesment of recombinant beak and feather disease virus capsid protein as a vaccine for psittacine beak and feather disease. Journal of General Virology, 90, 640-647.
6. Caletti M., Franciosini M.P., Asdrubali G., Passamonti F. (2000): Atrophy of the primary lymphoid organs of meat pigeons in Italy associated with circoviruslike particles in the bursa of Fabricius. Avian Diseases, 44, 454-459.
7. Crowther R.A., Berriman J.A., Curran W.L., Allan G.M., Todd D. (2003): Comparison of the structures of three circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. Journal of Virology, 77, 13036-13041.
8. Cságola A., Lőrincz M., Tombácz K., Wladár Z., Kovács E., Tuboly, T. (2012): Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary. Virus Genes, 44, 75-79.
9. Darwich L., Mateu E. (2012): Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Research, 164, 61-67.
10. Daum I., Finsterbusch T., Härtle S., Göbel T.W., Mankertz A., Korbel R., Grund C. (2009): Cloning and expression of a truncated pigeon circovirus capsid protein suitable for antibody detection in infected pigeons. Avian Pathology, 38, 135-141.
11. Dickx V., Beeckman D.S.A., Dossche L., Tavernier P., Vanrompay D. (2010): Chlamydophila psittaci in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. Journal of Medical Microbiology, 59, 1348-1353.
12. Dolz G., Solórzano-Morales Á., Angelova L., Tien C., Fonseca L., Bonilla M.C. (2013): Chlamydia psittaci genotype B in a pigeon (Columba livia) inhabiting a public place in San José, Costa Rica. Open Veterinary Journal, 3, 135-139.
13. Duchatel J.P., Todd D., Curry A., Smyth J.A., Bustin J.C., Vindevogel H. (2005): New data on the transmission of pigeon circovirus. Veterinary Record, 157, 413-415.

14. Duchatel J.P., Todd D., Smyth J.A., Bustin J.C., Vindevogel, H. (2006): Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adults, young and embryonic pigeons. Avian Pathology, 35, 30-34.
15. Duchatel J.P., Todd D., Willeman C., Losson B. (2009): Quantification of pigeon circovirus in serum, blood, semen and different tissues of naturally infected pigeons using a real-time polymerase chain reaction. Avian Pathology, 38, 143-148.
16. Duchatel J.P., Todd D., Smyth J., Costes B., Jauniaux T., Farnir F., Losson B., Vanderplasschen, A. (2011): Pigeon circovirus: baculavirus expression of the capsid protein gene, specyfic antibody and viral load measured by real time polymerase chain reaction. Israel Journal of Veterinary Medicine, 66, 26-31.
17. Edgar R.C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32, 1792-1797.
18. Esteban D.J., Hutchinson A.P. (2011): Genes in the terminal regions of orthopoxvirus genomes experience adaptive molecular evolution. BMC Genomics, 12, 261.
19. Franciosini M.P., Fringuelli E., Tarhuni O., Guelfi G., Todd D., Casagrande Proietti P., Falocci N., Asdrubali G. (2005): Development of polymerase chain reaction-based in vivo method in the diagnosis of subclinical pigeon circovirus infection. Avian Diseases, 49, 340-343.
20. Freick M., Müller H., Raue R. (2008): Rapid detection of pigeon herpesvirus, fowl adenovirus and pigeon circovirus in young racing pigeons by multiplex PCR. Journal of Virological Methods, 148, 226-231.
21. Gibbs M.J., Armstrong J.S., Gibbs A.J. (2000): Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. Bioinformatics, 16, 573-582.
22. Gough R., Drury S.E. (1996): Circovirus-like particles in the bursae of young racing pigeons. Veterinary Record, 138-167.
23. Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. (2010): New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology, 59, 307-321.
24. Hattermann K., Soike D., Grund C.L., Markentz A. (2002). A method to diagnose pigeon circovirus infection in vivo. Journal of Virological Methods, 104, 55-58.

25. Heath L., Williamson A.L., Rybicki E.P. (2006): The capsid protein of beak and feather disease virus binds to the viral DNA and is responsible for transporting the replication-associated protein into the nucleus. Journal of Virology, 80, 7219-7225.
26. Heddema E.R., Ter Sluis S., Buys J.A., Vandenbroucke-Grauls C.M.E., van Wijnen J.H., Visser C.E. (2006). Prevalence of Chlamydophila psittaci in fecal droppings from feral pigeons in Amsterdam, The Netherlands. Applied and Environmental Microbiology, 72, 4423-4425.
27. Hess M., Prusas C., Monreal G. (1998): Growth analysis of adenoviruses isolated from pigeons in chicken cells and serological characterization of the isolates. Avian Pathology, 27, 196-199.
28. Johne R., Fernandez-de-Luco D., Höff, U., Müller H. (2006): Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. Journal of General Virology, 87, 1189-1195.
29. Julian L., Lorenzo A., Chenuet J.P., Bonzon M., Marchal C., Vignon L., Collings D.A., Walters M., Jackson B., Varsani A. (2012): Evidence of multiple introductions of beak and feather disease virus into the Pacific islands of Nouvelle-Caledonie (New Caledonia). Journal of General Virology, 93, 2466-2472.
30. Julian L., Piasecki T., Chrzastek K., Walters M., Muhire B., Harkins, G.W., Martin, D.P., Varsani A. (2013): Extensive recombination detected among beak and feather disease virus isolates from breeding facilities in Poland. Journal of General Virology, 94, 1086-1095.
31. Kosakovsky Pond S.L., Posada D., Gravenor M.B., Woelk C.H., Frost S.D. (2006): GARD: a genetic algorithm for recombination detection. Bioinformatics, 22, 3096-3098.
32. Lai G.H., Lin Y.C., Tsai Y.L., Lien Y.Y., Lin M.K., Chen H.J., Chang W.T., Tzen J.T.C., Lee M.S. (2014): High yield production of pigeon circovirus capsid protein in the E. coli by evaluating the key parameters needed for protein expression. BMC Veterinary Research 10, 115.
33. Mahzounieh M., Khoei H.H., Shamsabadi M.G., Dastjerdi A. (2014): Detection and phylogenetic characterization of Columbid circoviruses in Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran. Avian Pathology, 43, 524-528.

34. Mankertz A., Hattermann K., Ehlers B. Soike D. (2000): Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. Archives of Virology, 145, 2469-2479.
35. Martin D., Rybicki E. (2000): RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. Bioinformatics, 16, 562-563.
36. Martin D.P., Posada D., Crandall K.A., Williamson C. (2005): A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. AIDS Research and Human Retroviruses, 21, 98-102.
37. Martin D.P., Lemey P., Lott M., Moulton V., Posada D., Lefeuvre P. (2010): RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics, 26, 2462-2463.
38. Ménard A., Clerc M., Subtil A., Mégraud F., Bébéar C., de Barbeyrac B. (2006): Development of a real-time PCR for the detection of Chlamydia psittaci. Journal of Medical Microbiology, 55, 471-473.
39. Murrell B., Wertheim J.O., Moola S., Weighill T., Scheffler K., Pond S.L.K. (2012): Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. Plos Genetetics, 8.
40. Murrell B., Moola S., Mabona A., Weighill T., Sheward D., Kosakovsky Pond S.L., Scheffler K. (2013): FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. Molecular Biology and Evolution, 30, 1196-1205.
41. Padidam M., Sawyer S., Fauquet C.M. (1999): Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. Virology, 265, 218-225.
42. Paré J.A., Brash M.L., Hunter D.B., Hampson R.J. (1999): Observations on pigeon circovirus infection in Ontario. The Canadian Veterinary Journal, 40, 659-662.
43. Phan T.G., Vo N.P., Boros Á., Pankovics P., Reuter G., Li O.T.W., Wang C., Deng X., Poon L.L.M., Delwart E. (2013): The viruses of wild pigeon droppings PloS One. 8.
44. Posada D., Crandall K.A. (2001): Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 13757-13762.

45. Rahaus M., Desloges N., Probst S., Loebbert B., Lanttermann W., Wolff M.H. (2008): Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds. Veterinarni Medicina, 53, 53-58.
46. Raue R., Hess M. (2002): A fiber gene-based polymerase chain reaction for specyfic detection of pigeon adenovirus. Avian Pathology, 31, 95-99.
47. Raue R., Schmidt V., Freick M., Reinhardt B., Johne R., Kamphausen L., Kaleta E.F, Müller H., Krautwald-Junghanns M.E. (2005): A disease complex associated with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. Avian Pathology 34, 418-425.
48. Roy P., Dhillon A.S., Lauerman L., Shivaprasad H.L. (2003): Detection of pigeon circovirus by polymerase chain reaction. Avian Diseases, 47, 218-222.
49. Sachse K., Kuehlewind S., Ruettger A., Schubert E., Rohde G. (2012): More than classical Chlamydia psittaci in urban pigeons. Veterinary Microbiology, 157, 476-480.
50. Saik J.E., Weintraub E.R., Ditres R.W., EGY M.A.E. (1986): Pigeon herpes virus inclusion body hepatitis in a free-ranging pigeon. Avian Diseases, 30, 426-429.
51. Saito T., Ohnishi J., Mori Y., Iinuma Y., Ichiyama S., Kohi F. (2005): Infection by Chlamydophila avium in an eldery couple working in a pet shop. Journal of Clinical Microbiology, 43, 3011-3013.
52. Schmidt V., Schlömer J., Lüken C., Johne R., Biere B., Müller H., Krautwald-Junghanns M.E. (2008): Experimental infection of domestic pigeons with pigeon circovirus. Avian Diseases, 52, 380-386.
53. Shivaprasad H.L., Chin R.P., Jeffrey J.S., Latimer S.K., Nordhausen R.W., Niagro F. D., Camagnoli R.P. (1994): Particles resambling circovirus in the bursa of Fabricius of pigeons. Avian Diseases, 38, 635-641.
54. Smith J.M. (1992): Analyzing the mosaic structure of genes. Journal of Molecular Evolution 34, 126-129.
55. Smyth J.A., Carroll B.P. (1995): Circovirus infection in European racing pigeons. Veterinary Record, 136, 173-174.
56. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary

Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28, 2731-2739.

57. Taras L., Kubiček O., Juranová R., Jurajda V. (2003): The first demonstration of pigeon circovirus infection in the Czech Republic based on histology and nested PCR. Acta Veterinaria Brno, 72, 577-582.
58. Todd D., Weston J. H., Soike D., Smyth J. A. (2001): Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. Virology, 286, 354-362.
59. Todd D., Duchatel J.P., Weston J.H., Ball N.W., Borghmans B.J., Moffett D.A., Smyth J.A. (2002): Evaluation of polymerase chain reaction and dot blot hybridisation testing the diagnosis of pigeon circovirus infections. Veterinary Microbiology, 89, 1-16.
60. Todd D., Duchatel J.P., Bustin J.C., Scullion F.T., Scullion M.G., Scott A.N.J., Curry A., Ball N.W., Smyth J.A. (2006): Detection of pigeon circovirus in cloacal swabs: implications for diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Rececord, 159, 314-317.
61. Trible B. R., Kerrigan M., Crossland N., Potter M., Faaberg K., Hesse R., Rowland R.R. (2011): Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. Clinical and Vaccine Immunology, 18, 749-757.
62. Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. (1994): Pathogenicity for turkeys of Chlamydia psittaci strains belonging to the avian serovars A, B and D. Avian Pathology, 23, 247-262.
63. Varsani A., Regnard G.L., Bragg R., Hitzeroth II, Rybicki E.P. (2011): Global genetic diversity and geographical and host-species distribution of beak and feather disease virus isolates. Journal of General Virology, 92, 752-767.
64. Vereecken M., De Herdt P., Ducatelle R. (1998) Adenovirus infections in pigeons: a reviev. Avian Pathology, 27, 333-338.
65. Woods L.W., Latimer K.S., Barr B.C., Niagro F.D., Campagnoli R.P., Nordhausen R.W., Castro A.E. (1993): Circovirus-like infection in a pigeon. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 5, 609-612.
66. Woods L.W., Latimer K.S., Niagro F.D., Riddell C., Crowley A.M. Anderson M.L., Daft B.M., Moore J.D., Campagnoli R.P., Nordhausen R.W. (1994): A retrospective

study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). Journal of Veterinary Diagnostic Investogation, 6, 156-164.

67. Zhang Z., Lu C., Wang Y., Wang S., Dai D., Chen Z., Fan H. (2011): Molecular characterization and epidemiological investigation of Pigeon circovirus isolated in eastern China. Journal of Veterinary Diagnostic Investogation, 23, 665-672.
68. Zhang Z., Dai W., Wang S., Dai D. (2015): Epidemiology and genetic characteristics of Pigeon circovirus (PiCV) in eastern China. Archives of Virology, 160, 199-206.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie realizacji studiów doktoranckich brałem aktywny udział w pracach prowadzonych w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie, co zaowocowało autorstwem lub współautorstwem w licznych publikacjach. W związku z tematyką pracy doktorskiej jaką była immunomodulacja zainteresowałem się szczególnie możliwościami zastosowania syntetycznego immunomodulatora - methisoprinolu (izoprynozyna) metodą *in ovo* u indyków. Wstępem do badań było zdobycie podstaw wiedzy z zakresu immunologii i funkcjonowania układu odpornościowego ptaków, co zaowocowało współautorstwem w publikacji przeglądowej na ten temat (praca 5.1.1.). Przeprowadzone w tym okresie badania wykazały, że metizoprinol jest bardzo bezpiecznym immunomodulatorem i nie zaburza procesu lęgu u zarodków indyczych. Wykazano bowiem, że podanie izoprynozyny metodą *in ovo* w 26 dobie inkubacji nie wywołało negatywnego wpływu na proces klucia się piskląt ani na ich jakość bez względu na zastosowaną dawkę (5, 10 lub 20 mg na zarodek). Nie odnotowano także żadnego wpływu tego immunomodulatora na wartości wskaźników biochemicznych takich jak: AST, ALP, LDH-L, CK, aktywność lizozymu, poziom ceruloplazminy oraz białka całkowitego w surowicy wyklutych indycząt. Wyniki tych badań przedstawiono w pracy 5.1.2. Methisopriol jest immunomodulatorem wykazującym aktywność przeciwwirusową. W związku z powyższym przeprowadzono badania zmierzające do określenia jego potencjalnego wpływu na rozwój odporności poszczepiennej przeciwko wirusowi krwotocznego zapalenia jelit indyków (Haemorrhagic Enteritis Virus, HEV) po podaniu *in ovo*. Przeprowadzone badania potwierdziły

przeciwwirusowe działanie izoprynozyny, co manifestowało się zarówno zahamowaniem replikacji wirusa szczepionkowego, jak i rozwoju odporności poszczepiennej u immunizowanych zarodków indyczych. Zarodki immunizowane szczepionką przeciwko HEV bez dodatku izoprynozyny reagowały pozytywnie na szczepienie, co jest kolejnym wnioskiem z przeprowadzonych badań, sugerującym możliwość zastosowania metody *in ovo* do czynnego uodporniania indyków przeciwko wirusowi krwotocznego zapalenia jelit (praca 5.1.3.). Przeprowadzono także szereg badań histopatologicznych mających na celu określenie wpływu tego immunomodulatora na strukturę najważniejszych narządów układu immunologicznego: torby Fabrycjusza oraz śledziony. Badania te wykazały, że działanie izoprynozyny na strukturę morfologiczną tych narządów różni się w zależności od dawki oraz badanego narządu. W przypadku torby Fabrycjusza dawka 5mg/ zarodek powodowała rozwój utkania limfatycznego oraz statystycznie wyższą liczbę grudek limfatycznych w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast dawka 20mg/ zarodek powodowała efekt immunosupresyjny charakteryzujący się mniejszą liczbą grudek limfatycznych w błonie śluzowej tego narządu (praca 5.1.4.). W śledzionie z kolei, nie odnotowano żadnego efektu po zastosowaniu dawki 5 mg/ zarodek, natomiast znaczącemu rozwojowi uległa miazga czerwona, a także stwierdzono większą ilość centrów rozrodczych w miazdze białej po zastosowaniu dawki 20mg/ zarodek (praca 5.1.5.). Badania objęły również określenie wpływu tego immunomodulatora na kształtowanie się odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+, CD4+ oraz CD8+ w krwi piskląt, wyklutych z jaj, do których w 26 dobie podawano metizoprinol w różnych dawkach. Badania te wykazały, że izoprynozyna podana w dawce 5mg/ zarodek stymulowała odporność komórkową, co manifestowało się wyższym odsetkiem limfocytów T CD3+ i CD4+ w krwi obwodowej i śledzionie piskląt indyczych. Co ciekawe, zastosowanie tego immunomodulatora w dawce 20 mg/ zarodek stymulowało głównie nieswoistą odporność komórkową przejawiającą się wyższym odsetkiem limfocytów T CD8+ w śledzionie. Wyniki tych badań przedstawia praca 5.1.6.

W trakcie studiów doktoranckich uczestniczyłem także w pracach badawczych dotyczących wpływu kwasu 4-nitrofenyloarsenowego na inwazję *Histomonas meleogridis* u indyków (praca 5.1.7). Badania te wykazały, że substancja ta jest bardzo efektywna w zapobieganiu histomonozie indyków. Podczas jej stosowania nie odnotowano także objawów ubocznych u otrzymujących ją indyków. Należy mieć jednak na uwadze możliwość

kumulowania się w organizmach indyków związków arsenu i wynikające z tego potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumenta.

Brałem udział również w badaniach nad wpływem frukto-oligosacharydów (FOS) na przebieg zakażenia wirusem HE oraz *Salmonella* (*S.)* Typhimurium u indyków. Badania te wykazały, że dodatek FOS do paszy dla indyków zapobiega kolonizacji ich organizmu przez *S.* Typhimurium, ponieważ bakterię tą (5 dni po zakażeniu eksperymentalnym) wyizolowano tylko z jelit ślepych indyków otrzymujących FOS w paszy, natomiast u ptaków nie otrzymujących tego dodatku *S.* Typhimurium izolowano także z narządów wewnętrznych (wątroba). Powyższe należy tłumaczyć działaniem stymulującym FOS na mechanizmy obronne związane z przewodem pokarmowym oraz utrudnianiem adherencji i wnikania pałeczek *Salmonella* do komórek gospodarza. Wyniki tych badań przedstawiono w pracy 5.1.8.

W związku ze znaczącym problemem w patologii indyków jaki stanowią choroby układu krążenia zainteresowałem się również tą tematyką. Efektem tego była praca przeglądowa, opisująca etiopatogenezę najczęściej spotykanych u drobiu chorób układu sercowo-naczyniowego takich jak choroba okrągłego serca (kardiomiopatia rozstrzeniowa indyków), lateryzm (spontaniczne pęknięcia aorty) oraz syndrom krwawień okołonerkowych (praca 5.1.9).

W obrębie moich zainteresowań naukowych zawsze znajdowała się patologia ptaków wolnożyjących, gołębi oraz innych ptaków towarzyszących człowiekowi. Stały kontakt z pacjentami Katedry Chorób Ptaków umożliwił zbadanie i opisanie ciekawych przypadków klinicznych. U ptaków wolnożyjących prowadziłem badania dotyczące statusu serologicznego wybranych chorób zakaźnych. Badania te potwierdziły, że ptaki dzikie mają częsty kontakt z paramyksowirusami (20-75% surowic dodatnich w zależności od gatunku ptaka), wirusem syndromu spadku nieśności (12-100% surowic dodatnich) oraz reowirusami (40-87,5% surowic dodatnich). Wykazano, że 25-87% badanych surowic (w zależności od gatunku ptaków) było dodatnich pod kątem przeciwciał przeciwko *S.* Typhimurium i *S.* Enteritidis. Wyniki tych badań opisano w pracy 5.1.10.

Ptaków dzikich dotyczy też publikacja 5.1.11, w której opisałem przypadek sarkocystozy u dzikich kaczek krzyżówek (*Anas platyrhynchos*). Przypadek dotyczył dwóch ptaków obojga płci, z których jeden był w dobrej kondycji i został uśmiercony w ramach pozyskania łowieckiego, drugi ptak (ciężko ranna samica) został dostarczony do Katedry Chorób Ptaków. Badanie anatomopatologiczne obu osobników wykazało liczne sarkocysty ułożone równolegle do długiej osi włókien mięśniowych. Badaniem histopatologicznym stwierdzono zwyrodnienie tłuszczowe mięśni oraz pęknięcia poszczególnych włókien mięśniowych. Zmianom towarzyszył naciek komórek zapalnych.

Efekty badań dotyczących problematyki inwazji pasożytniczych przedstawione zostały również w publikacji 5.1.12. Monitoring inwazji wybranych pasożytów żołądkowo-jelitowych w populacji gołębi domowych w północnej Polsce przeprowadzony w latach 2005/2006 wykazał, że u 56,4 % gołębi pocztowych i aż u 90,9% gołębi ozdobnych jest inwazja pierwotniaków z rodzaju *Eimeria sp.* Znacznie mniej stwierdzono nicieni *Ascaridia columbae* (5,5 % gołębi pocztowych i 15,5% gołębi ozdobnych) oraz *Capillaria sp.* (3,6% gołębi pocztowych i 36,4% gołębi ozdobnych). Stosunkowo dużą prewalencję stwierdzono w kontekście wiciowców *Trichomonas columbae*, który obecny był u 61,8% gołębi pocztowych oraz u aż 100% gołębi ozdobnych.

Jestem również współautorem opisów przypadków chorób nowotworowych i zakaźnych występujących u ptaków domowych. Należą do nich opis pierwszego przypadku nowotworu - Cholangiocarcinoma stwierdzonego u 9 letniej papugi nimfy (*Nymphicus hollandicus*) (praca 5.1.13) oraz przypadku zakażenia poliomawirusem ptasim (Budgerigar Fledgling Disease Virus, BFD) u 8-letniej amazonki niebieskoczelnej (*Amazona aestiva*). Opis tego przypadku stanowi praca 5.1.14.

Wykaz publikacji z tego okresu zamieszczono poniżej:

5.1.1. Rumińska E., Koncicki A., **Stenzel T.**: Budowa i funkcjonowanie układu odpornościowego u ptaków. Medycyna Weterynaryjna, 2008, 64, 265-68. **(MNiSW 15 pkt; IF-)**

5.1.2. Tykałowski B., **Stenzel T.**, Mazur-Lech B., Andrzejewski M., Koncicki A.: The influence of methisoprinol applied in ovo upom hatchability and health status of

turkeys. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2009, 12, 203-207. **(MNiSW 15 pkt; IF 0,435)**

5.1.3. Koncicki A., Tykałowski B., **Stenzel T.**, Andrzejewski M: Assessment of the efficiency of applying methisoprinol and vaccination of turkeys against the haemorrhagic enteritis virus using in ovo methods. Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy, 2009, 53, 13-15. **(MNiSW 15 pkt; IF 0,218)**

5.1.4. Tykałowski B., **Stenzel T.**, Lewczuk B., Andrzejewski M., Koncicki A.: Effect of methisoprinol administered in ovo on the histological structure of the bursa of fabricius in turkeys. Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy, 2009, 53, 471-474. **(MNiSW 15 pkt; IF 0,218)**

5.1.5. **Stenzel T.***, Tykałowski B., Lewczuk B., Andrzejewski M., Koncicki A.: The influence of methisoprinol administered in ovo on the morphological structure of the spleen in turkeys. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2010, 13, 225-231. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,507)**

5.1.6. **Stenzel T**.*, Tykałowski B., Andrzejewski M., Koncicki A.: Wpływ mehtisoprinolu zastosowanego *in ovo* na odsetek subpopulacji limfocytów T CD_3^+, CD_4^+ i CD_8^+ u indyków. Medycyna Weterynaryjna, 2008, 64, 1157-1160. **(MNiSW 10 pkt; IF -)**

5.1.7. Koncicki A., Bukowska A., Mazur-Gonkowska B., Krasnodębska-Depta A., **Stenzel T.**: Ocena skuteczności kwasu 4-nitrofenyloarsenowego w profilaktyce inwazji Histomonas meleagridis u indyków. Medycyna Weterynaryjna, 62, 2006, 1191-1194. **(MNiSW 15 pkt; IF -)**

5.1.8. Koncicki A., Jankowski J., Zduńczyk Z, Mazur-Gonkowska B., Krasnodębska-Depta A., **Stenzel T.**: Wpływ frukto-oligosacharydów na przebieg zakażenia indyków wirusem krwotocznego zapalenia jelit i pałeczkami Salmonella typhimurium. Medycyna Weterynaryjna, 62, 2006, 1387-1391. **(MNiSW 15 pkt; IF-)**

5.1.9. **Stenzel T.***, Tykałowski B., Koncicki A.: Cardiovascular system diseases in turkeys. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2008, 11, 245-50. **(MNiSW 10 pkt; IF 0,465)**

5.1.10. **Stenzel T**.*, Tykałowski B., Mazur-Lech B., Koncicki A.: Infection of wildlife birds in serological screening. Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy, 2008, 52, 63-66. **(MNiSW 15 pkt; IF 0,337)**

5.1.11. **Stenzel T**.*, Koncicki A.: Przypadek sarkocystozy u dzikich kaczek. Medycyna Weterynaryjna, 2007, 1361-1362. **(MNiSW 10 pkt; IF -)**

5.1.12. **Stenzel T**.*, Koncicki A.: Occurence of parasitic invasions in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in the Northern Poland. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2007, 10, 275-278. **(MNiSW 10 pkt; IF 0,291)**

5.1.13. Gesek M., **Stenzel T.**, Szarek J. Babińska I., Mieszczyński T.: Cholangiocarcinoma in cocktaiel (Nymphicus hollandicus). Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy, 2009, 53, 445-448. **(MNiSW 15 pkt; IF 0,218)**

5.1.14. Szweda M., Babińska I., Gesek M., **Stenzel T.**, Kołodziejska A., Drzewiecka A. : Budgerigar Fledgling Disease in an 8-year-old Blue-fronted Amazon Parrot (Amazona aestiva aestiva): A case Report. Journal of Comparative Pathology, 2010, 143(4) 348. **(MNiSW 30 pkt; IF 1,529)**

* *autor korespondencyjny*

5.2. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1. Badania nad wpływem różnych immunomodulatorów na układ odpornościowy gołębi oraz przebieg zakażenia PPMV-1

Ważne miejsce w moich zainteresowaniach naukowych zajmuje zagadnienie immunologii u paków, głównie w charakterze wpływu różnych czynników na układ

odpornościowy. Badania mające na celu wykazanie potencjalnego wpływu różnych immunomodulatorów, zarówno naturalnych, jak i syntetycznych na wybrane funkcje odpornościowe u gołębi wykonałem w ramach realizacji projektu badawczego promotorskiego nr N N308 221233. Zaplanowane w ramach tego projektu badania miały charakter praktyczny, ponieważ oceniano wpływ immunomodulatorów na wybrane mechanizmy odpornościowe u gołębi w kontekście szczepienia przeciwko gołębiemu wariantowi wirusa rzekomego pomoru drobiu (pigeon paramyxovirus 1, PPMV-1). Ponadto badania wykonywane w ramach projektu badawczego zostały rozszerzone o ocenę wpływu immunomodulatora o potencjalnym przeciwwirusowym działaniu (izoprynozyny) na przebieg zakażenia eksperymentalnego PPMV-1.

W trakcie badań określono potencjalny wpływ trzech immunomodulatorów: ß-glukanów, lewamizolu i metizoprinolu na kształtowanie się odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ w krwi obwodowej i śledzionie, a także na kształtowanie się mian przeciwciał przeciwko PPMV-1. Badania przeprowadzono na czterech grupach gołębi pocztowych składających się z 20 osobników. Ptaki poddano dwukrotnemu szczepieniu przeciwko PPMV-1 w 6 i 9 tygodniu życia. W okresie około szczepiennym ptaki w zależności od grupy otrzymywały jeden z wymienionych wyżej immunomodulatorów. Substancje te stosowane były według następującego schematu: metizoprinol w dawce 300 mg/ 1 kg m.c. domięśniowo przez 3 dni przed szczepieniem, lewamizol w dawce 2 mg/ 1 kg m.c. domięśniowo jeden dzień przed szczepieniem oraz ß-glukany w dawce 5 mg/ 1 kg m.c. *per os* przez 10 kolejnych dni przed szczepieniem. Kontrolę stanowiły gołębie otrzymujące domięśniowo przez 3 dni przed każdym szczepieniem 0,9% NaCL. Określenie odsetka poszczególnych subpopulacji limfocytów T przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej, natomiast miana przeciwciał przeciwko PPMV-1 określono metodą ELISA. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że ß-glukany oraz lewamizol stymulowały odporność humoralną, co manifestowało się wzrostem miana pzeciwciał przeciwko PPMV-1 oraz wzrostem odsetka limfocytów T CD4+ w krwi obwodowej (tylko lewamizol). Oba z wymienionych immunomodulatorów stymulowały również wzrost odsetka limfocytów T CD8+ w śledzionie. Żadnego efektu nie stwierdzono w grupie kontrolnej ani w grupie ptaków otrzymujących metizoprinol, co spowodowane było najprawdopodobniej

zastosowaniem zbyt wysokiej dawki tego immunostymulatora. Wyniki opisywanych badań opublikowano w pracy 5.2.1.1.

Niesatysfakcjonujące wyniki po zastosowaniu metizoprinolu były podstawą do przeprowadzenia kolejnego doświadczenia zmierzającego do ustalenia immunostymulującej dawki tego immunomodulatora. Badania wykonano w analogicznym układzie jak w doświadczeniu opisanym powyżej, przy czym przez 3 kolejne dni przed każdym szczepieniem ptaki otrzymywały izoprynozynę w dawkach 100 mg, 200 mg lub 600 mg/ 1 kg m.c. Grupa kontrolna otrzymywała wodę do iniekcji przez 3 kolejne dni przed każdym szczepieniem. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać, że działanie metizoprinolu było różne w zależności od dawki. Najlepsze efekty uzyskano stosując dawkę 200 mg kg/ m.c., co manifestowało się statystycznie wyższym odsetkiem limfocyów T CD4+ zarówno w krwi obwodowej, jak i śledzionie. Najgorsze efekty uzyskano stosując ten immunomodulator w dawce 600 mg/ kg mc. Nie odnotowano natomiast żadnych statystycznie istotnych różnic w odsetku limfocytów T CD8+ w krwi obwodowej i śledzionie, mimo że w przypadku dawki 600 mg/ kg m.c. był on najniższy. Podobnie nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w kształtowaniu się mian przeciwciał przeciwko PPMV-1, mimo że w grupach otrzymujących izoprynozynę w dawkach 100 i 200 mg/ 1 kg m.c. były one wyższe niż u ptaków z pozostałych grup. Wyniki tych badań przedstawia praca 5.2.1.2.

W związku z potencjalnym przeciwwirusowym działaniem izoprynozyny przeprowadzono kolejne doświadczenie zmierzające do potwierdzenia tej hipotezy. Badania przeprowadzono na 3 grupach gołębi liczących po 15 osobników. Ptaki zakażono uzyskanym z PIWet-PIB w Puławach krajowym szczepem PPMV-1 (APMV-1/pigeon/Poland/AR3/95) o mianie LD_{50} 10^{-7} w 0,1 ml. Gołębie poddano immunomodulacji za pomocą izoprynozyny w dawce 200mg/ 1 kg m.c. na 3 dni przed lub 3 dni po zakażeniu eksperymentalnym. Ptaki z grupy kontrolnej otrzymywały w tym samym czasie wodę do iniekcji. W wybranych terminach po zakażeniu eksperymentalnym uśmiercano po 5 ptaków z każdej grupy i pobierano od nich próbki wymazów oraz wycinki płuc, nerek i mózgu do badań molekularnych. Obserwowano również stan kliniczny ptaków. Wyniki wskazywały, że najwięcej próbek, w których potwierdzono obecność materiału genetycznego PPMV-1 pochodziło od gołębi z grupy kontrolnej oraz otrzymującej metizoprinol przed zakażeniem

eksperymentalnym. Różnice te były widoczne w 4 dniu po zakażeniu. W kolejnych dniach po zakażeniu odsetek próbek dodatnich pod kątem materiału genetycznego PPMV-1 wzrósł prawie do 100 u ptaków ze wszystkich grup za wyjątkiem próbek nerek i płuc gołębi otrzymujących metizoprinol po zakażeniu. Najniższą śmiertelność paków wykazano również w tej grupie. Badania pozwoliły wykazać, że metizoprinol w dawce 200 mg/ 1 kg m.c. podany po zakażeniu eksperymantalnym wykazuje aktywność przeciwwirusową, co manifestowało się wolniejszym rozwojem i łagodniejszym przebiegiem zakażenia ekperymentalnego PPMV-1. Główny wniosek z przeprowadzonych badań sugeruje, że metizoprinol może być stosowany jako alternatywny lek w terapii chorób wirusowych gołębi (praca 5.2.1.3.).

Wyniki omówionych wyżej badań przedstawiłem w rozprawie doktorskiej pt. „Wpływ różnych immunomodulatorów na wybrane parametry odporności nieswoistej i swoistej u gołębi (*Columba Livia domestica*) oraz przebieg zakażenia paramyksowirusem gołębim (PPMV-1).” (promotor: prof. dr hab. Andrzej Koncicki), którą obroniłem 19.11.2010 roku na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wyniki zaprezentowane w dysertacji zostały opublikowane w późniejszym okresie w trzech artykułach:

5.2.1.1. **Stenzel T.***, Tykałowski B., Śmiałek M., Kwiatkowska-Stenzel A., Koncicki A.: The effect of different immunomodulators on the percentage of CD4+ and CD8+ T lymphocytes and the antibody titres in pigeons immunised against PPMV-1. Medycyna Weterynaryjna, 2011, 67, 254-257. **(MNiSW 9 pkt; IF-)**

5.2.1.2. **Stenzel T.***, Tykałowski B., Śmiałek M., Kwiatkowska-Stenzel A., Koncicki A.: The effect of different doses of methisoprinol on the percentage of CD4+ and CD8+ T lymphocytes subpopulations and the antibody titres in pigeons immunised against PPMV-1. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2011, 14, 367-371. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,565)**

5.2.1.3. **Stenzel T.*,** Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D., Koncicki A.: Influence of methisoprinol on the course of an experimental infection with PPMV-1 in pigeons. Medycyna Weterynaryjna, 2014, 70, 219-223. **(MNiSW 15 pkt; IF 0,218)**

* *autor korespondencyjny*

5.2.2. Badania nad wpływem różnych czynników żywieniowych, wybranych antybiotyków oraz zakażeń na procesy odpornościowe u drobiu

W trakcie pracy na stanowisku adiunkta uczestniczyłem w badaniach prowadzonych w Katedrze Chorób Ptaków, których tematyka dotyczyła wpływu czynników żywieniowych i zakaźnych na wybrane mechanizmy odpornościowe u drobiu.

Dużą uwagę badaczy zwracają dodatki żywieniowe wykorzystywane w odchowie drobiu. Głównym zadaniem dodatków żywieniowych jest zoptymalizowanie produkcji, głównie mięsnej. Niektóre ze stosowanych dodatków żywieniowych mogą mieć również wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego ptaków. W jednym z doświadczeń zbadano wpływ dodatku do paszy dla kurcząt brojlerów różnych poziomów sodu na kształtowanie się odsetka subpopulacji limfocytów T CD4+, CD8+ oraz CD4+CD8+ w krwi obwodowej, a także na poziom makroelementów w surowicy tych ptaków. Ptaki doświadczalne karmiono przez 5 tygodni paszą zawierającą różne poziomy chlorku sodu (od 0 do 0,636). W wieku 35 dni z każdej grupy doświadczalnej wyselekcjonowano po 8 ptaków, od których pobrano krew do badań cytometrycznych oraz biochemicznych. Badania wykazały, że zastosowanie różnego stężenia chlorku sodu w paszy dla kurcząt brojlerów nie ma żadnego wpływu na kształtowanie się odsetka badanych subpopulacji limfocytów T w krwi obwodowej ptaków. Wykazano natomiast, że pasza nie zawierająca dodatku chlorku sodu spowodowała obniżenie w surowicy badanych ptaków poziomu sodu i chlorków oraz wzrost poziomu potasu, wapnia i magnezu. Wyniki tych badań opublikowano w pracy 5.2.2.1.

Uczestniczyłem również w badaniach nad wpływem selenu w formie nieorganicznej oraz organicznej na układ odpornościowy piskląt indyczych. Celem badań było określenie czy suplementacja w paszy dla indyków stad rodzicielskich selenu o różnej przyswajalności ma wpływ na procesy odpornościowe oraz wzrost ich potomstwa. Stada rodzicielskie, z których uzyskiwano jaja wylęgowe do dalszych badań otrzymywały w paszy dodatek selenu nieorganicznego (selenin sodu 0,3 mg/ 1 kg) lub organicznego

(komercyjny preparat Sel-Plex). Badania metodą cytometrii przepływowej nie wykazały różnic w kształtowaniu się odsetka limfocytów T (CD4+, CD8+, CD4+CD8+) oraz B (IgM+), co sugeruje że forma podawanego z paszą selenu nie wpływa na procesy odpornościowe związane z aktywnością tych komórek. Wykazano natomiast, że w surowicy piskląt wyklutych z jaj indyczek otrzymujących w paszy dodatek selenu w formie organicznej, aktywność peroksydazy glutationowej i dysmutazy nadtlenkowej była wyższa niż u piskląt uzyskanych z jaj indyczek karmionych seleninem sodu. Dodatek organicznej formy selenu wpływał również na zwiększenie koncentracji tego pierwiastka w mięśniach piersiowych oraz zmniejszenie poziomu substancji reaktywnych kwasu tiobarbiturowego (TBARS) w żółtku jaj oraz mięśniach piskląt. Wyniki uzyskanych badań sugerują, że dodatek selenu w formie organicznej do paszy dla indyków reprodukcyjnych wpływa korzystnie na redukcję procesów oksydacyjnych w jaju oraz u świeżo wyklutych piskląt i nie ma negatywnego wpływu na ich układ odpornościowy (praca 5.2.2.2.).

Brałem także udział w badaniach nad wpływem dodatku do paszy indyków rzeźnych całego ziarna pszenicy na wybrane procesy odporności humoralnej i komórkowej oraz przyrosty masy ciała. W celu zweryfikowania hipotezy badawczej indyki podzielone na 3 grupy otrzymywały paszę z różną zawartością pełnego ziarna pszenicy w przeliczeniu na ogólną zawartość tego zboża w paszy: W0 (0%), W50 (50%) oraz W100 (100%). Ptaki zaszczepiopno przeciwko ND (20 doba) oraz TRT (30 doba). Badania wykazały, że dodatek pełnego ziarna pszenicy do paszy dla indyków rzeźnych stymulował mechanizmy nieswoistej odporności komórkowej w przewodzie pokarmowym ptaków, co manifestowało się wyższym odsetkiem subpopulacji limfocytów T CD4+ oraz CD4+CD8+ w błonie śluzowej jelita biodrowego. Wyższy odsetek subpopulacji limfocytów T CD4+ stwierdzono również w krwi obwodowej. Pobudzenie nieswoistej odporności komórkowej mogło mieć również pośredni wpływ na odporność poszczepienną, ponieważ zaobserwowano także wyższe miana przeciwciał przeciwko ND oraz TRT u piskląt otrzymujących dodatek 50 i 100% pełnego ziarna pszenicy. Uzyskane wyniki badań sugerują, że skarmianie drobiu paszami zbliżonymi do naturalnych może mieć pozytywny efekt na funkcjonowanie ich układu odpornościowego. Z drugiej strony tego rodzaju żywienie może znaleźć ograniczone zastosowanie w komercyjnym chowie drobiu, ponieważ u indyków z wszystkich grup otrzymujących dodatek

pełnego ziarna pszenicy do paszy stwierdzono niższe przyrosty oraz gorsze wykorzystanie paszy w stosunku do grupy kontrolnej. Wyniki tych badań opublikowano w pracy nr 5.2.2.3.

Uczestniczyłem również w badaniach nad wpływem fitoncydów na wybrane funkcje układu odpornościowego brojlerów kurzych i indyków rzeźnych. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego preparatu adiSalmo^{sol} PF zawierającego m.in. ekstrakty ziołowe oraz olejki eteryczne. Wykazano, że kurczęta otrzymujące badany preparat z wodą do picia przez 3 kolejne dni posiadały wyższy, w porównaniu z grupą kontrolną, odsetek limfocytów T CD4+ w śledzionie, migdałkach jelit ślepych oraz torbie Fabrycjusza, a także wyższy odsetek subpopulacji limfocytów T CD8+ w grasicy i śledzionie. Stwierdzono u nich również wyższy odsetek limfocytów podwójnie pozytywnych (CD4+/CD8+) w błonie śluzowej jelita biodrowego oraz torbie Fabrycjusza. Immunomodulujące działanie tego preparatu stwierdzono także u indyków, u których wykazano wyższy, w porównaniu z grupą kontrolną, odsetek limfocytów T CD4+ w śledzionie i grasicy, wyższy odsetek limfocytów T CD8+ w krwi obwodowej oraz migdałkach jelit ślepych, a także wyższy odsetek komórek CD4+/CD8+ w grasicy oraz błonie śluzowej jelit ślepych. Nie stwierdzono natomiast żadnych różnic w odsetku limfocytów B (IgM+) u żadnych z badanych grup drobiu, ani w poziomach mian przeciwciał poszczepiennych przeciwko IB u kurcząt. Uzyskane wyniki wykazały immunostymulujące działanie badanego preparatu, co może znaleźć zastosowanie praktyczne (praca 5.2.2.4).

Prowadzane w Katedrze Chorób Ptaków badania nad funkcjonowaniem układu immunologicznego drobiu dotyczyły także wpływu substancji leczniczych na wybrane zjawiska odpornościowe. Jedno z doświadczeń, w którym uczestniczyłem dotyczyło wpływu oxytetracykliny podanej indykom na wybrane parametry odporności komórkowej. Oksytetracyklina jest antybiotykiem powszechnie stosowanym w leczeniu drobiu ze względu na szerokie spektrum działania. Efektem ubocznym stosowania tetracyklin jest immunosupresja, co u drobiu było potwierdzone tylko metodami *in vitro*. Wobec tego przeprowadzono badania na indykach rzeźnych w wieku 5 tygodni zmierzające do określenia wpływu tego antybiotyku na odporność komórkową i humoralną z zastosowaniem metod cytometrii przepływowej. Indyki z grupy kontrolnej otrzymywały *per os* przez 5 dni oksytetracyklinę w dawce 500 mg substancji aktywnej na 1 litr wody. Badania wykazały, że

podanie tego antybiotyku spowodowało obniżenie odsetka subpopulacji limfocytów T CD8+ w krwi obwodowej oraz śledzionie. Spadek odsetka limfocytów T CD4+ widoczny był tylko w śledzionie, a limfocytów B (IGM+) tylko we krwi. Wyniki pozwoliły potwierdzić, że stosowanie oksytetracykliny w dawce leczniczej ma istotny wpływ na odsetek badanych limfocytów T i B IgM+, co jednoznacznie wskazuje na jej immunosupresyjne działanie na komórkowe mechanizmy układu odpornościowego, którego konsekwencją może być wystąpienie chorób na tle zakażeń drobnoustrojami oportunistycznymi i gorsza odporność poszczepienna (praca 5.2.2.5).

Szeroko badanym w Katedrze Chorób Ptaków Wydz. Med. Wet. UWM w Olsztynie drobnoustrojem jest również krajowy izolat adenowirusa wywołującego krwotoczne zapalenie jelit u indyków (HEV). Od chwili uruchomienia w w/w jednostce pracowni cytometrii przepływowej badania nad tym wirusem rozszerzono o aspekt immunologiczny wywoływanych przez niego infekcji. Prace badawcze, w których brałem udział dotyczyły wpływu zakażenia tym wirusem na wybrane parametry odporności komórkowej oraz przebieg kolibakteriozy (praca 5.2.2.6). Badania te wykazały, że 5 dni po zakażeniu HEV odsetek limfocytów T CD8+ oraz B IgM+ w śledzionie był znacznie niższy niż u ptaków nie zakażonych tym wirusem. Stwierdzono jedynie wzrost odsetka limfocytów T CD4+ w krwi obwodowej. Wykazano również, że przebieg eksperymentalnie wywołanej kolibakteriozy był znacznie cięższy (stwierdzono padnięcia) u ptaków wcześniej zakażonych krajowym izolatem HEV, ptaki z tej grupy charakteryzowały się też niższą masą ciała i gorszym wykorzystaniem paszy, co wyraźnie potwierdza jego immunosupresyjne właściwości.

Wyniki opisywanych wyżej badań przedstawiono w następujących publikacjach:

5.2.2.1. Tykałowski B., **Stenzel T.,** Mikulski D., Jankowski J., Zduńczyk Z., Juśkiewicz J., Koncicki A.: Level of electrolytes and percentage of T-lymphocyte subpopulations in blood of broiler chickens fed mixtures with different contents of sodium chloride. Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy, 2011, 55, 333-337. **(MNiSW 13 pkt; IF 0,414)**

5.2.2.2. Jankowski J., Zduńczyk Z., Sartowska K., Tykałowski B., **Stenzel T.,** Wróblewska M., Koncicki A.: The metabolic and immune response of young turkeys originating from parent flocks fed diets with mineral or organic selenium. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2011, 353-358. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,565)**

5.2.2.3. Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D., **Stenzel T.**, Jankowski J., Mikulski D., Koncicki A.: Effect of whole wheat feeding on selected immune parameters in growing male turkeys. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2014, 17, 255-262. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,604)**

5.2.2.4. Koncicki A., Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., **Stenzel T.**: The influence of phytoncides on the immune system of broiler chickens and turkeys. Central European Journal of Immunology, 2015, 40, 287-291. **(MNiSW 15 pkt; IF 0,28)**

5.2.2.5. Tykałowski B., **Stenzel T.,** Śmiałek M., Pestka D., Choszcz D., Koncicki A.: Influence of the oral administration of oxytetracycline on selected parameters of cellular immunity in turkeys. Medycyna Weterynaryjna, 2013, 69, 432-435. **(MNiSW 15 pkt; IF 0,196)**

5.2.2.6. Koncicki A., Tykałowski B., **Stenzel T.**, Śmiałek M., Pestka D.: Effect of infection of turkeys with haemorrhagic enteritis adenovirus isolate on the selected parameters of cellular immunity and the course of colibacillosis. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2012, 15, 215-220. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,57)**

5.2.3. Badania nad patologią i immunologią układu oddechowego u drobiu

Choroby układu oddechowego stanowią bardzo ważny problem w patologii drobiu. Specyficzna budowa anatomiczna tego układu sprzyja wielu chorobom o podłożu zakaźnym. Nie bez znaczenia jest też inna niż u ssaków charakterystyka lokalnej odporności błon śluzowych. Przed rozpoczęciem badań zapoznałem się szczegółowo z piśmiennictwem z tego zakresu, efektem czego był współudział w publikacjach przeglądowych poświęconych zagadnieniom lokalnej odporności błon śluzowych u drobiu (praca 5.2.3.1), a także immunologii, patogenezy i profilaktyki zakażeń TRT (Turkey rhinotracheitis) (praca 5.2.3.2) oraz ILT (Infectious laryngotracheitis) (praca 5.2.3.3).

Brałem także udział w badaniach dotyczących kształtowania się odporności poszczepiennej skierowanej przeciwko TRT u indyków. TRT jest chorobą wirusową stanowiącą powszechny problem w patologii indyków na całym świecie, a jedną z metod jej zapobiegania są szczepienia ochronne. Wiadomym jest, że szczepienie stad rodzicielskich indyków nie chroni uzyskanych z nich piskląt przed zakażeniem tym wirusem, natomiast niewiele wiadomo na temat wpływu odporności matczynej na rozwój odporności poszczepiennej. W celu zweryfikowania hipotezy badawczej sugerującej możliwość istnienia takich zależności przeprowadzono doświadczenia, w których określano lokalną odpowiedź komórkową i humoralną u piskląt posiadających przeciwciała matczyne (maternally derrived antibodies, MDA+) lub nie (MDA-) w kontekście szczepienia przeciwko TRT. Badania te wykazały różnice w rozwoju odporności poszczepiennej u piskląt indyczych wynikające z różnych mian przeciwciał matczynych. U indycząt uzyskanych od rodziców nie immunizowanych przeciwko TRT (MDA-) lub posiadających bardzo niskie miana przeciwciał matczynych stwierdzano stymulację (wzrost odsetka) limfocytów T CD8+ w gruczole Hardera i błonie śluzowej tchawicy oraz wzrost swoistych przeciwciał IgY w surowicy. Z kolei pisklęta posiadające wysokie miana przeciwciał matczynych posiadały wyższy odsetek limfocytów T CD4+ w gruczole Hardera oraz błonie śluzowej tchawicy, ale nie stwierdzano u nich wzrostu mian przeciwciał IgY . U ptaków z tej grupy stwierdzono także, że wirus szczepionkowy był wykrywany w błonach śluzowych w krótszym czasie niż u ptaków MDA-. W opisywanych badaniach wykazano również, że u piskląt indyczych posiadających w dniu szczepienia przeciwciała matczyne dochodzi do zaburzeń w rozwoju swoistej odporności humoralnej w błonach śluzowych górnych dróg oddechowych, co manifestowało się zarówno spadkiem liczby swoiście uczulonych limfocytów B IgA+, jak i zmniejszeniem produkcji i sekrecji IgA przez te komórki. Powyższe wskazuje, że różne poziomy przeciwciał matczynych przeciwko TRT mogą mieć związek z brakiem skuteczności szczepień przeciwko tej chorobie oraz powstawaniem zakażeń TRTV w terenie. Wyniki tych badań opublikowano w pracach 5.2.3.4. i 5.2.3.5.

Uczestniczyłem również w badaniach epidemiologicznych dotyczących występowania bordetelozy u indyków oraz ptaków dzikich. Badania przeprowadzono metodą ELISA na surowicach uzyskanych od indyków pochodzących z 87 stad w różnym wieku i różnej

użytkowości. W badaniach tych wykazano, że występowanie przeciwciał przeciwko *Bordetella avium* oraz wysokość ich miana wzrastała wraz z wiekiem badanych ptaków. Surowice dodatnie stwierdzano u ptaków wszystkich typów użytkowych oraz o różnym statusie klinicznym (chore i zdrowe). Obecność przeciwciał u piskląt jednodniowych należy wiązać raczej z ich pionowym przekazywaniem przez zakażonych wcześniej rodziców. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje terenowe sugerujące duże znaczenie epizootyczne zakażeń *Bordetella avium* u indyków (praca 5.2.3.6). Z kolei badania nad występowaniem tego drobnoustroju u ptaków wolnożyjących przeprowadzone metodami biologii molekularnej wykazały obecność materiału genetycznego *Bordetella avium* jedynie u 25 na 650 przebadanych osobników. Bakteria ta najbardziej prewalentna była u bażantów łownych (54,54%) i łysek (9,09%), a w mniejszym stopniu u kaczek krzyżówek (2,77%) i mew śmieszek (3,22%). Powyższe wskazuje na rolę ptaków dzikich jako rezerwuaru bakterii groźnych dla drobiu (praca 5.2.3.7).

Efektem udziału w tych pracach badawczych jest współautorstwo w następujących publikacjach:

5.2.3.1. Śmiałek M., Tykałowski B., **Stenzel T.**, Koncicki A.: Local immunity of the respiratory mucosal system in birds. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2011, 14, 291-297. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,565)**

5.2.3.2. Śmiałek M., Tykałowski B., **Stenzel T.**, Koncicki A.: The perspective of immunoprophylaxis and selected immunological issues in the course of the turkey rhinotracheitis. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2012, 15, 175-180. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,57)**

5.2.3.3. Śmiałek M., Tykałowski B., **Stenzel T.,** Pestka D., Koncicki A.: Infectious Laryngotracheitis: pathogenesis and perspectives of immunoprophylaxis. Medycyna Weterynaryjna, 2012, 68, 656-661. **(MNiSW 10 pkt; IF 0,203)**

5.2.3.4. Śmiałek M., Pestka D., Tykałowski B., **Stenzel T.**, Koncicki A.: Development of vaccine-induced immunity against TRT in turkeys depends remarkably on the level of

maternal antibodies and the age of birds on the day of vaccination. BMC Veterinary Research. 2015, 11, 28. **(MNiSW 35 pkt; IF 1,777)**

5.2.3.5. Śmiałek M., Tykałowski B., Welenc J., **Stenzel T.**, Koncicki A.: Three-step anti-aMPV IgA expression profile evaluation in Turkey of different immunological status after TRT vaccination. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2016, 19, 509-518. **(MNiSW 20 pkt, IF 0,719)**

5.2.3.6. Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., **Stenzel T.**, Koncicki A.: Epidemiological situation of Turkey coryza (bordetellosis) in Poland. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2015, 18, 659-661. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,719)**

5.2.3.7. **Stenzel T.*,** Pestka D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A., Bancerz-Kisiel A.: Detection of *Bordetella avium* by TaqMan real-time PCR in tracheal swabs from wildlife birds. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2017, 20, 31-36.

(MNiSW 20 pkt; IF 0,719)

* *Autor korespondencyjny*

5.2.4. Pozostałe prace oryginalne i przeglądowe

W ostatnim czasie przeprowadziłem również badania dotyczące lekooporności bakterii występujących u gołębi domowych. Specyfika chowu tych ptaków sprawia, że opieka lekarsko-weterynaryjna nad ich stadami jest stosunkowo trudna, a hodowcy gołębi bardzo często podejmują próby leczenia ich na własną rękę. Nieumiejętne leczenie może nieść za sobą wiele konsekwencji, z których jedną jest lekooporność szczepów bakterii. W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano, że brak wrażliwości na antybiotyki jest powszechnym zjawiskiem wśród bakterii izolowanych od gołębi domowych. Najmniejszą skutecznością wobec *Escherichia (E.) coli* charakteryzowały się tetracykliny oraz amoksycylina, z kolei w przypadku gronkowców - chinolony oraz oksytetracyklina. Dodatkowo, około 5% gronkowców było opornych na metycylinę, co stanowi pewne

zagrożenie zdrowia publicznego, ponieważ istnieje ryzyko obustronnej transmisji (gołąb-człowiek/ człowiek-gołąb) tych bakterii. Najmniejszą lekoopornością charakteryzowały sie izolaty *Salmonella* Typhimurium, z których tylko nieliczne były niewrażliwe na kolistynę oraz neomycynę (praca 5.2.4.1.).

Uczestniczyłem także w badaniach poświęconych wykrywaniu *Yersinia* (*Y.) enterocolitica* u ptaków wolno żyjących (praca 5.2.4.2). Ponadto brałem aktywny udział w rozpoznaniu i opisaniu przypadku nowotworu u młodego gołębia pocztowego (praca 5.2.4.3), a także zgłębiłem wiedzę literaturową dotyczącą PPMV-1 oraz problemów kostnienia u drobiu, co zaowocowało współautorstwem w dwóch pracach przeglądowych (prace 5.2.4.3 i 5.2.4.4).

Efektem tej aktywności są następujące publikacje:

5.2.4.1. **Stenzel T.***, Bancerz-Kisiel A., Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D., Koncicki A.: Antimicrobial resistance in bacteria isolated from pigeons in Poland. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2014, 17, 169-171. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,604)**

5.2.4.2. Bancerz-Kisiel A., Szczerba Turek A., Lipczyńska K. **Stenzel T.** Szweda W.: Bioserotypes and virulence markers of Yersinia enterocolitica strains isolated from mallards (Anas platyrhynchos) and pheasants (Phasianus colchicus). Journal of Food Protection, 2012, 75, 2219-2222. **(MNiSW 30 pkt; IF 1,832)**

5.2.4.3. Szweda M., **Stenzel T.**, Paździor K., Kołodziejska A., Męcik-Kronenberg T.: Hepatocellular adenocarcinoma in racing pigeon. Medycyna Weterynaryjna, 2011, 67, 422-425. **(MNiSW 9 pkt; IF -)**

5.2.4.4. Pestka D., **Stenzel T.**, Koncicki A.: Occurrence, characteristics and control of pigeon paramyxovirus type 1 in pigeons. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2014, 17, 2, 379-384. **(MNiSW 20 pkt; IF 0,604)**

5.2.4.5. Tykałowski B., **Stenzel T.,** Koncicki A: Selected problems related to ossification processes and their disorders in birds. Medycyna Weterynaryjna, 2010, 66, 469-475. **(MNiSW 13 pkt; IF -)**

** Autor korespondencyjny*

6. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego (dotyczy tylko publikacji pełnotekstowych)

6.1. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego uwzględniające rodzaj publikacji, listę MNiSW oraz współczynnik wpływu (IF)

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	Punktacja MNiSW	IF
Prace oryginalne w czasopismach z listy JCR (lista „A" MNiSW) ***(w tym wykorzystane w postępowaniu habilitacyjnym)***	**27** ***(5)***	**578** ***(160)***	**22,524** ***(8,989)***
Prace oryginalne w czasopismach z listy „B" MNiSW **(tj. czasopisma bez naliczonego IF)**	**6**	**68**	**-**
Prace przeglądowe w czasopismach z listy JCR (lista „A" MNiSW)	**4**	**70**	**2,204**
Prace przeglądowe w czasopismach z listy „B" MNiSW **(tj. czasopisma bez naliczonego IF)**	**3**	**38**	**-**
Łącznie	**40**	**754**	**24,728**

6.2. Zestawienie liczbowe i procentowe dorobku naukowego w kontekście pierwszego (wyłącznego) autorstwa oraz współautorstwa

	Liczba publikacji		Punktacja MNiSW		IF	
	Suma	**Odsetek**	**Suma**	**Odsetek**	**Suma**	**Odsetek**
Publikacje oryginalne*						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	**15**	**45,45%**	**309**	**47,83%**	**12,23**	**54,29%**
Pozostałe publikacje	**18**	**54,55%**	**337**	**52,17%**	**10,294**	**45,71%**
Publikacje przeglądowe**						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	**1**	**14,28%**	**10**	**9,25%**	**0,465**	**21,09%**
Pozostałe publikacje	**6**	**85,72%**	**98**	**90,75%**	**1,739**	**78,91%**
Łącznie***						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	**16**	**40,00%**	**319**	**42,30%**	**12,695**	**51,33%**
Pozostałe publikacje	**24**	**60,00%**	**435**	**57,70%**	**12,033**	**48,67%**

- Punktację MNiSW podano według komunikatu MNiSW obowiązującego dla roku publikacji.
- Współczynnik wpływu (IF) podano dla roku, w którym opublikowano pracę. Dla artykułów opublikowanych w latach 2016 i 2017 podano ostatni ustalony IF, tj. dla roku 2015.
- Wartość procentowa odnosi się do całkowitej wartości poszczególnych parametrów dotyczących albo artykułów oryginalnych*, albo przeglądowych**, bądź też wszystkich publikacji***.

7. Pozostałe dane bibliograficzne

Liczba cytowań według bazy Web of Science: **91**

Liczba cytowań według bazy Scopus: **125**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **5**

Indeks Hirscha według bazy Scopus: **7**

W moim dorobku naukowym znajduje się również 57 doniesień konferencyjnych, z czego w 21 przypadkach jestem pierwszym autorem. Doniesienia te były prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w formie prezentacji ustnych lub plakatu. Szczegółowe dane na ich temat znajdują się w Załączniku nr 3 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. W powyższym załączniku znajduje się również wyszczególnienie 91 sekwencji nukleotydowych będących wzorami użytkowymi chronionymi prawem, umieszczonymi w bazie GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI), których jestem autorem. Parametry dorobku naukowego, udział w projektach krajowych i międzynarodowych, otrzymane nagrody oraz pozostałe osiągnięcia naukowe opisano szczegółowo w Załączniku nr 3 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. Informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki zamieszczono w Załączniku nr 4 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

14. 02. 2016

Tomasz Stenzel