

**Rada Naukowa Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego
w Olsztynie, ul. M. Oczapowskiego 14,
10-719 Olsztyn**

(nazwa i dane adresowe podmiotu
habilitującego, wybranego do przeprowadzenia
postępowania)

za pośrednictwem:

Rady Doskonałości Naukowej

pl. Defilad 1

00-901 Warszawa

(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Bartłomiej Tykałowski

(imię i nazwisko wnioskodawcy)

**Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej
(miejsce pracy/jednostka naukowa)**

Wniosek

z dnia 27.08.2023 r.

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie **Nauk Weterynaryjnych** w dyscyplinie¹ **Weterynaria**

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora
habilitowanego.

Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b
Ustawy pod wspólnym tytułem:

**„Ocena wpływu czynników zakaźnych i niezakaźnych na wybrane parametry
humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u drobiu grzebiącego
oraz możliwości wykorzystania naturalnych i syntetycznych składników diety do
poprawy funkcjonowania ich układu odpornościowego”**

Wniosuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie
wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała
uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu ~~tajnym~~/jawnym²

Zostałem poinformowany, że:

*Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w
sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej
z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).*

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu.

Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c)

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Edukacji i Nauki z dnia 11 października 2022 r. w
sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych (Dz. U. z 2022 r. poz. 2202).

² Niepotrzebne skreślić.

Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

Bartłomiej Iyhera/s/n
.....
(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

A. Dokumentacja do wniosku w sprawie nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego zawierająca:

1. Wniosek przewodni
2. Dane wnioskodawcy
3. Kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia naukowego doktora
4. Autoreferat przedstawiający opis kariery zawodowej oraz istotnej aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej wraz z kopiami dokumentów potwierdzającymi określone osiągnięcia, w szczególności dotyczących staży naukowych, grantów, publikacji powstałych w wyniku prowadzenia badań w więcej niż jednej jednostce naukowej
5. Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
6. Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz oświadczenia współautorów
7. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego
8. Kopie dokumentów potwierdzających współpracę naukową i publikacje będące jej efektem
9. Kopie dokumentów potwierdzających kierownictwo lub udział w projektach badawczych
10. Kopie dokumentów potwierdzających uzyskanie tytułu specjalisty, odbytych staży, ukończonych kursów i szkoleń w krajowych i zagranicznych jednostkach
11. Kopie dokumentów potwierdzających otrzymanie stypendiów, nagród i wyróżnień za działalność naukową, organizacyjną oraz inne aktywności

B. Skany dokumentacji na nośniku danych – pendrive

Autoreferat

dr n. wet. Bartłomiej Tykałowski

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2023

1. Imię i nazwisko

Bartłomiej Tykałowski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2012 **Stopień naukowy:** doktor nauk weterynaryjnych w zakresie chorób drobiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Wpływ methizoprinolu i β -glukanów na wybrane parametry odporności nieswoistej oraz na przebieg zakażenia adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV) u indyków”*

2007 **Tytuł:** lekarza weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

01.01.2015 do chwili obecnej Adiunkt, Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

01.10.2012 - 31.12.2014 Adiunkt, Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

01.06.2011 – 30.09.2012 Asystent (pełny etat), Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

15.10.2008 – 31.05.2011 Asystent (1/2 etatu) Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

01.10.2007 – 06.07.2012 Doktorant, Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1. Osiągnięcie stanowi cykl pięciu publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Ocena wpływu czynników zakaźnych i niezakaźnych na wybrane parametry humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u drobiu grzebiącego oraz możliwości wykorzystania naturalnych i syntetycznych składników diety do poprawy funkcjonowania ich układu odpornościowego”

Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego cyklu:

4.1.1. 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 (2), 255-262.

MNiSW₂₀₁₄ =20, IF₂₀₁₄ =0,604

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu 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. Tykałowski B.*, Śmiałek M., Koncicki A., Ognik K., Zduńczyk Z., Jankowski J. *The immune response of young turkeys to haemorrhagic enteritis virus infection at different levels and sources of methionine in the diet*. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1):387.

MNiSW₂₀₁₉ =140, IF₂₀₁₉ =1,835

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

**autor korespondencyjny*

4.1.3. Tykałowski B. *, Śmiałek M., Kowalczyk J., Dziewulska D., Stenzel T., Koncicki A. *Phytoncides in the prevention and therapy of blackhead disease and their effect on the turkey immune system.* Journal of Veterinary Research, 2021, 65 (1), 79-85.

MEiN₂₀₂₁ =140, IF₂₀₂₁ =2,058

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

**autor korespondencyjny*

4.1.4. Tykałowski B. *, Koncicki A. *Immunomodulacja jako narzędzie ograniczające antybiotykoterapię w intensywnym chowie drobiu.* Medycyna Weterynaryjna, 2022, 78 (8), 369-375.

MEiN₂₀₂₂ =70, IF₂₀₂₂ =0,398

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: dokonaniu przeglądu dostępnej literatury naukowej, doborze materiałów wykorzystanych podczas opracowywania pracy przeglądowej, przygotowaniu manuskryptu. Ponad 15% cytowanego w artykule piśmiennictwa to opublikowane wcześniej wyniki badań własnych, których jestem autorem lub współautorem. Mój udział procentowy szacuję na 95%.

**autor korespondencyjny*

4.1.5. Tykałowski B. *, Koncicki A., Kowalczyk J., Śmiałek M., Bakula T., Murawska D., Sobotka W., Stenzel T. *The impact of full-fat Hermetia illucens larvae meal on the health and immune system function of broiler chickens.* Journal of Veterinary Research, 2023, 67 (2), 197-207.

MEiN₂₀₂₃ =140, IF₂₀₂₃ =2,058

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu

i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

**autor korespondencyjny*

Łączna punktacja pięciu prac, wchodzących w skład cyklu publikacji powiązanych tematycznie, zgodnie z załączoną analizą bibliometryczną dorobku naukowego wynosi **510 punktów MNiSW/MEiN**. Sumaryczny współczynnik wpływu **IF=6,953**.

Publikacja 4.1.2 powstała jako efekt badań finansowanych przez NCN w ramach projektu badawczego nr 2013/11/B/NZ9/02496 pt. „*Możliwości wykorzystania metioniny jako żywieniowego czynnika kształtującego potencjał antyoksydacyjny i stymulującego funkcje systemu immunologicznego indyków*”, w którym byłem wykonawcą.

Publikacja 4.1.5 powstała jako efekt badań finansowanych przez NCBiR w ramach projektu badawczego nr GOSPOSTRATEG1/385141/16/NCBR/2018 pt. „*Opracowanie strategii wykorzystania alternatywnych źródeł białka owadów w żywieniu zwierząt umożliwiającej rozwój jego produkcji na terytorium RP*”, w którym byłem wykonawcą.

4.2. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.2.1. Wprowadzenie i cel badań

Układ immunologiczny drobiu utrzymywanego na fermach wielkotowarowych jest narażony na szereg czynników wpływających bezpośrednio lub pośrednio na jego funkcjonowanie. W zależności od rodzaju czynnika (np. zakaźny lub niezakaźny) patomechanizm jego oddziaływania będzie różny, lecz skutkiem może być przejściowe lub trwałe upośledzenie humoralnych i/lub komórkowych mechanizmów obronnych organizmu czyli stan immunosupresji. Wraz z układami nerwowym i dokrewnym układ immunologiczny jest odpowiedzialny za koordynację i utrzymanie homeostazy organizmu oraz reagowanie na bodźce egzo- i endogenne (44).

Intensyfikacja produkcji drobiu mięsnego, w szczególności indyków i kurcząt brojlerów, na tak szeroką skalę, jaką obserwujemy aktualnie, nie byłaby możliwa, gdyby nie prowadzone prace hodowlane i genetyczne mające na celu doskonalenie

użytkowe istniejących linii i ras. Prace te mają na celu przede wszystkim zwiększenie i przyspieszenie przyrostów masy ciała, w tym głównie tkanki mięśniowej, przy jednoczesnym zmniejszeniu zużycia paszy na 1 kg przyrostu. Niestety tak wysoką wydajność produkcyjną u kurcząt brojlerów i indyków rzeźnych uzyskano kosztem obniżenia ich wrodzonej odporności (31, 37). Przejawia się to wzrostem podatności na różnego rodzaju choroby (inwazyjne, zakaźne i metaboliczne) oraz pogorszeniem poziomu protekcji po szczepieniach profilaktycznych (45). Stan ten potęgowany jest bardzo często oddziaływaniem immunosupresorów zakaźnych i niezakaźnych, np. związanych z warunkami chowu wielkotowarowego (wysokie stężenie amoniaku, duże dobowe wahania temperatury) oraz jakością i składem skarmianych mieszanek paszowych. Stosowane obecnie wysoko przetworzone pasze pełnoporcjowe produkowane wyłącznie z drobno rozdrobnionych komponentów także nie są obojętne dla zdrowia i prawidłowego rozwoju szybko rosnących ptaków. Brak strukturalnych elementów w mieszankach paszowych, nawet tych granulowanych, prowadzi często do rozszerzenia żołądka gruczołowego, zaburzenia rozwoju i funkcji żołądka mięśniowego oraz do przyspieszenia pasażu treści do dalszych odcinków przewodu pokarmowego (54). To z kolei wpływa na cały proces trawienia i przyswajania składników odżywczych, a co za tym idzie na cały organizm ptaka. Może także przyczyniać się do nieprawidłowego funkcjonowania lokalnych mechanizmów obronnych przewodu pokarmowego oraz zmniejszać integralności błony śluzowej jelit, predysponując do rozwoju schorzeń przebiegających zwykle subklinicznie (np. kokcydioza, nekrotyczne zapalenie jelit) w początkowej fazie choroby (1, 25). Czas przebywania pokarmu w żołądkach u drobiu jest głównym czynnikiem wpływającym na efektywność trawienia (41). Wysokie spożycie granulowanej paszy może mieć szczególnie szkodliwy wpływ w przypadku braku w niej strukturalnych składników, przy słabo rozwiniętym żołądku mięśniowym. Miliony lat ewolucji ptaków, budowy ich przewodu pokarmowego i jego fizjologii oraz sposób naturalnego odżywiania nie nadążają za gwałtownymi zmianami w sposobie żywienia narzuconymi w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat przez człowieka. Rosnąca liczba czynników negatywnie oddziałująca na status immunologiczny ptaków utrzymywanych systemem wielkotowarowym przekłada się na częstotliwość występowania u nich problemów zdrowotnych. To z kolei pociąga za sobą konieczność leczenia tych zwierząt, zwykle z użyciem antybiotyków, co przyczynia się do wzrostu liczby patogenów lekoopornych w środowisku. Stąd obserwujemy od jakiegoś czasu trend polegający na zmianach

podejścia do żywienia zwierząt gospodarskich oraz ich leczenia. Szereg czynników natury medycznej oraz społeczno-ekonomicznych zmusza nas do poszukiwania nowych rozwiązań żywieniowych oraz terapeutycznych. Jednymi z poważnych wyzwań współczesnego świata jest konieczność wdrażania alternatywnych źródeł białka w żywieniu zwierząt i człowieka oraz poszukiwanie substancji pochodzenia naturalnego zdolnych do wspomaganie swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych i/lub do leczenia zakażeń wywołanych przez patogeny odporne na komercyjne chemioterapeutyki. Alternatywne źródła białek, jak np. białka owadzie, nie są już tylko futurystycznym marzeniem, lecz stały się w ostatnich latach rzeczywistością. W zależności od gatunku owada, z którego pozyskuje się białko, jego formy rozwojowej (np. larwa) oraz ostatecznego składu i wartości odżywczych, tzw. mączki owadziej oddziaływanie na organizm żywionych tym produktem zwierząt może diametralnie się różnić. Potrzeba jeszcze wielu badań aby móc całkowicie zastąpić białko sojowe, czy tłuszcze roślinne komponentami owadzimi. Poza samą procentową zawartością białka w paszach bardziej liczy się udział i wzajemne proporcje poszczególnych aminokwasów, zwłaszcza aminokwasów egzogennych. Wiele z nich nie tylko limituje możliwości wykorzystania białek paszy do budowy np. tkanki mięśniowej, ale mają bezpośredni wpływ na mechanizmy odpowiedzi przeciwzakaźnej organizmu. Zapotrzebowanie drobiu na poszczególne aminokwasy egzogenne jest diametralnie różne z przebiegu chorób zakaźnych i inwazyjnych w porównaniu do ptaków zdrowych (35).

Stopniowe choć nieuniknione zmiany obserwujemy także w podejściu do terapii chorób drobiu, gdzie zamiast syntetycznych chemioterapeutyków, antybiotyków, histomonostatyków i kokcydiostatyków stosowane są preparaty zawierające naturalne fitoncydy i fitoaleksyny ekstrahowane z różnych gatunków roślin. Jeszcze kilkadziesiąt lat temu drób miał w większości naturalny dostęp do licznych gatunków roślin łąkowych. W warunkach przydomowego chowu gospodarskiego zwierzęta same pobierały potrzebne im związki fitogeniczne we właściwych ilościach i odpowiednich proporcjach instynktownie wybierając i zjadając konkretne gatunki roślin w przebiegu różnych chorób (43). Przyczyn trwających obecnie zmian w podejściu do chowu, żywienia i terapii zwierząt gospodarskich jest wiele. Obejmują one między innymi rosnącą liczbę ludności świata i ciągły wzrost spożycia mięsa przy jednoczesnym spadku możliwości jego produkcji. Rośnie także świadomość społeczna w zakresie ekologii i zrównoważonej gospodarki żywnościowej oraz zmieniają się nawyki

żywieniowe ludzi w krajach wysokorozwiniętych. Z roku na rok obserwujemy także narastający problem patogenów lekoopornych, w tym wielolekoopornych bakterii chorobotwórczych niebezpiecznych zarówno dla zwierząt, jak i człowieka. Problem wielolekooporności ma niestety zasięg globalny. Ponadto z przeprowadzonych badań wynika, że nawet antybiotyki uznane za skuteczne mogą wykazywać ograniczoną efektywność, jeżeli mechanizmy obronne gospodarza nie są wystarczająco sprawne. Stwierdzenie to przemawia za celowością poszukiwania takich metod postępowania, ale i substancji, które obok działania bakteriobójczego i bakteriostatycznego działałyby równocześnie stymulująco na układ immunologiczny. Uwzględniając aspekt praktyczny należy kontynuować badania substancji przeciwdrobnoustrojowych, które łączyłyby działanie lecznicze z aktywizacją układu odpornościowego w kierunku zwiększania sprawności mechanizmów przeciwwakażnej odporności wrodzonej i nabytej. Przyszłością wydaje się także szeroko pojęta immunomodulacja. W postępowaniu klinicznym od lat wykorzystuje się wiele substancji (immunomodulatorów) i procedur ingerujących w mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Najogólniej immunomodulacja odnosi się do metod i środków pozwalających wpływać na funkcję układu odpornościowego, czyli modyfikować jego stan i aktywność. Postępowanie to obejmuje wszystkie substancje stymulujące lub hamujące komórkowe i humoralne mechanizmy obronne organizmu. Jak wynika z powyższego stwierdzenia, efekt stosowania środka immunomodulującego może przybierać charakter immunostymulacji lub osłabiania odpowiedzi immunologicznej. Niektóre związki działają zarówno stymulująco, jak i hamująco na odpowiedź immunologiczną, co zależy, między innymi, od ich dawki, schematu stosowania, drogi podania, stanu zdrowotnego czy gatunku ptaka. Z tego też względu niektóre z immunomodulatorów nie będą *sensu stricto* stymulowały mechanizmów immunologicznych, lecz przywracały ich osłabioną reaktywność do normy. Środki immunostymulujące są stosowane zarówno wtedy, gdy układ odpornościowy działa prawidłowo, np. w immunoprofilaktyce swoistej jako adiuwanty w celu wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej na podany antygen szczepionkowy (48, 58), jak i w stanach osłabienia określonej jego funkcji, np. u ptaków zakażonych immunosupresyjnymi patogenami. Do takich patogenów należy niewątpliwie adenowirus krwotocznego zapalenia jelit (HEV). Zakażenia tym wirusem są szeroko rozpowszechnione w stadach indyków w naszym kraju i na świecie. Następstwem najczęściej bezobjawowej infekcji tym wirusem jest poważne upośledzenie funkcji

układu immunologicznego (55). Wywołanie stanu immunosupresji u indyków ma ogromne znaczenie praktyczne, czego wyrazem jest coraz rzadsze występowanie klasycznych jednostek chorobowych u tych ptaków a coraz częstsze pojawianie się zespołów chorobowych, będących wypadkową interakcji pomiędzy różnymi czynnikami zakaźnymi i niezakaźnymi. Ponieważ obraz kliniczny w takich przypadkach jest najczęściej wynikiem wtórnych zakażeń bakteryjnych (*Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium*), podjęte leczenie nie może być z oczywistych względów skuteczne, gdyż nie likwiduje czynnika pierwotnego. W takim przypadku wskazane byłoby zastosowanie immunomodulatorów w celu przywrócenia prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego zakażonego ptaka i pobudzenie mechanizmów odporności przeciwzakaźnej, np. syntezy interferonu.

Równoległe do obserwowanego ogromnego postępu w chowie i hodowli drobiu jesteśmy także świadkami dynamicznego rozwoju nowatorskich metod badawczych i diagnostycznych. Komercyjny dostęp do znakowanych fluorochromami przeciwciał rozpoznających swoiście różne receptory i molekuly na powierzchni i wewnątrz komórek immunokompetentnych u ptaków, umożliwiło zastosowanie cytometrii przepływowej do określenia zmian ilościowych i jakościowych wielu populacji komórek, w tym licznych subpopulacji limfocytów we krwi i w narządach podczas toczącego się procesu chorobowego (32). Metoda ta pozwala również oceniać stan funkcjonalny (pobudzenie, supresję, apoptozę czy nekrozę) różnych subpopulacji komórek w odpowiedzi na zastosowane w badaniach szczepionki, patogeny, leki, suplementy diety czy środki immunomodulujące. Obok tradycyjnej, stosowanej od bardzo dawna w diagnostyce metody immunoenzymatycznej (ELISA), cytometria przepływowa pozwala na szeroką ocenę stanu i funkcji komórek układu immunologicznego badanych ptaków. Niejednokrotnie bowiem w przebiegu różnych chorób, w tym w przebiegu krwotocznego zapalenia jelit u indyków, dochodzić może do zaburzeń w obrębie mechanizmów odporności komórkowej przy nieznacznym wpływie tego wirusa na wskaźniki odporności humoralnej jak miano przeciwciał poszczepiennych. Liczba publikacji zawierających wyniki badań cytometrycznych u drobiu, głównie u gatunku *Gallus gallus domesticus*, w ciągu ostatnich dziesięciu lat wzrosła o blisko 30 % w porównaniu do poprzedniego dziesięciolecia (dane PubMed).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu szerokiej grupy czynników (żywieniowych, fitogenicznych i zakaźnych) na wybrane wskaźniki

odporności humoralnej i komórkowej u drobiu grzebiącego. Kolejnym celem było opracowanie metod i wdrożenie cytometrii przepływowej do określania różnych parametrów komórkowej odpowiedzi immunologicznej u ptaków, szczególnie u indyków, gdyż mechanizmy obronne u tego gatunku nadal nie są tak szeroko poznane jak u kur. Przeprowadzone doświadczenia miały także na celu określenie możliwości wykorzystania naturalnych i syntetycznych składników diety, o potencjalnym oddziaływaniu immunomodulacyjnym, do poprawy funkcjonowania układu odpornościowego ptaków oraz użycia naturalnych fitoncydów w profilaktyce i terapii histomonozы, dla której od kilku lat nie ma dostępnej żadnej alternatywnej (w świetle obowiązującego prawa) metody postępowania.

Wyniki badań, które realizowano z zastosowaniem metod opisanych poniżej, opublikowano w czterech pracach oryginalnych (4.1.1., 4.1.2., 4.1.3 i 4.1.5) i jednej pracy przeglądowej (4.1.4.).

4.2.1.1. Materiał i metody

4.2.1.2. Zwierzęta doświadczalne (dane ogólne) oraz podział na eksperymenty

Badania w warunkach laboratoryjnych przeprowadzono łącznie na 549 indykach rzeźnych i 384 brojlerach kurzych, natomiast doświadczenie w stadzie indyków rodzicielskich przeprowadzono na komercyjnej fermie reprodukcyjnej, gdzie utrzymywano 9339 ptaków. Wykonane doświadczenia wchodziły w skład pięciu eksperymentów (Tab. 1) i były prowadzone za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie. Szczegółowe układy doświadczalne wraz z podziałem ptaków na grupy opisano w punkcie 4.2.2.2.

Tab. 1. Wykaz eksperymentów, których wyniki opublikowano w artykułach wchodzących w skład zgłaszanego cyklu publikacji.

Eksperyment	Tytuł
A	Wpływ żywienia indyków rzeźnych paszą z dodatkiem całych ziaren pszenicy na wybrane wskaźniki immunologiczne.
B	Wpływ różnych poziomów i źródeł metioniny w paszy na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej u klinicznie zdrowych indyków oraz zakażonych wirusem krwotocznego zapalenia jelit.
C	Badanie skuteczności fitoncydów w terapii i zapobieganiu histomonozы u indyków reprodukcyjnych.
D	Wpływ fitoncydów na wybrane wskaźniki immunologiczne u indyków rzeźnych.
E	Badanie wpływu pełnotłustej mączki z larw muchy czarnej (<i>Hermetia illucens</i>) na zdrowotność i wybrane wskaźniki immunologiczne u kurcząt brojlerów.

4.2.1.3. Układ doświadczalny, pobrany materiał, kierunki badań i metody analizy statystycznej

Eksperyment A

„Wpływ żywienia indyków rzeźnych paszą z dodatkiem całych ziaren pszenicy na wybrane wskaźniki immunologiczne”

Badania przeprowadzono na 210 indorach rzeźnych Hybrid Converter zakupionych w komercyjnym zakładzie wylęgowym Grelavi S.A. (Kętrzyn, Polska). Ptaki 1-dniowe podzielono losowo na trzy równe grupy (W_0 , W_{50} , W_{100}), każda w siedmiu powtórzeniach, po 10 sztuk na powtórzenie. Indyki z każdego powtórzenia przez cały okres doświadczenia utrzymywano w izolowanych kojcach na pellecie ze słomy, przy stałym dostępie do wody i paszy. Warunki utrzymania i program świetlny były zgodne z zaleceniami producenta piskląt Hybrid Turkeys (Hendrix Genetics, Kanada). Przez pierwsze cztery tygodnie wszystkie indyki doświadczalne otrzymywały identyczną mieszankę paszową bez dodatku całych ziaren pszenicy. Od 5. do 12. tygodnia życia indyki z grupy W_0 otrzymywały paszę zawierającą pszenicę w formie rozdrobnionej. Natomiast ptaki z grup W_{50} otrzymywały paszę zawierającą pszenicę w formach rozdrobnionej i całych ziaren w proporcji 50:50. Indyki z grupy W_{100} otrzymywały w tym czasie mieszankę paszową zawierającą pszenicę wyłącznie w postaci całych ziaren. W celu uzyskania pszenicy rozdrobnionej, ziarno zostało zmielone za pomocą młyna młotkowego. Średnica i długość granulek pszenicy wynosiły odpowiednio 4 mm i około 2-3 mm dla indyków 5-8 tyg. i około 4 mm dla indyków 9-12 tyg. Dla indyków wszystkich grup wykorzystano ziarno pszenicy pochodzące z jednej partii. Indyki zostały zaszczepione przeciwko wirusowi rzekomego pomoru drobiu (ND) w 20 dniu życia oraz zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy (TRT) w 1. (zakład wylęgowy) i 30. dniu życia, szczepionkami żywymi atenuowanymi Nobilis ND Clone 30 (Merck, USA) i Poulvac TRT (Zoetis, USA). W 12. tyg. życia pobierano krew do badań serologicznych ($n=23$ /grupę) i cytometrycznych ($n=7$ /grupę). W surowicy oznaczano miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko wirusom ND i TRT. Po uboju natomiast pobierano migdałki jelit ślepych (CT) oraz końcowy odcinek jelita biodrowego o długości 10 cm do badań cytometrycznych. Z krwi pełnej oraz z CT i z błony śluzowej jelit ślepych wyizolowano komórki mononuklearne w celu oznaczenia odsetka subpopulacji

limfocytów T CD4⁺, CD8α⁺ i CD4⁺CD8α⁺. Szczegółowa metodyka badań została opisana w podrozdziale 4.2.2.3. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w środowisku oprogramowania Statistica 10.0 (StatSoft Inc., USA). Wyniki zostały wyrażone jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD) wraz z błędem standardowym średniej (SEM). Po przeprowadzeniu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, wyniki poddawano analizie post-hoc testem Newmana-Keulsa. Różnice między wynikami zostały uznane za statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$.

Eksperyment B

„Wpływ różnych poziomów i źródeł metioniny w paszy na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej u klinicznie zdrowych indyków oraz zakażonych wirusem krwotocznego zapalenia jelit”

Badania przeprowadzono na 240 indyczkach rzeźnych Hybrid Converter zakupionych w komercyjnym zakładzie wylęgowym Grelavi S.A. (Kętrzyn, Polska). Ptaki 1-dniowe podzielono losowo na cztery grupy żywieniowe (DLM_L, MHA_L, DLM_H i MHA_H), po dwa powtórzenia na grupę (0-DLM_L i HE-DLM_L; 0-MHA_L i HE-MHA_L; 0-DLM_H i HE-DLM_H; 0-MHA_H i HE-MHA_H). W każdym powtórzeniu było po 30 indyczek. Ptaki były utrzymywane w izolowanych boksach Pawilonu Zakażeń Eksperymentalnych Ptaków klasy biobezpieczeństwa BSL-3, na słomianym pellicie przy stałym dostępie do wody i paszy. Warunki utrzymania i program świetlny były zgodne z zaleceniami producenta piskląt Hybrid Turkeys (Hendrix Genetics, Kanada). Indyki z grup DLM_L i DLM_H otrzymywały mieszanki paszowe zawierające DL-metioninę (DLM) w dawce zalecanej przez NRC (36) (grupa DLM_L) i w dawce o 40 % wyższej (grupa DLM_H). Z kolei ptaki z grup MHA_L i MHA_H otrzymywały mieszanki paszowe zawierające wapnia-2-hydroksy-4-metylo-tio-maślan, czyli sól wapniową hydroksyanalogu metioniny (MHA), w dawce zalecanej przez NRC w grupie MHA_L i w dawce o 40 % wyższej (grupa MHA_H). Doświadczenie było podzielone na dwa okresy żywieniowe, od 1. do 4. tyg. i od 5. do 8. tyg. życia. Zawartość DLM lub MHA w przeliczeniu na metioninę w pierwszym okresie wynosiła 0,55 (grupy DLM_L i MHA_L) lub 0,78 % (grupy DLM_H i MHA_H), natomiast w drugim okresie, odpowiednio 0,45 i 0,65 %. W 10. dniu życia wszystkie ptaki zaszczepiono przeciwko ND szczepionką żywą atenuowaną Nobilis ND Clone 30 (Merck, USA) a w 28. i 49. dniu przeciwko ornitobakteriozie szczepionką inaktywowaną Ornitin (ABIC, Izrael). W 42.

dniu życia indyki z powtórzeń HE-DLM_L, HE-MHA_L, HE-DLM_H i HE-MHA_H zakażono krajowym izolatem wirusa krwotocznego zapalenia jelit (HEV), podając 1 ml zawiesiny zawierającej HEV w dawce $10^{4.3}EID_{50}$, wprowadzonej za pomocą sondy do wola. Zawiesinę przygotowano metodą opisaną przez Koncickiego (27). Ptaki z powtórzeń 0-DLM_L, 0-MHA_L, 0-DLM_H i 0-MHA_H stanowiły niezakażoną kontrolę. W 47 dniu życia od 7 ptaków z każdego powtórzenia pobierano krew do badań cytometrycznych i serologicznych, a następnie te ptaki poddano humanitarnej eutanazji w aparacie UNO Euthanasia Unit (UNOBV, Holandia) i pobierano od nich migdałki jelit ślepych (CT) oraz śledzionę do badań cytometrycznych. Z krwi pełnej oraz z CT i śledziony wyizolowano komórki mononuklearne w celu oznaczenia odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, CD8α⁺, CD4⁺CD8α⁺ i limfocytów B IgM⁺ oraz odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących interleukinę 6 (IL-6), po stymulacji mitogenami w warunkach *in vitro*. W osoczu krwi oznaczano ogólny poziom immunoglobulin klasy A (IgA) oraz IL-6. W 56 dniu życia, od 23 ptaków z powtórzenia, pobrano krew do badań serologicznych. W surowicy oznaczano miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko wirusom ND i ORT. Szczegółowa metodyka badań została opisana w podrozdziale 4.2.2.3. Uzyskane wyniki poddano trójczynnikowej analizie wariancji ANOVA w środowisku oprogramowania Statistica 12.0 (StatSoft Inc., USA). Wyniki zostały wyrażone jako wartości średnie wraz z błędem standardowym średniej (SEM). Istotność różnic między średnimi określono testem F oraz testem wielokrotnych rozstępów post-hoc Duncana. Różnice między wynikami zostały uznane za statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$.

Eksperyment C

„Badanie skuteczności fitoncydów w terapii i zapobieganiu histomonozji u indyków reprodukcyjnych”

Badania przeprowadzono na fermie reprodukcyjnej, gdzie utrzymywano 4450 indyczek w odchowalni J-1 i 3870 indyczek oraz 1019 indorów w odchowalni J-2. Budynek J-2 był podzielony liłą ścianą na dwie części – sektor dla samców i dla samic. U 11. tyg. indyczek w odchowalni J-2 stwierdzono kliniczną postać histomonozji, którą potwierdzono badaniami molekularnymi z wykorzystaniem techniki PCR (12). W ciągu kolejnych 7 dni padło 48 indyczek z podobnymi objawami i zmianami sekcyjnymi. Do leczenia chorych indyczek oraz profilaktycznie u zdrowych klinicznie

indorów z tej samej odchowalni i u zdrowych klinicznie indyczek z odchowalni J-1, zastosowano preparat adiCox^{SOL} PF (AdiFeed, Polska), zawierający fitoncydy o działaniu przeciwpierwotniaczym i przeciwbakteryjnym. Preparat zawierał w składzie 52 % ekstraktu z roślin (*Acorus calamus L.*, *Saponaria officinalis L.*, *Sinapis alba L.*, *Piper nigrum L.*); 9,2 % tymolu; 4,6 % kwasu octowego; 0,6 % mleczanu wapnia i 0,2 % dwuoctanu sodu. Ptaki w budynku J-2 otrzymały preparat w dawce 2,5 ml/l w trzech 7-dniowych cyklach z 2-dniową przerwą pomiędzy cyklami. Natomiast indyczki w budynku J-1 otrzymały ten preparat także w trzech 7-dniowych cyklach z tym, że w pierwszym cyklu dawka wynosiła 2,5 ml/l wody, natomiast w dwóch kolejnych 1 ml/l wody. Przerwy pomiędzy cyklami także wynosiły dwa dni. Wszystkie ptaki, które wykazywały objawy chorobowe poddawano eutanazji dwutlenkiem węgla i badano sekcyjnie razem z ptakami padłymi. Od sekcjonowanych osobników pobierano wycinki wątroby i jelit ślepych do badań molekularnych i mikrobiologicznych oraz wycinki serca, śledziony i jelit biodrowych do badań bakteriologicznych i/lub parazytologicznych. Po pierwszym etapie leczenia preparatem zawierającym fitoncydy, wszystkie indyki otrzymały lewamizol w preparacie Levamol 10 % (Vetoquinol Biowet, Polska) przez dwa kolejne dni w dawce 0,3 ml/kg m.c. Po odrobaczeniu ptaki otrzymały przez dwa następne dni probiotyk (Protexin, Probiotics, Anglia) i przez kolejne dwa dni preparat witaminowo - aminokwasowy (Metafisiol, Chemifarma, Polska). Następnie wszystkie indyki w budynku J-2 otrzymały adiCox^{SOL} PF przez 7 dni w dawce 2,5 ml/l wody a w budynku J-1 w dawce 1 ml/l. Do zakończenia okresu odchowu, czyli do 28 tyg. życia wszystkie indyki otrzymywały profilaktycznie adiCox^{SOL} PF w dawce 1 ml/l wody w 7-dniowych cyklach z 3-dniową przerwą pomiędzy cyklami. W 29. tyg. życia ptaki zostały przeniesione z odchowalni do budynków produkcyjnych. Indyczki z odchowalni J-2 przeniesiono do hali produkcyjnej P-1. Natomiast indyczki z odchowalni J-1 przeniesiono po połowie do hal produkcyjnych P-2 i P-3, do których przeniesiono także po połowie indorów z odchowalni J-1. Indory zostały umieszczone w sektorach oddzielonych od samic. Indyczki w hali P-1 do końca okresu nieśnego, czyli do 56. tyg. życia otrzymywały adiCox^{SOL} PF w dawce 1 ml/l wody w 7-dniowych cyklach z 7-dniową przerwą pomiędzy cyklami. Z kolei indyki w halach produkcyjnych P-2 i P-3 do końca okresu nieśnego otrzymywały adiCox^{SOL} PF w dawce 1 ml/l wody w 3-dniowych cyklach z 11-dniową przerwą pomiędzy cyklami. Przez cały okres produkcji nieśnej (od 32. do 56. tyg.) monitorowano liczbę zniesionych jaj na noskę, zapłodnienie jaj, wylęgowość

z jaj nałożonych do inkubacji oraz wskaźnik śmiertelności (upadki + sztuki wybrakowane). Szczegółowa metodyka badań została opisana w podrozdziale 4.2.2.3. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej testem t-Studenta dla prób niezależnych w środowisku programu Statistica 13.1 (StatSoft Inc., USA). Wyniki zostały wyrażone jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Różnice między wynikami zostały uznane za statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$.

Eksperyment D

„Wpływ fitoncydów na wybrane wskaźniki immunologiczne u indyków rzeźnych”

Badania przeprowadzono na 99 indyczkach rzeźnych Hybrid Converter zakupionych w komercyjnym zakładzie wylęgowym Grelavi S.A. (Kętrzyn, Polska). Ptaki 1-dniowe podzielono losowo na sześć grup: A1, A2 i A3 po 10 szt. w każdej (doświadczenie I) oraz B1, B2 i B3 po 23 indyki w grupie (doświadczenie II). Ptaki były utrzymywane w izolowanych boksach klasy biobezpieczeństwa BSL-3, na pellecie ze słomy, przy stałym dostępie do wody i paszy. Warunki utrzymania i program świetlny były zgodne z zaleceniami producenta piskląt Hybrid Turkeys (Hendrix Genetics, Kanada).

Doświadczenie I

„Badanie wpływu różnych dawek fitoncydów na wybrane wskaźniki odporności komórkowej u indyków rzeźnych”

Od 46. dnia życia indyki z grup A2 i A3 otrzymywały z wodą do picia (przez trzy kolejne doby) mieszankę paszową uzupełniającą adiCox^{SOL} PF (AdiFeed, Polska), w dawkach 1 ml/l (grupa A2) lub 3 ml/l grupa A3. Preparat był podawany w wodzie ciąglej. Indyki z grupy A1 stanowiły kontrolę i nie otrzymywały fitoncydów. W 49. dniu życia, 10 godz. od ostatniego pobrania wody z badanym preparatem, pobrano od indyków z każdej grupy krew do badań cytometrycznych (n=7/grupę), a następnie 7 ptaków poddano humanitarnej eutanazji w aparacie UNO Euthanasia Unit (UNOBV, Holandia) i pobierano od nich śledzionę do badań cytometrycznych. Z krwi pełnej oraz z wycinków śledziony wyizolowano komórki mononuklearne w celu oznaczenia odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺, CD8 α ⁺, CD4⁺CD8 α ⁺ i limfocytów B IgM⁺. Szczegółowa metodyka badań została opisana w podrozdziale 4.2.2.3.

Doświadczenie II

„Badanie wpływu fitoncydów na wskaźniki humoralnej odporności poszczepiennej u indyków rzeźnych”

Od 46. dnia życia indyki z grupy B2, a od 49. - indyki z grupy B3 otrzymywały z wodą do picia (przez trzy kolejne doby) badany preparat adiCox^{SOL} PF (AdiFeed, Polska) w dawce 1 ml/l wody ciągłej. Indyki z grupy B1 stanowiły kontrolę i nie otrzymywały fitoncydów. W 49. dobie życia wszystkie indyki zaszczepiono przeciwko ornitobakteriozie szczepionką inaktywowaną Ornitin (ABIC, Izrael), którą podano podskórnie po 0,5 ml na ptaka. W 49. dniu życia (przed szczepieniem) oraz w 70. dniu życia (3 tyg. po szczepieniu) od wszystkich ptaków z każdej grupy (n=23/grupę) pobrano krew do badań serologicznych. W odwirowanej surowicy oznaczano miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Szczegółowa metodyka badań została opisana w podrozdziale 4.2.2.3. Uzyskane w obu doświadczeniach wyniki zostały poddane analizie statystycznej testem t-Studenta dla prób niezależnych w środowisku programu Statistica 13.1 (StatSoft Inc., USA). Wyniki zostały wyrażone jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Różnice między wynikami zostały uznane za statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$.

Eksperyment E

„Badanie wpływu pełnotłustej mączki z larw muchy czarnej (*Hermetia illucens*) na zdrowotność i wybrane wskaźniki immunologiczne u kurcząt brojlerów”

Badania przeprowadzono na 384 kurczętach Ross 308 (samcach), zakupionych w komercyjnym zakładzie wylęgowym Animex Foods Sp. z o.o. (Sokółka, Polska). W wylęgarni kurczęta zostały zaszczepione przeciwko chorobie Mareka szczepionką Cryomarex Rispens+HVT (Boehringer Ing., Niemcy) oraz przeciwko kokcydiozie szczepionką Hipracox (Hipra, Hiszpania). Po przywiezieniu na fermę doświadczalną, pisklęta zaszczepiono przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu (ND) i zakaźnemu zapaleniu oskrzeli (IB), a w 7. dobie życia przeciwko zakażeniom wywołanym przez metapneumowirusy ptasie (aMPV), szczepionkami żywymi atenuowanymi odpowiednio Nobilis Ma5+Clone 30 (Merck, USA) i Poulvac TRT (Zoetis, USA). Ptaki 1-dniowe podzielono losowo na cztery równe grupy (HI-0, HI-50, HI-75 i HI-100), każda w ośmiu powtórzeniach po 12 sztuk. Kurczęta z każdego powtórzenia

przez cały okres doświadczenia utrzymywano w izolowanych kojcach na pellecie ze słomy, przy stałym dostępie do wody i paszy. Warunki utrzymania i program świetlny były zgodne z zaleceniami producenta piskląt (Aviagen, USA). W doświadczeniu zastosowano 3-fazowy program żywienia, na który składały się mieszanki paszowe typu starter (1-14 dzień życia), grower (15-35 dzień życia) i finisher (36-42 dzień życia). W mieszankach paszowych przeznaczonych do żywienia kurcząt z grup HI-50, HI-75 i HI-100 zastąpiono proteiny sojowe - białkiem owadzi z mączki z larw muchy czarnej (HI) w proporcjach 50:50 (grupa HI-50), 25:75 (grupa HI-75) i 0:100 (grupa HI-100). Kurczęta z grupy HI-0 otrzymywały pasze zawierające wyłącznie białko sojowe. Mączkę z larw HI zakupiono w komercyjnym zakładzie produkcyjnym HiProMine S.A. (Robakowo, Polska). Mączka poza białkiem surowym (40,76 % s.m.), zawierała także tłuszcz surowy (29,38 % s.m.), włókno surowe – chitynę (6,65 % s.m.), popiół surowy (6,94 % s.m.), wapń (1,38 % s.m.), sód (0,23 % s.m.) i fosfor całkowity (0,78 % s.m.). Pasze zostały zbilansowane pod względem zawartości składników odżywczych i energii zgodnie z zaleceniami dla tego gatunku i kierunku produkcji (49). Przez cały okres doświadczenia (42 dni) monitorowano wskaźniki produkcyjne (BW, FCR) oraz śmiertelność i liczbę brakowanych kurcząt.

W 21. i 42. dniu życia od kurcząt pobierano krew do badań serologicznych (n=23/grupę), biochemicznych (n=10/grupę), hematologicznych (n=5/grupę) i cytometrycznych (n=8/grupę). Natomiast po uboju, w 42. dniu życia pobierano śledziony (n=8/grupę) do badań cytometrycznych. W surowicy oznaczano miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko NDV, IBV i aMPV metodą ELISA oraz wybrane wskaźniki biochemiczne (ALT, AST, ALP, TP, CK, LDH, CALC, PHOS i UA). Badaniem hematologicznym oznaczono wskaźniki czerwono- i białokrwinkowe (RBC, WBC, Hb, PCV) oraz wykonano leukogram. Z krwi pełnej oraz z wycinków śledziony wyizolowano komórki mononuklearne w celu oznaczenia odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺, CD8α⁺, CD4⁺CD8α⁺ i limfocytów B Bu-1⁺. Szczegółowa metodyka badań została opisana w podrozdziale 4.2.2.3. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta dla prób niezależnych oraz testem post-hoc Tukeya w środowisku programu Statistica 13.1 (StatSoft Inc., USA). Wyniki zostały wyrażone jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD). Różnice między wynikami zostały uznane za statystycznie istotne przy P ≤ 0,05.

4.2.1.4. Materiał i metody badawcze wykorzystane w doświadczeniach do oznaczeń wskaźników immunologicznych

I. Krew pełna

Krew do badań cytometrycznych i/lub hematologicznych pobierano, z żyły skrzydłowej do jałowych probówek z antykoagulantem EDTA K2 i mieszano za pomocą rolkowego mieszadła hematologicznego przez 5 min i wykorzystywano do dalszych badań.

II. Surowica

Surowicę do badań serologicznych i/lub biochemicznych uzyskiwano z krwi pobieranej z żyły skrzydłowej do jałowych probówek, które po pobraniu schładzano w temp. 4°C przez 2 godziny. Następnie próbki wirowano przez 15 min przy 1000g w temp. 4°C. Oddzieloną od elementów morfotycznych surowicę przenoszono za pomocą pipety do jałowych probówek typu Eppendorf i wykorzystywano do dalszych badań.

III. Osocze krwi

Osocze krwi do wybranych badań serologicznych uzyskiwano z krwi pobieranej z żyły skrzydłowej do probówek z heparyną litową i mieszano za pomocą rolkowego mieszadła hematologicznego przez 5 min. Następnie próbki wirowano przez 15 min w temp. 4°C przy 1000g. Oddzieloną od elementów morfotycznych, plazmę krwi przenoszono za pomocą pipety do jałowych probówek i wykorzystywano bezpośrednio do badań biochemicznych.

IV. Komórki mononuklearne

Przedstawioną poniżej metodykę izolacji komórek mononuklearnych z krwi i narządów immunologicznych ptaków opracowałem samodzielnie prowadząc szereg doświadczeń pilotażowych w Katedrze Chorób Ptaków UWM w Olsztynie.

Izolacja komórek mononuklearnych z krwi obwodowej

Po 1,5 ml krwi uprzednio pobranej od każdego ptaka rozcieńczano w stosunku 1:1 jałowym PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma-Aldrich, Niemcy) z dodatkiem 1 % FCS (Fetal Calf Serum, Sigma-Aldrich, Niemcy). Tak przygotowaną krew nawarstwiano na 3 ml gradientu Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Niemcy) i wirowano przy 400g w temp. pokojowej (24-25°C) przez 30 min z wyłączoną funkcją hamowania. Po odwirowaniu delikatnie zbierano warstwę komórek mononuklearnych do jałowych probówek, płukano dwukrotnie buforem PBS z dodatkiem 1 % FCS a następnie zawieszano w 1 ml PBS i wykorzystywano w kolejnych etapów badań.

Izolacja komórek mononuklearnych ze śledziony

Pobrane od badanych ptaków, po uprzedniej eutanazji lub po uboju, wycinki śledziony o masie 0,35-0,40 g poddawano indywidualnej homogenizacji przy pomocy automatycznego homogenizatora do tkanek (TissueLyser II, Qiagen, Niemcy) w 1 ml medium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Niemcy) z dodatkiem 5 % FCS. Po uzyskaniu jednorodnej zawiesiny całość przesączano przez sterylny, nylonowy filtr komórkowy o średnicy oczek 70 µm (BD Falcon, USA). Odsączone resztki tkanek odrzucano, natomiast wyizolowane komórki zawieszano w 3 ml medium RPMI-1640 z dodatkiem 5 % FCS i nawarstwiano na 3 ml jałowego gradientu Histopaque-1077 o temp. 24-25°C, używając 15 ml probówek wirowniczych ze stożkowym dnem (Corning, USA). Próbkę wirowano przy 400g w temp. pokojowej przez 30 min z wyłączoną funkcją hamowania. Po odwirowaniu zbierano delikatnie powstały kożuszek komórek mononuklearnych do jałowych probówek, płukano 2-krotnie buforem PBS z dodatkiem 5 % FCS a następnie zawieszano w 1 ml PBS i przekazywano do kolejnych etapów badań.

Izolacja komórek mononuklearnych z migdałów jelit ślepych

Wypreparowane migdałki jelit ślepych (po 2 szt. od każdego ptaka) rozdrabniano wstępnie skalpelem na szalce Petriego w obecności medium hodowlanego RPMI-1640 z dodatkiem 1 % Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, Niemcy) na 1-2 mm fragmenty. Wstępnie rozdrobnione migdałki umieszczano w 2 ml probówkach typu Eppendorf z 1 ml medium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Niemcy) i dodatkiem 5 % FCS, po czym homogenizowano za pomocą automatycznego homogenizatora do tkanek TissueLyser II (Qiagen, Niemcy). Po uzyskaniu

jednorodnej zawiesiny, całość przesączano przez sterylne sitka komórkowe o średnicy oczek 70 μm (Corning, USA). Odsączone resztki tkanek odrzucano, natomiast wyizolowane komórki płukano dwukrotnie w medium RPMI-1640 z dodatkiem 5 % FCS przez 10 min w 22°C przy 450g. Następnie wypłukane komórki zawieszano w 15 ml 40 % roztworu gradientu Percoll (Sigma-Aldrich, Niemcy) i nawarstwiano je na 15 ml 60 % roztworu tego gradientu i wirowano w 50 ml probówkach wirowniczych ze stożkowym dnem (Corning, USA) przez 20 min w 22°C przy 900g z wyłączonym hamowaniem. Odpowiednie (40 % i 60 %) stężenia procentowe gradientu uzyskano rozcieńczając 100 % Percoll kompletnym medium (CM) składającym się z RPMI-1640 z dodatkiem 10 % FCS, 1 % MEM Non-essential Amino Acids solution, 1 % Penicilin-Streptomycin, 1% HEPES i 1 % Sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, Niemcy). Z kolei 100 % Percoll uzyskiwano po zmieszaniu czystego Percollu z 10-krotnie stężonym Hanks' balanced salt solution (Sigma-Aldrich, Niemcy) w proporcji 9:1 v/v. Po odwirowaniu zbierano delikatnie powstały kożuszek komórek mononuklearnych do jałowych probówek, płukano 2-krotnie buforem PBS z dodatkiem 5 % FCS a następnie zawieszano w 1 ml PBS. Zawiesinę komórek wykorzystywano w kolejnych etapach badań.

Izolacja komórek mononuklearnych z błony śluzowej jelita biodrowego

Końcowe odcinki jelita biodrowego (10 cm długości) rozdrabniano wstępnie skalpelem na szalce Petriego w obecności medium hodowlanego RPMI-1640 z dodatkiem 1 % Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, Niemcy) na 1-2 mm fragmenty i umieszczano w szklanych kolbkach o objętości 100 ml. Do kolbek dodawano po 25 ml wstępnie ogrzanego do 38°C roztworu kolagenazy typu IV (200 U/ml; Sigma-Aldrich, Niemcy) w medium składającym się z RPMI-1640, 1 % Penicilin-Streptomycin, 1 % HEPES (Sigma-Aldrich, Niemcy). Próbkę inkubowano przez 30 min w temp. 38°C na mieszadle (250 RPM). Po trawieniu całość przesączano przez sterylne sitka komórkowe o średnicy oczek 70 μm (BD Falcon, USA). Odsączone resztki tkanek odrzucano, natomiast uwolnione komórki płukano dwukrotnie w medium RPMI-1640 z dodatkiem 5 % FCS przez 10 min w 22°C przy 450g. Następnie z tak przygotowanej zawiesiny komórek izolowano komórki mononuklearne z zastosowaniem gradientu Percoll, taką samą metodą jak w przypadku opisanych wyżej migdałków jelit ślepych.

Liczenie i oznaczanie żywotności limfocytów

W uzyskanej po izolacji mieszaninie komórek mononuklearnych indywidualnie dla każdego ptaka i danego materiału, z którego dokonano izolacji, oznaczano żywotność oraz liczbę limfocytów w 1 ml zawiesiny. W tym celu pobierano 50 µl tej zawiesiny i 10-krotnie rozcieńczano w PBS. Tak przygotowane próbki umieszczano w liczniku komórek Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA). Do badań cytometrycznych pobierano za każdym razem taką objętość zawiesiny, aby zawierała 1×10^6 żywych limfocytów na każdą próbkę w celu uzyskania za każdym razem wiarygodnych i porównywalnych wyników oznaczeń.

V. Cytometria przepływowa

Przedstawioną poniżej metodykę oznaczeń wskaźników immunologicznych, z zastosowaniem cytometrii przepływowej, opracowałem samodzielnie prowadząc szereg doświadczeń pilotażowych w Katedrze Chorób Ptaków UWM w Olsztynie.

Oznaczanie odsetka limfocytów T CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, CD8α⁺, CD4⁺CD8α⁺ we krwi obwodowej i w badanych narządach u indyków

Wyizolowane z krwi i narządów limfocyty barwiono odpowiednimi w danym eksperymencie przeciwciałami monoklonalnymi Mouse Anti Chicken CD4-FITC (klon 2-35) i CD8 (Mouse Anti Chicken CD8A-PE (klon 11-39) oraz (tylko w eksperymencie B) Human Anti-Chicken CD25-AF647 (klon AbD13504) z firmy AbD Serotec obecnie Bio-Rad (Anglia). Do każdej z probówek dodawano zalecaną przez producenta objętość przeciwciał celem wyznakowania danej subpopulacji limfocytów. Próbki inkubowano przez 30 minut w temp. 4°C bez dostępu światła na mieszadle przy 250 RPM. Następnie komórki płukano 2-krotnie w PBS, wirowano przy 250g przez 7 minut a powstałe pellety komórek zawieszano w 400 µl PBS i badano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). Do badanych próbek sporządzono próbki kontrolne niebarwione, pojedynczo barwione i barwione dedykowanymi przez producenta przeciwciałami, stanowiącymi kontrolę izotypową do użytych przeciwciał pierwszorzędowych.

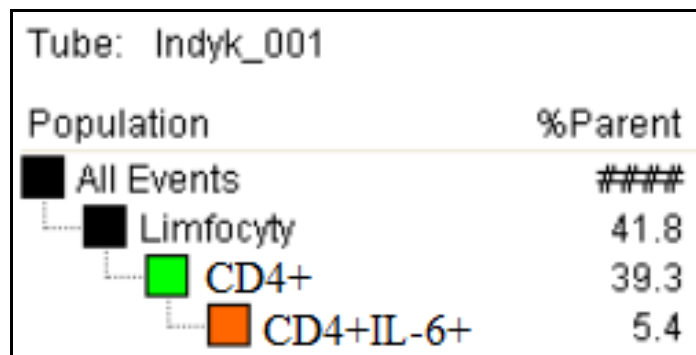
Oznaczanie odsetka limfocytów B IgM⁺ we krwi obwodowej i w badanych narządach u indyków

Wyzolowane z krwi i narządów limfocyty barwiono przeciwciałami poliklonalnymi Goat Anti Chicken IgM-FITC z firmy AbD Serotec, obecnie Bio-Rad (Anglia). Do każdej z probówek dodawano zalecaną przez producenta objętość przeciwciał celem wyznaczenia subpopulacji dojrzałych limfocytów B, wykazujących ekspresję receptora immunoglobulinowego BCR-sIgM⁺. Następnie próbki traktowano dokładnie jak w przypadku oznaczania subpopulacji limfocytów T.

Wewnątrzkomórkowa detekcja cytokin - oznaczanie odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących interleukinę 6 (IL-6)

Po 2×10^6 żywych limfocytów wyizolowanych z krwi, śledziony i migdałków jelit ślepych badanych indyków (eksperyment B) przenoszono do dołków na płytkach 24-dołkowych (Corning, USA). Każdą próbkę badano w trzech powtórzeniach. Do dołków dodawano następnie po 2 ml medium hodowlanego (RPMI-1640, 20mM HEPES, 10 % FBS, 1 % Antibiotic-Antimycotic Solution; Sigma-Aldrich, Niemcy) oraz po 4 μ l odczynnika Leukocyte Activation Cocktail with BD GolgiPlugTM (BD Pharmingen, USA) i po 0,6 μ g przeciwciał monoklonalnych Mouse Anti-Chicken CD28 klon AV7 (Bio-Rad, UK). Komórki inkubowano w inkubatorze Galaxy 48 R (Eppendorf, Niemcy), w temp. 40°C przez 6 godz. w atmosferze z dodatkiem 5 % CO₂. Po inkubacji, do każdego dołka dodawano po 20 μ l roztworu (20 mM) EDTA w PBS (Sigma-Aldrich, Niemcy). Następnie zawartość dołków przenoszono indywidualnie do 5 ml probówek cytometrycznych (Corning, USA) i płukano dwukrotnie w 3 ml PBS z dodatkiem 1 % inaktywowanej surowicy bydlęcej (FBS; Sigma-Aldrich, Niemcy). Limfocyty TCD4⁺ znakowano przeciwciałami monoklonalnymi Mouse Anti Chicken CD4-FITC (klon 2-35) zgodnie z procedurą opisaną wyżej. Po wyznaczeniu i wypłukaniu komórek zawieszano je w 100 μ l odczynnika utrwalającego (Reagent A) z zestawu Leucoperm (Biorad, UK) i inkubowano przez 15 min w temp. 22°C na mieszadle przy 250 RPM. Po inkubacji komórki płukano dwukrotnie w 3 ml PBS przy 300 g przez 5 min. Tak utrwalone i wypłukane komórki zawieszano w 100 μ l medium do permeabilizacji błony komórkowej (Reagent B) z zestawu Leucoperm (Biorad, UK) i dodawano po 5 μ l przeciwciał poliklonalnych Rabbit Anti-Chicken IL-6 (Bio-Rad, Anglia). Próbki inkubowano przez 30 min w temp. 22°C na mieszadle przy 250 RPM. Po inkubacji

komórki płukano dwukrotnie w 3 ml PBS. Następnie do każdej próbki dodawano po 100 μ l PBS i po 5 μ l przeciwciał drugorzędowych Sheep Anti Rabbit IgG-PE (Bio-Rad, UK). Próbki inkubowano przez 30 min w temp. 22°C na mieszadle przy 250 RPM. Po inkubacji komórki płukano dwukrotnie w PBS, wirowano przy 250g przez 7 minut a powstałe pellety komórek zawieszano w 400 μ l PBS i badano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). Do badanych próbek sporządzono próbki kontrolne niebarwione, pojedynczo barwione i próbki FMO (Fluorescence Minus One) bez przeciwciał pierwszorzędowych Rabbit Anti-Chicken IL-6. Subpopulacja limfocytów CD4⁺ w obliczeniach była przyjmowana za 100 %, natomiast komórki syntetyzujące IL-6 (CD4⁺IL-6⁺) w odpowiedzi na stymulację mitogenami *in vitro* za odsetek tej subpopulacji (Ryc. 1).



Ryc. 1. Hierarchia bramkowań podczas analizy odsetka komórek syntetyzujących IL-6 w odpowiedzi na stymulację mitogenami, w obrębie subpopulacji limfocytów CD4⁺

Oznaczanie odsetka subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8 α ⁺, CD4⁺CD8 α ⁺ i limfocytów B CD3⁺Bu-1⁺ we krwi obwodowej i w badanych narządach u kurcząt brojlerów

Wyizolowane z krwi i narządów limfocyty barwiono przeciwciałami monoklonalnymi Mouse Anti-Chicken CD3-PACBLU (klon CT-3), Mouse Anti Chicken CD4-FITC (klon CT-4), Mouse Anti Chicken CD8 α - AF647 (klon CT-8) i Mouse Anti-Chicken Bu-1-PE (klon AV-20) z firmy Southern Biotech (USA). Do każdej z próbek dodawano zalecaną przez producenta objętość przeciwciał celem wyznaczenia danej subpopulacji limfocytów. Próbki inkubowano przez 30 minut w temp. 4°C, bez dostępu światła na mieszadle przy 250 RPM. Następnie komórki płukano dwukrotnie w PBS, wirowano przy 250g przez 7 minut a powstałe pellety

komórek zawieszano w 400 µl PBS i badano za pomocą cytometru przepływowego FACSAria II (Becton Dickinson, USA). Do badanych próbek sporządzono próbki kontrolne niebarwione, pojedynczo barwione i próbki FMO dla użytych fluorochromów (Fluorescein, Phycoerythrin, Alexa Fluor 647, Pacific Blue).

Akwizycja i analiza danych cytometrycznych

Akwizycji danych podczas oznaczeń cytometrycznych dokonano w środowisku specjalistycznego oprogramowania FACSDiva Software (BD, USA). Natomiast analizy i określanie immunofenotypu badanych komórek dokonano za pomocą programu FlowJo V10 (Becton Dickinson, USA). Podczas oznaczeń kontrolowano poprawność odczytu i akwizycji danych w użytych cytometrach przepływowych FACSCanto II i FACSAria II za pomocą dedykowanych kulek kalibracyjnych Cytometer Setup and Tracking beads (Becton Dickinson, USA).

VI. Badania serologiczne (ELISA)

Miano przeciwciał poszczepiennych w surowicy określano z zastosowaniem komercyjnych zestawów ELISA (APV-Ab, IBV-Ab, NDV-Ab, NDV-T-Ab, ORT-Ab) firmy IDEXX (USA). Do określenia całkowitego poziomu immunoglobulin klasy A i IL-6 w osoczu krwi (Eksperyment B) zastosowano komercyjne zestawy IgA ELISA Kit (Cusabio, Chiny) i ELISA Kit for Interleukin 6 (USCN, Chiny). Czas i warunki inkubacji były zgodne z instrukcjami dołączonymi do poszczególnych zestawów. Do pipetowania wykorzystano stację EpMotion 5075 LH (Eppendorf, Niemcy) a do płukania płytek automatyczną płuczkę Elx405 (BioTek, Agilent USA). Płytki inkubowano w komorze klimatycznej KBF 115 (Binder, Niemcy) a odczyt absorbancji wykonywano z zastosowaniem czytnika Elx800 (BioTek, Agilent, USA).

VII. Badania biochemiczne

W uzyskanej surowicy oznaczano aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginianowej (AST), fosfatazy alkalicznej (ALP), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i kinazy kreatynowej (CK), a także koncentrację białka całkowitego (TP) – eksperyment C i E oraz stężenia wapnia (CALC), fosforu (PHOS) i kwasu moczowego (UA) – eksperyment E. Oznaczenia wykonano przy użyciu komercyjnych zestawów i analizatora VetTest (IDEXX, USA) zgodnie z instrukcjami producenta.

VIII. Badania hematologiczne

Próbki krwi pełnej analizowano pod kątem liczby krwinek czerwonych (RBC), stężenia hemoglobiny (Hb), hematokrytu (PCV), liczby krwinek białych (WBC) oraz udziału procentowego poszczególnych leukocytów (na podstawie leukogramu) - w tym odsetka limfocytów, monocytów i granulocytów (heterofili, eozynofili i bazofili). Oznaczenia wykonano zgodnie z metodyką opisaną przez Krasnodębską-Depta i Koncickiego (29).

IX. Badania molekularne (PCR)

Podczas sekcji padłych lub poddanych eutanazji ptaków pobierano wycinki wątroby i jelit ślepych, po czym odważano 0,2 g próbki. Tak przygotowane wycinki rozdrabniano skalpelem na 1-2 mm fragmenty i poddawano homogenizacji w 0,7 ml PBS w homogenizatorze TissueLyser II (Qiagen, Niemcy). Homogenat wirowano przez 30 s przy 8000g i pobierano 200µl osadu do izolacji DNA za pomocą komercyjnego zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Niemcy). Jakość i koncentrację wyizolowanego całkowitego DNA oceniano za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Sci., USA). Do wykrywania materiału genetycznego *Histomonas meleagridis*, w tak przygotowanych próbkach, wykorzystano metodę opisaną przez Grabensteiner i Hess (12). Do uzyskanego DNA (150 ng/reakcję) dodawano gotową mieszaninę reakcyjną Hot StarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Niemcy). Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Vapo Protect (Eppendorf, Niemcy). Elektroforetyczną analizę produktu amplifikacji (574 bp) przeprowadzono w 2 % żelu agarozowym (Prona Agarose, Polska) w 1-krotnie stężonym buforze TAE (Fermentas, Litwa), z dodatkiem 0,5 µl/ml bromku etydyny (Sigma-Aldrich, Niemcy), przy napięciu 5V/cm żelu przez 60 minut. Jako wzorzec wielkości masy zastosowano DNA Marker (A&A Biotechnology, Polska). Wyniki przeprowadzenia elektroforezy amplikonów odczytywano w świetle UV przy użyciu systemu do wizualizacji GelDoc XR+ (Biorad, USA) i archiwizowano w postaci cyfrowych fotografii.

4.2.2. Podsumowanie uzyskanych wyników i dyskusja

Przeprowadzone w ramach pięciu eksperymentów badania własne miały na celu określenie wpływu szerokiej gamy czynników na wybrane wskaźniki odporności humoralnej i komórkowej u drobiu grzebiącego. Zastosowane w eksperymentach czynniki doświadczalne (ziarno pszenicy, metionina, fitonocydy roślinne i mączka z larw

owadów), należały (najogólniej je klasyfikując) do składników dawki pokarmowej i oddziaływały w pierwszej kolejności na układ i poprzez układ pokarmowy ptaków doświadczalnych. Natomiast wirus krwotocznego zapalenia jelit posłużył jako zakaźny czynnik o właściwościach immunosupresyjnych, który poza obniżaniem odporności, powoduje uszkodzenie integralności jelit. Związane z układem pokarmowym lokalne struktury obronne GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) są największą i najbardziej wyspecjalizowaną częścią systemu immunologicznego u ludzi i zwierząt. Błony śluzowe oraz skóra stanowią miejsce kontaktu organizmu ze środowiskiem. Jednak ryzyko zetknięcia się różnych antygenów i patogenów z organizmem w świetle przewodu pokarmowego jest wielokrotnie większe niż w przypadku skóry, czy błon śluzowych układu oddechowego. Tkanka limfatyczna wchodząca w skład GALT zawiera ponad 70 % limfocytów organizmu (21). W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku dr John Bienenstock (4) spostrzegł, że kontakt limfocytów z antygenem na terenie GALT prowadzi do rozwoju ogólnoustrojowej odporności, w tym w błonach śluzowych innych układów i narządów. Dzieje się tak dzięki możliwości migracji swoiście uczulonych limfocytów z GALT do innych struktur układu immunologicznego. Biorąc pod uwagę codzienne obciążenie organizmu ogromną liczbą antygenów znajdujących się w treści układu pokarmowego i czynników oddziałujących na cały układ immunologiczny ptaków, mechanizmy regulacyjne tego układu muszą być bardzo precyzyjne. Również drogą alimentarną najprościej jest stosować (w warunkach chowu wielkotowarowego drobiu) różne środki poprawiające funkcje obronne organizmu, czyli tzw. immunomodulatory. Nie muszą to być nowoczesne, drogie, syntetyczne środki farmakologiczne, bowiem wiele substancji pochodzenia naturalnego i związków stosowanych u drobiu rutynowo, jak choćby witaminy (A, C, E), probiotyki, aminokwasy czy preparaty roślinne, mają potencjalne właściwości immunostymulujące. Ważne jest tylko, aby poznać dawki i schematy ich stosowania, co nie byłoby możliwe bez zastosowania nowoczesnych metod laboratoryjnych, pozwalających na ocenę statusu immunologicznego badanych zwierząt.

Wpływ żywienia indyków rzeźnych paszą z dodatkiem całych ziaren pszenicy na wybrane wskaźniki immunologiczne

Żywienie ma ogromny wpływ na organizm ludzi i zwierząt. Często w literaturze popularno-naukowej spotkać można sformułowanie „dieta na odporność”, czy „produkt wspomagający odporność”. Wiele z tych produktów wspomaga procesy

obronne poprzez korzystny wpływ na mikrobiotę jelitową. Do takich składników diety u ludzi należą niewątpliwie produkty pełnoziarniste bogate w błonnik. Również ptaki w warunkach naturalnych mają dostęp do nierozdrobnionych ziaren różnych gatunków roślin, które są rozcierane dopiero w żołądku mięśniowym. Sformułowano zatem hipotezę, że zastąpienie mielonej pszenicy całymi ziarnami w paszy dla indyków rzeźnych może korzystnie wpłynąć na procesy trawienne, mikrobiotę jelitową i pośrednio stymulować mechanizmy obronne. Przeprowadzone doświadczenie pozwoliło uzyskać bardzo ciekawe wyniki badań, zarówno wskaźników immunologicznych, jak i wyników produkcyjnych. U indyków z grup W_{50} i W_{100} , którym zastąpiono w mieszankach paszowych mieloną pszenicę całymi ziarnami w 50 % lub w 100 %, stwierdzono statystycznie istotnie wyższe miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko ND ($P=0,001$) i TRT ($P=0,006$), w porównaniu do ptaków żywionych paszą zawierającą wyłącznie rozdrobnioną pszenicę (grupa W_0). Najwyższe miano zanotowano jednak u ptaków w grupie W_{50} . Indyki z tej grupy miały także istotnie wyższy odsetek subpopulacji limfocytów T $CD4^+$ we krwi ($P=0,022$) i w błonie śluzowej jelita biodrowego ($P=0,029$), komórek $CD8\alpha^+$ we krwi ($P=0,011$) oraz limfocytów podwójnie pozytywnych $CD4^+CD8\alpha^+$ we krwi ($P=0,009$), w porównaniu do ptaków z grup W_0 i W_{100} . Z kolei odsetek subpopulacji limfocytów T $CD8\alpha^+$ w migdałkach jelit ślepych był istotnie niższy u ptaków w grupie W_{50} , w porównaniu do indyków z grup W_0 i W_{100} . Wyniki badań własnych wskazują, że forma skarmianych komponentów paszowych może korzystnie oddziaływać na mechanizmy obronne u indyków rzeźnych, w tym na budowanie protekcji poszczepiennej. Dodatek składników strukturalnych do mieszanki paszowej w postaci całych lub częściowo rozdrobnionych ziaren zbóż lub gruboziarnistych włókien pochodzenia roślinnego, przedłuża czas przebywania paszy w żołądku mięśniowym, wpływa na lepsze jej rozdrobnienie, trawienie, obniża pH treści oraz istotnie wpływa na skład mikrobiomu jelitowego. W efekcie poprawia pasaż treści i wykorzystanie składników odżywczych oraz wspomaga funkcjonowanie układu odpornościowego. Pobudzanie lokalnych mechanizmów obronnych GALT przebiega dwiema głównymi ścieżkami: pośrednio poprzez korzystny wpływ zawartego w nasionach zbóż błonnika, który jest wykorzystywany przez komensaliczne mikroorganizmy syntetyzujące liczne drobnocząsteczkowe związki stymulujące układ immunologiczny gospodarza lub bezpośrednio poprzez wpływ, np. β -glukanów zbożowych na komórki układu immunologicznego (24). Jednak zbyt wysoka

zawartość takiej formy pszenicy także nie jest korzystna, gdyż powoduje znaczny wzrost lepkości treści jelitowej, co pogarsza strawność i wchłanianie składników odżywczych (20). Stąd indyki z grupy W₁₀₀ osiągnęły statystycznie istotnie niższą końcową masę ciała (7,84 kg; P=0,002), niż ptaki z grup W₅₀ i W₀ (odpowiednio 8,21 i 8,53 kg) i uzyskały istotnie wyższy wskaźnik konwersji paszy FCR (P<0,001). Masa ciała indyków żywionych paszami z dodatkiem całego ziarna pszenicy, czy walcowanej kukurydzy może być niższa niż u indyków żywionych tradycyjnie, ale koszt paszy zużytej na przyrost 1 kg masy ciała jest zwykle o kilka procent mniejszy (50). Wyniki badań własnych wskazują, że dieta z dodatkiem (50 % ogólnej zawartości pszenicy) całych ziaren zbóż wpływa korzystnie na funkcjonowanie układu pokarmowego oraz stymuluje nieswoiste i swoiste mechanizmy obronne u indyków.

Szczegółowe wyniki opisanych krótko powyżej badań opublikowano w pierwszej pracy wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

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 (2), 255-262.

Wpływ różnych poziomów i źródeł metioniny w paszy na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej u klinicznie zdrowych indyków oraz zakażonych eksperymentalnie adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań nad wpływem żywienia na układ immunologiczny indyków, postanowiono zbadać jak zmiana zawartości i źródła metioniny w paszach będzie oddziaływać na wybrane wskaźniki odporności humoralnej i komórkowej u tych ptaków. Dodatkowo, w doświadczeniu zastosowano kontrolowane zakażenie eksperymentalne wirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV), który jest silnym immunosupresorem a także negatywnie wpływa na integralność jelit. Nieprzypadkowo wybór padł na metioninę, ponieważ ten aminokwas jest pierwszym egzogennym aminokwasem limitującym wykorzystanie białka u drobiu. Działa tutaj tzw. prawo minimum, polegające na tym, że aminokwas niezbędny, występujący w najmniejszej ilości w stosunku do zapotrzebowania, doprowadza do ograniczenia biosyntezy białka organizmu, czego konsekwencją są

zmniejszone przyrosty masy ciała, czy obniżenie odporności. Wiele mediatorów odpowiedzi immunologicznej, choćby przeciwciała, są białkami syntetyzowanymi i zużywanymi w ogromnych ilościach w przebiegu chorób, nawet tych przebiegających subklinicznie i zakażeń bezobjawowych. Stąd zahamowanie przyrostów u subklinicznie chorujących ptaków, którym potencjalnie nic nie jest, gdyż nie wykazują klinicznych objawów. Zapotrzebowanie na składniki pokarmowe w stanie fizjologii i patologii różni się od siebie a większość prowadzonych badań nad zapotrzebowaniem danej grupy produkcyjnej na składniki odżywcze, witaminy, mikro i makroelementy wykonuje się na ptakach klinicznie zdrowych. Metionina jest także zaliczana do tzw. aminokwasów funkcjonalnych, czyli takich, które regulują i uczestniczą w ważnych dla życia i zdrowia szlakach metabolicznych (59). Uczestniczy w licznych reakcjach metylacji oraz transsulfuracji i syntezy innych aminokwasów siarkowych, jak cysteina i homocysteina (19). Metionina jest jednym z dwóch (obok tryptofanu) aminokwasów posiadających tylko jeden kodon (AUG) w mRNA, odczytywany przez rybosom jako miejsce startu translacji (kodon inicjujący). Stąd u eukariontów wszystkie białka powstające w procesie translacji zaczynają się metioniną. W badaniach własnych wysunięto hipotezę, że zwiększony o 40 %, w stosunku do rekomendowanego przez NRC (36), poziom tego aminokwasu, jak i jego forma (DLM lub MHA) w paszy może wpływać na funkcjonowanie układu immunologicznego indyków klinicznie zdrowych, jak i zakażonych immunosupresyjnym adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit. HEV jest szeroko rozpowszechniony w stadach rzeźnych i reprodukcyjnych tych ptaków w naszym kraju i na świecie (55). Następstwem najczęściej bezobjawowej infekcji tym wirusem jest upośledzenie funkcji układu immunologicznego. Jedynie w przypadku zakażenia bardzo patogennymi szczepami, u indyków może wystąpić depresja, krwawe odchody i duża śmiertelność. Krajowe izolaty HEV w większości należą do mało patogennych (13, 26, 55). W tym miejscu należy nadmienić, iż nawet słabo zjadliwe, wywołujące subkliniczne zakażenia, szczepy HEV upośledzają humoralną i komórkową reaktywność układu immunologicznego. Skutkuje to zaostrzeniem toczących się procesów chorobowych, stąd zakażone bezobjawowo indyki są bardziej wrażliwe na wtórne infekcje wywołane drobnoustrojami warunkowo chorobotwórczymi (55). Uzyskane wyniki badań własnych wskazują, że zdecydowanie większy wpływ na oceniane wskaźniki odporności humoralnej i komórkowej miało zakażenie HEV niż metionina, przy czym bardziej istotny okazał się być poziom tego aminokwasu niż jego forma. U zakażonych HEV indyków

stwierdzono statystycznie istotny spadek ($P < 0,001$) odsetka limfocytów B IgM⁺ w śledzionie, migdałkach jelit ślepych (CT) i krwi oraz patologicznie wysoki wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺ w śledzionie i krwi ($P < 0,001$) oraz CT ($P = 0,005$). Zanotowane zmiany poziomu tych komórek korespondują z wynikami badań innych autorów i są wskaźnikiem postępującej immunosupresji (51). Po naturalnym zakażeniu *per os* wirusy docierają do śledziony drogą krwi i przedostają się do stref bogatych w limfocyty B, które razem z mononuklearnymi komórkami fagocytarnymi stanowią ich główny cel i miejsce replikacji (40, 51). W zakażonych komórkach mogą rozprzestrzeniać się po całym organizmie, docierając do miejsc występowania limfocytów B i makrofagów, które ulegają uszkodzeniu (52). W miejscach uszkodzenia komórek pierwotnego powinowactwa dochodzi do nacieku i proliferacji limfocytów T CD4⁺. Wzrost odsetka tych komórek w śledzionie doprowadza do powiększenia narządu (splenomegalii) i zmiany jego wyglądu w obrazie sekcyjnym na marmurkowaty. Ponadto pobudzone komórki, w tym limfocyty T CD4⁺, u zakażonych HEV indyków biorą udział w kaskadzie reakcji doprowadzającej do wyrzutu przez liczne populacje komórek toksycznych ilości cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6). Uważa się, że te ostatnie są odpowiedzialne za rozwój krwotocznego zapalenia błony śluzowej jelit (zwłaszcza dwunastnicy) i pojawienie się upadków w wyniku tzw. „szoku cytokinowego” (39, 40, 47). Wyższa o 40 %, niż rekomendowana przez NRC (36), dawka metioniny niezależnie od jej formy powodowała wyhamowanie patologicznego wzrostu odsetka limfocytów TCD4⁺ we krwi ($P = 0,009$), CT ($P = 0,110$) i w śledzionie ($P = 0,233$). Wyższy poziom tego aminokwasu korzystnie wpływał na wzrost odsetka limfocytów B IgM⁺ w śledzionie ($P = 0,117$) i CT ($P = 0,015$) u klinicznie zdrowych indyków oraz hamował spadek odsetka tych komórek w badanych narządach u ptaków zakażonych HEV. Ponadto, u zakażonych indyków, otrzymujących mieszanki paszowe z wyższym poziomem DLM i MHA, stwierdzono statystycznie istotnie niższy ($P < 0,001$) poziom IL-6 w osoczu krwi w porównaniu do ptaków otrzymujących pasze z zawartością metioniny rekomendowaną przez NRC (36). To koresponduje z wynikami oznaczeń wewnątrzkomórkowej syntezy cytokin. Wyższy poziom DLM, a szczególnie MHA, wpływał istotnie ($P < 0,001$) na obniżenie odsetka, wyizolowanych z krwi zakażonych HEV indyków, limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących IL-6 w odpowiedzi na stymulację mitogenami w warunkach *in vitro*. Dawka, jak i forma zastosowanej w mieszankach paszowych metioniny nie miały istotnego wpływu na miano przeciwciał poszczepiennych

przeciwko NDV i ORT, ale wyższy poziom powodował wzrost ($P=0,068$) zawartości ogólnej IgA w osoczu krwi. Stwierdzono istotny wpływ zakażenia indyków HEV na miano badanych przeciwciał poszczepiennych w surowicy. Zaobserwowano, że zakażenie indyków HEV powoduje pogorszenie odporności poszczepiennej przeciwko ND, wyrażone istotnie niższym mianem przeciwciał w surowicy. Z kolei miano przeciwciał przeciwko ORT u indyków zakażonych, było statystycznie istotnie wyższe niż u ptaków z grup kontrolnych. Najprawdopodobniej jest to związane z formą antygeny użytego w szczepionkach (NDV - żywy atenuowany vs. ORT-inaktywowany+adiwant olejowy) oraz terminem szczepienia w stosunku do momentu zakażenia indyków HEV. Wzrost miana przeciwciał przeciwko ORT mógł być związany z faktem, że rewakcytacji dokonano u indyków w siódmej dobie po zakażeniu eksperymentalnym HEV, kiedy układ immunologiczny tych ptaków był silnie pobudzony. Uzyskane obserwacje korespondują z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (14, 38). Reasumując uzyskane wyniki należy stwierdzić, że forma stosowanej w mieszankach paszowych metioniny (DLM lub MHA) nie ma tak istotnego znaczenia jak dawka tego aminokwasu. Dotyczy to zarówno oznaczanych wskaźników immunologicznych, jak i wyników produkcyjnych. Wyższy o 40 % poziom metioniny w paszach korzystnie wpływał na badane wskaźniki immunologiczne u zdrowych indyków oraz łagodził skutki zakażenia immunosupresyjnym HEV.

Przedstawione wyniki doświadczenia były jednymi z kilku przeprowadzonych eksperymentów, podczas realizacji projektu badawczego pt. „Możliwości wykorzystania metioniny jako żywieniowego czynnika kształtującego potencjał antyoksydacyjny i stymulującego funkcje systemu immunologicznego indyków”, w których byłem wykonawcą wszystkich oznaczeń immunologicznych. Grant był finansowany przez NCN, nr projektu 2013/11/B/NZ9/02496.

Szczegółowe wyniki opisanych powyżej badań opublikowano w drugiej pracy wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

Tykałowski B.*, Śmiałek M., Koncicki A., Ognik K., Zduńczyk Z., Jankowski J. The immune response of young turkeys to haemorrhagic enteritis virus infection at different levels and sources of methionine in the diet. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1):387, 1-11.

Badanie skuteczności fitoncydów w terapii i zapobieganiu histomonozy u indyków reprodukcyjnych

Histomonoza indyków, zwana potocznie czarną główką (ang. Blackhead disease), jest pasożytniczą wywołaną przez pierwotniaka *Histomonas (H.) meleagridis*. Występuje najczęściej u 2 – 16 tygodniowych indyków. W związku z wprowadzonym, w krajach UE, zakazem profilaktycznego stosowania u drobiu skutecznych preparatów przeciwko histomonozie (metronidazol, ronidazol, dimetridazol, nifursol), choroba ta nabiera dużego znaczenia i stanowi poważny problem (EFSA 2013). Aktualnie w krajach UE nie ma zarejestrowanego żadnego środka farmakologicznego do leczenia histomonozy ani szczepionki a zapobieganie chorobie opiera się głównie na przestrzeganiu elementarnych zasad bioasekuracji (3). Należy pamiętać, że nawet najbardziej rygorystyczna bioasekuracja nie daje pełnej gwarancji zabezpieczenia przed inwazją *H. meleagridis* i wybuchem choroby (6). Tak było w prezentowanym przypadku. Choroba wybuchła na fermie reprodukcyjnej u 11-tyg. indyków w sektorze J-2, gdzie znajdowało się 3870 samic. W tym budynku, lecz w oddzielnym litą ścianą sektorze, znajdowało się także 1019 szt. indorów. A w budynku obok, 4450 szt. indyczek. W budynkach były wprowadzone i przestrzegane bardzo restrykcyjne obostrzenia sanitarno-weterynaryjne. Śmiertelność w chorym na histomonozę nieleczonym stadzie może dochodzić nawet do 100 % (3). Do leczenia histomonozy u chorych indyczek w badanym stadzie oraz do zapobiegania jej transmisji u pozostałych ptaków na fermie wykorzystano mieszankę paszową uzupełniającą adiCox^{SOL} PF (AdiFeed, Polska), zawierającą m.in. fitoncydy roślinne. Już od pewnego czasu na świecie podjęto próby stosowania w profilaktyce i terapii tej choroby olejków eterycznych i wyciągów roślinnych (15). W wielu przypadkach badania skuteczności tego typu preparatów przeciwko *H. meleagridis* wykonywane w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) odbiegają od skuteczności *in vivo* w warunkach terenowych (53). Za przyczynę tego stanu uważa się obniżenie u ptaków odporności i powikłanie histomonozy pałeczkami *E. coli* (11). W badanym stadzie indyczek, w sektorze objętym chorobą, w ciągu czterech tygodni od wybuchu histomonozy i rozpoczęcia terapii za pomocą fitoncydów roślinnych, śmiertelność wyniosła 5,92 %. Jednak w związku z faktem, że choroba wybuchła w stadzie rodzicielskim indyków, właściciel zdecydował o eliminacji wszystkich sztuk z zajętego sektora, które wykazywały nawet niewielkie objawy chorobowe (apatia, niechęć do poruszania, wychudzenie). Stąd odsetek wybrakowanych z tego sektora indyczek wyniósł 16,28 %

w ciągu czterech tygodni od wybuchy choroby. Natomiast sumaryczny wskaźnik śmiertelności i brakowań do końca okresu odchowu, czyli do 28. tyg. życia, wyniósł w tym sektorze 28,3 %. W pozostałych sektorach indyków na fermie, które otrzymywały profilaktycznie fitoncydy, odsetek ptaków wybrakowanych i padnięć wyniósł 4,53 %. Ten sam wskaźnik w okresie produkcyjnym (od 32. do 56. tyg. życia) wyniósł 6,1 % dla indyczek (które przechorowały histomonozę) utrzymywanych w hali produkcyjnej P-1, oraz 2,7 i 3,4 % dla pozostałych indyków (samce i samice) utrzymywanych w dwóch innych budynkach produkcyjnych (odpowiednio P-2 i P-3). Uzyskany w badaniach własnych wskaźnik śmiertelności i brakowań był zdecydowanie niższy niż u ptaków zarażonych eksperymentalnie, które nie były leczone żadnym preparatem i zbliżony do wskaźnika śmiertelności indyków leczonych olejkami eterycznymi i wyciągami roślinnymi (15). Przebieg histomonozy jest cięższy, gdy w jelitach ślepych indyków dojdzie do interakcji *H. meleagridis* z patogennymi bakteriami, czy kokcydiami (11). W badaniach własnych potwierdzono obecność licznych pałeczek *E. coli* w pobranych w trakcie sekcji padłych indyczek wycinkach wątroby, śledziony, serca i jelita biodrowego, pomimo to nie doszło do wystąpienia kolibakteriozy. Te spostrzeżenia skłoniły mnie do przeprowadzenia kolejnego eksperymentu, polegającego na ocenie wpływu preparatu fitnocydowego adiCox^{SOL} PF na układ odpornościowy indyków. Rozpoznanie histomonozy na podstawie objawów klinicznych jest trudne. Natomiast stwierdzenie charakterystycznych zmian sekcyjnych w jelitach ślepych (włóknikowe zapalenie błony śluzowej z owrzodzeniami, obecność serowatego wysięku w świetle jelita) i wątrobie (powiększenie i obecność różnej wielkości ognisk martwicy otoczonych wałem przekrwienia na powierzchni) może być podstawą rozpoznania tej choroby. Jednak coraz częściej do potwierdzenia rozpoznania tej jednostki chorobowej stosuje się metody biologii molekularnej, co również wykorzystano w badaniach własnych potwierdzając bądź wykluczając histomonozę u padłych osobników, u których nie obserwowano charakterystycznych zmian anatomo-patologicznych. Do niedawna uważano, że zarażenie ptaków *H. meleagridis* nie może odbywać się bez udziału jaj nicieni *Heterakis gallinarum*. Eksperymentalne podawanie *per os* tkanek czy odchodów chorych na histomonozę ptaków, zdrowym indykom nie pozwala wywołać u tych ostatnich choroby z uwagi na niskie pH wola i żołądków. Wskazuje to na ogromną rolę jaj *H. gallinarum*, których osłonki chronią wiciowca przed letalnym działaniem niskiego pH w początkowych odcinkach przewodu pokarmowego indyków. Doświadczenia i obserwacje

przeprowadzone w ciągu kilku ostatnich lat wykazały jednak, że inwazja *H. meleagridis* może szerzyć się w wyniku kontaktu ptaków zakażonych z niezakażonymi, a drogą wniknięcia pierwotniaków jest kloaka (17, 34). W badaniach własnych nie stwierdzono obecności dorosłych nicieni *H. gallinarum* w treści jelit ślepych, ani obecności jaj tych pasożytów w odchodach badanych metodą flotacji, co może świadczyć o rozprzestrzenianiu się pierwotniaków *H. meleagridis* w badanym stadzie bez udziału tego wektora. Koresponduje to z obserwacjami Hu i wsp. (17).

Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką skuteczność badanego preparatu w zapobieganiu histomonozy, gdyż obecność materiału genetycznego *H. meleagridis* potwierdzono badaniami molekularnymi (PCR) wyłącznie w sektorze indyczek (J-2), natomiast choroba nie przeniosła się ani do sektora indorów utrzymywanych w tym samym budynku, ani do pozostałych indyczek utrzymywanych w innej odchowni. Wskaźnik śmiertelności i brakowań u leczonych indyczek z kliniczną histomonozą wskazuje na dobrą skuteczność badanego preparatu również w terapii. Warto także zaznaczyć, że w trakcie nieśności u indyczek nie stwierdzono żadnego przypadku histomonozy. Wyleczone indyczki znosiły w okresie produkcyjnym 112 jaj na sztukę, z których średnio 97 % była zapłodniona a wylęgowość wynosiła 85 % z jaj nałożonych do inkubacji. Pozostałe indyczki znosiły w tym czasie od 117 do 119 jaj na sztukę. Średnia liczba znoszonych jaj dla tej linii ptaków określona przez producenta (Hybrid Turkeys, Kanada) wynosi 102,3 szt./nioskę/24-tygodniowy okres nieśności, przy 94,8 % zapłodnieniu i 85,5 % wylęgowości.

Szczegółowe wyniki opisanych powyżej badań opublikowano w trzeciej i w czwartej pracy wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Dziewulska D., Stenzel T., Koncicki A. Phytoncides in the prevention and therapy of blackhead disease and their effect on the turkey immune system. *Journal of Veterinary Research*, 2021, 65 (1), 79-85.

Tykałowski B., Koncicki A. Immunomodulacja jako narzędzie ograniczające antybiotykoterapię w intensywnym chowie drobiu. *Medycyna Weterynaryjna*, 2022, 78 (8), 369-375.

Wpływ fitoncycydów na wybrane wskaźniki immunologiczne u indyków rzeźnych

W dobie narastania oporności mikroorganizmów na antybiotyki znaczenia nabierają działania zmierzające do podniesienia u drobiu sprawności ich mechanizmów obronnych, m. in. poprzez stosowanie szczepień ochronnych oraz stosowanie środków immunostymulujących. Sprawnie funkcjonujący układ odpornościowy umożliwi ptakom przetrwanie w środowisku, w którym jest on stale narażony na szereg bodźców wpływających bezpośrednio lub pośrednio na jego funkcjonowanie. Ponadto, wiele substancji pochodzenia naturalnego, poza korzystnym wpływem na mechanizmy obronne u ptaków, czy innych gatunków zwierząt, wykazuje działanie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwpierwotniacze i przeciwgrzybicze. Stwierdzono, że poszczególne zioła i zawarte w nich substancje aktywne wykazują wyraźną swoistość w oddziaływaniu na układ immunologiczny, a aktywność immunologiczna preparatów roślinnych lub wyizolowanych z nich substancji wyraża się różnymi efektami, np.: wzmożoną aktywnością fagocytarną makrofagów, zwiększeniem liczby pobudzonych limfocytów T i B. Często obserwuje się również indukcję syntezy interferonów, czy zwiększoną aktywność lizozymu we krwi.

W badaniach własnych postanowiono sprawdzić czy składniki aktywne badanego wcześniej preparatu adiCox^{SOL} PF (AdiFeed, Polska), który okazał się być skuteczny w leczeniu i profilaktyce histomonozu u indyków reprodukcyjnych, wpływają korzystnie na układ immunologiczny indyków rzeźnych. Dodatkowo postanowiono zbadać różnice w oddziaływaniu na organizm indyków dawek profilaktycznej i terapeutycznej, które zaleca producent preparatu. Nie stwierdzono istotnego wpływu stosowania dawki terapeutycznej (3 ml/l wody) i profilaktycznej (1 ml/l wody) badanego preparatu na wartości badanych wskaźników biochemicznych (ALT, AST, ALP, CK, LDH i TP) w surowicy. Wszystkie parametry pozostawały w granicach norm fizjologicznych dla tego gatunku drobiu (29). Dawka terapeutyczna powodowała statystycznie istotny ($P < 0,05$) wzrost odsetka limfocytów B IgM⁺ w śledzionie u indyków z grupy A-3, natomiast dawka profilaktyczna powodowała statystycznie istotny ($P < 0,05$) wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺ we krwi u indyków z grupy A-2, w porównaniu do ptaków grupy kontrolnej. W śledzionie indyków z grupy A-3 stwierdzono także podwyższony odsetek subpopulacji limfocytów T CD8α⁺, w porównaniu do ptaków z pozostałych grup, nie był to jednak wzrost istotny statystycznie. Z kolei podawanie tego preparatu przez trzy dni przed (grupa B-1) lub przez 3 dni po (grupa B-2) szczepieniu indyków przeciwko ORT, powodowało wzrost średniego geometrycznego miana przeciwciał poszczepiennych do wartości $G_{Mn}=2312$ i $G_{Mn}=2778$

(odpowiednio w grupach B-1 i B-2), po trzech tygodniach od wakcynacji. Indyki z grupy B-3, które nie otrzymywały badanego preparatu, miały średnie geometryczne miano przeciwciał poszczepiennych na poziomie $G_{Mn}=1567$. Nie był to jednak wzrost istotny statystycznie. Uzyskane wyniki badań korespondują z wynikami podobnego doświadczenia, którego byłem wykonawcą, gdzie podawanie preparatu zawierającego ekstrakty z innych gatunków ziół, a zatem innego zestawu fitoncydów, z wodą do picia przed lub po szczepieniu kurcząt brojlerów przeciwko IB, powodowało statystycznie istotny wzrost miana przeciwciał poszczepiennych u tych ptaków w porównaniu do grupy, która nie otrzymywała żadnych fitoncydów (28). Przedstawione wyniki badań potwierdzają, że fitoncydy mogą mieć zastosowanie nie tylko w terapii i profilaktyce chorób u drobiu, ale mogą być także stosowane do wzmocnienia ich odporności poszczepiennej. Szczególne znaczenie odgrywają jednak w przypadku leczenia chorób u drobiu, na które nie ma żadnych zarejestrowanych środków farmakologicznych, jak histomonozą oraz w leczeniu zakażeń wywołanych przez antybiotykooporne bakterie (23).

Szczegółowe wyniki opisanych powyżej badań oraz cytowanych w dyskusji opublikowano w trzeciej i w czwartej pracy wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Dziewulska D., Stenzel T., Koncicki A. Phytoncides in the prevention and therapy of blackhead disease and their effect on the turkey immune system. *Journal of Veterinary Research*, 2021, 65 (1), 79-85.

Tykałowski B., Koncicki A. Immunomodulacja jako narzędzie ograniczające antybiotykoterapię w intensywnym chowie drobiu. *Medycyna Weterynaryjna*, 2022, 78 (8), 369-375.

Badanie wpływu pełnotłustej mączki z larw muchy czarnej (*Hermetia illucens*) na zdrowotność i wybrane wskaźniki immunologiczne u kurcząt brojlerów

Alternatywne źródła białka cieszą się ostatnio rosnącym zainteresowaniem jako potencjalne składniki żywienia zwierząt gospodarskich. Zainteresowanie jadalnymi owadami gwałtownie wzrosło, gdy Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) zaczęła promować je jako realną opcję żywieniową dla ludzi (56). Cieszą się one również rosnącym zainteresowaniem jako źródło komponentów

paszowych dla zwierząt (57), zwłaszcza w odpowiedzi na rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1372 z dnia 17 sierpnia 2021 r. zezwalające na stosowanie przetworzonego białka zwierzęcego, pochodzącego z owadów hodowlanych, w paszach dla drobiu i świń (42). Znacznie wcześniej rozpoczęto badania nad ekonomicznymi skutkami żywienia drobiu dietami z różnymi poziomami mączek z owadów jako zamiennika dla mączek rybnej lub sojowej (2, 33). Początkowo nie skupiano się na wpływie komponentu owadziego na inne wskaźniki niż ekonomiczne i produkcyjne. Analiza wyników produkcyjnych, uzyskanych w badaniach własnych, wskazuje na postępujący negatywny wpływ rosnącej zawartości mączki z pełnotłustych larw Muchy czarnej (HI) w mieszankach paszowych na przyrosty masy ciała, wartość współczynnika konwersji paszy (FCR) i przeżywalność ptaków. W 42. dniu życia, średnia masa ciała kurcząt brojlerów, które żywiono paszą z najwyższym poziomem mączki owadziej (grupa HI-100, 100 % mączki owadziej) była statystycznie istotnie niższa ($P < 0,001$) niż w pozostałych grupach i wynosiła 2375 g. W grupie HI-0 (kontrolnej, 100 % mączki sojowej) średnia końcowa masa ciała wynosiła 3046 g. Masa ciała ptaków z grup HI-50 (50 % mączki sojowej i 50 % mączki owadziej) i HI-75 (25 % mączki sojowej i 75 % mączki owadziej) była istotnie niższa ($P < 0,05$) niż ptaków z grupy HI-0 i istotnie wyższa ($P < 0,05$) niż kurcząt z grupy HI-100. Również współczynnik FCR u ptaków z grupy HI-100 był istotnie wyższy ($P = 0,009$) niż FCR ptaków z pozostałych grup i osiągnął wartość 1,77. Współczynnik FCR w grupie HI-0 wyniósł 1,63 a w grupach HI-50 i HI-75 $FCR = 1,59$ i był niższy niż w grupie HI-0, pomimo statystycznie istotnych różnic w masie ciała między ptakami karmionymi mączką owadzią a ptakami z grupy kontrolnej. Sumaryczny wskaźnik brakowań i upadków osiągnął wartość 28,2 % w grupie HI-100; 7,20 % w grupie HI-75; 5,20 % w grupie HI-50 i 3,15 % w grupie HI-0. Wysoka liczba brakowanych i padłych ptaków w grupie HI-100 była spowodowana zahamowaniem wzrostu oraz niedrożnością przewodu pokarmowego związanego ze zjadaniem pelletu, na którym były utrzymywane kurczęta. Uzyskane wyniki są sprzeczne z wynikami wcześniejszych badań dotyczących żywienia drobiu mączką owadzią, w których ten komponent miał korzystny wpływ na wyniki produkcyjne u kurcząt brojlerów (7, 22). Różnice w wynikach produkcyjnych mogą zależeć od okresu karmienia ptaków mieszankami zawierającymi komponent owadzi, zawartości białka i tłuszczu owadziego w diecie, zawartości chityny, która wpływa niekorzystnie na strawność wielu składników odżywczych oraz technologii przygotowania komponentów paszowych (np. odtłuszczanie, usuwanie chityny), co potwierdzają wcześniejsze badania (9, 46). Niektórzy autorzy sugerowali, że na codzienne spożycie paszy u drobiu (DFI) może

mieć wpływ kolor granulek, ponieważ mączka z całych larw HI ma ciemnobrązowy kolor, ciemniejszy niż mączka sojowa, a zatem jest mniej chętnie spożywana przez ptaki (46). Najprawdopodobniej dlatego kurczęta z grupy HI-100 zjadały jasny pellet, na którym były utrzymywane, zamiast paszy koloru brązowego. Dodatek komponentu owadziego do pasz nie miał istotnego wpływu na badane wskaźniki czerwono- (RBC, Hb i PCV) i białokrwinkowe (WBC i leukogram), ale miał wpływ na badane parametry immunologiczne i biochemiczne. W 21. dniu życia odsetek limfocytów T CD3⁺CD4⁺ we krwi był statystycznie istotnie wyższy u kurcząt z grupy HI-75 niż u ptaków z grup HI-0 i HI-50 a odsetek subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD8α⁺ statystycznie istotnie niższy (P<0,05) w grupie HI-100, w porównaniu z grupą HI-50. Mączka z larw owadów nie miała istotnego wpływu na odsetek subpopulacji badanych limfocytów T i B w próbkach krwi pobranych od 42-dniowych ptaków. W 42 dniu życia odsetek limfocytów T CD3⁺CD4⁺ był statystycznie istotnie niższy w próbkach śledziony pobranych od kurcząt z grupy HI-100, niż u kurcząt z grup HI-0 i HI-50. Analiza cytometryczna próbek krwi i śledziony, przeprowadzona w badaniach własnych, nie wykazała wpływu mączki owadziej na odsetek subpopulacji limfocytów B, ale wskazała na wzrost odsetka limfocytów T CD3⁺CD8α⁺ i spadek odsetka subpopulacji komórek CD3⁺CD4⁺. Wyniki te są sprzeczne z badaniami Lee i wsp. (30), w których subpopulacja limfocytów T CD3⁺CD4⁺ rosła istotnie w śledzionie u kurcząt wraz z rosnącym poziomem (1, 2 lub 3 %) białka larw HI w paszy. Z drugiej strony, de Souza Vilela i wsp. (8) zaobserwowali nie tylko ogólny spadek odsetka białych krwinek w analizach hematologicznych, ale także spadek odsetka subpopulacji śródnamionkowych limfocytów T CD3⁺CD8⁺ jelita czczego u kurcząt żywionych paszą z 20 % dodatkiem pełnotłustej mączki z larw HI. Zgodnie z obserwacjami Huo i wsp. (18), profil kwasów tłuszczowych w materiałach paszowych ma istotny wpływ na kształtowanie mechanizmów odpornościowych i stosunek limfocytów T CD4⁺ do CD8⁺. Larwy *Hermetia illucens* charakteryzują się wysoką zawartością kwasu laurynowego, który oprócz właściwości antybakteryjnych, wykazuje działanie immunomodulujące (10). W badaniach własnych nie stwierdzono istotnego wpływu mączki z larw HI na miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko ND i aMPV u 21- i 42-dniowych kurcząt. Natomiast w 42 dniu życia kurczęta brojlery karmione dietą z dodatkiem larw HI (HI-50, HI-75 i HI-100) miały statystycznie istotnie niższe (P<0,05) miana przeciwciał przeciwko IB, w porównaniu do ptaków kontrolnych (HI-0). Oceniając odpowiedź poszczepienną, należy zauważyć, że spośród trzech szczepionek podanych kurczętom doświadczalnym, wirus IB charakteryzuje się najwyższą immunogennością.

Znajduje to odzwierciedlenie w wynikach testów serologicznych: 6-tygodniowe ptaki wykazywały wyraźniejszą serokonwersję na IBV niż ptaki 3-tygodniowe. Jak pokazują nasze obserwacje, podawanie ptakom paszy, w której sojowy komponent białkowy został zastąpiony białkiem larw HI, istotnie obniżało efektywność i skuteczność szczepienia przeciwko IB. Sytuacja ta jest najprawdopodobniej spowodowana niższym dziennym spożyciem paszy, co skutkowało gorszymi przyrostami masy ciała i pogorszeniem ogólnej kondycji ptaków w grupach otrzymujących mączkę owadzią, co przełożyło się na gorsze wyniki produkcyjne, a w konsekwencji osłabioną odporność. Niestety, jak dotąd nie przeprowadzono podobnych badań nad rozwojem odporności poszczepiennej u ptaków karmionych paszami z dodatkiem białka owadziego. Z drugiej strony, wyniki badań własnych korespondują z obserwacjami innych autorów dotyczącymi wpływu niedoborów na odporność poszczepienną u drobiu (5). Na podstawie wybranych parametrów biochemicznych można określić wpływ diety na funkcje wątroby, nerek, kości i mięśni u ptaków (16). Stwierdzono statystycznie istotny wzrost aktywności AST, CK i LDH oraz poziomu UA u 42-dniowych kurcząt, które otrzymywały mączkę z larw HI w porównaniu z ptakami grupy kontrolnej. Ponadto, odnotowano statystycznie istotny wzrost CALC i spadek poziomu PHOS w grupach HI-75 i HI-100 w porównaniu do kurcząt z grupy kontrolnej HI-0. Pomimo istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami w poziomach CALC, PHOS i UA oraz aktywności AST, CK i LDH, wartości tych parametrów nadal mieściły się w zakresach referencyjnych dla tego gatunku drobiu (29). Przedstawione wyniki korespondują z obserwacjami innych autorów. Marono i wsp. (33) odnotowali istotny wzrost poziomu wapnia i spadek poziomu fosforu w surowicy u kur niosek karmionych paszami z dodatkiem mączki HI. Niełatwo jest wyjaśnić statystycznie istotnie podwyższony poziom wapnia we krwi 42-dniowych kurcząt brojlerów z grup HI-75 i HI-100 w porównaniu z grupą HI-0, ponieważ pasze stosowane w doświadczeniu zawierały zbliżone poziomy wapnia. Wydalany kwas moczowy jest głównym azotowym produktem przemiany białek u drobiu. Jego poziom w surowicy odzwierciedla katabolizm białek (16). Badania własne wykazały, że wzrastający poziom mączki z larw HI w paszach korespondował ze wzrostem poziomu UA w surowicy kurcząt. Wyniki te są jednak sprzeczne z wynikami uzyskanymi przez Marono i wsp. (33).

Uzyskane wyniki badań własnych pozwoliły stwierdzić, że mączka z nieodtłuszczonych, całych larw HI stosowana jako substytut białka sojowego w tak dużych ilościach, ma negatywny wpływ na zdrowie kurcząt brojlerów. Niskie wyniki produkcyjne i przeżywalność ptaków doświadczalnych, szczególnie w grupie HI-100,

mogą wskazywać na potrzebę stosowania pasz o niższej zawartości komponentu owadziego niż te stosowane w prezentowanym doświadczeniu. Być może do produkcji pasz dla drobiu należy stosować wyłącznie oczyszczone białka i tłuszcze owadzi, bez pozostałych składników larw owadów, zwłaszcza chityny.

Szczegółowe wyniki opisanych powyżej badań opublikowano w piątej pracy wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

Tykałowski B., Koncicki A., Kowalczyk J., Śmiałek M., Bakuła T., Murawska D., Sobotka W., Stenzel T. *The impact of full-fat Hermetia illucens larvae meal on the health and immune system function of broiler chickens*. Journal of Veterinary Research, 2023, 67 (2), 197-207.

4.2.3. Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań i możliwości wykorzystania ich wyników w wielkotowarowej produkcji drobiu

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano jakie są możliwości modulowania odpowiedzi immunologicznej i podnoszenia sprawności mechanizmów obronnych u drobiu rzeźnego. Jest to o tyle istotne, że zdrowie ptaków utrzymywanych systemem intensywnym w głównej mierze jest uzależnione od stanu funkcjonalnego ich układu immunologicznego, który decyduje o poziomie odporności poszczepiennej i skuteczności leczenia. Z prawidłową funkcją tego układu związane są: ostateczna eliminacja drobnoustrojów chorobotwórczych, stymulacja procesów naprawczych w uszkodzonych tkankach oraz ochrona przed ponownym zakażeniem. Ponadto, w dobie narastania oporności mikroorganizmów na chemioterapeutyki i braku efektów terapeutycznych po ich zastosowaniu, rola i znaczenie sprawnie funkcjonującego układu odpornościowego rośnie. Sytuacja ta bez wątpienia sprawia, iż niezwłocznie muszą być poszukiwane i wprowadzane alternatywne metody leczenia, pozwalające ograniczać stosowanie antybiotyków i kokcydiostatyków u drobiu. Na rynku pojawiła się duża liczba produktów pochodzenia naturalnego w formie mieszanek paszowych uzupełniających dla drobiu, ale i suplementów diety zawierających wtórne metabolity roślinne, jak np. fitoncydy. Wykazują one działanie pierwotniakobójcze, grzybobójcze i grzybobójcze, przeciwwirusowe i antibakteryjne. Wiele z tych substancji wykazuje także właściwości immunomodulujące, co na ogół nie było brane pod uwagę przez producentów w komponowaniu gotowych mieszanek, mających pierwotnie hamować rozwój, np. pierwotniaków, czy określonej grupy bakterii. Mając

powyższe na uwadze podjęto badania zmierzające do oceny wpływu na układ odpornościowy drobiu grzebiącego różnych czynników żywieniowych, w tym fitoncydów oraz zakaźnych. Tak szczegółowa i wnikliwa ocena ich wpływu na funkcjonowanie mechanizmów odpornościowych u ptaków była możliwa przede wszystkim dzięki opracowaniu i zastosowaniu metody cytometrii przepływowej i badania odpowiedzi komórkowej. Należy bowiem podkreślić, że na ogół w tego typu badaniach jest oceniana odporność humoralna, która nie odzwierciedla faktycznej sprawności układu odpornościowego.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Dodatek pełnoziarnistej pszenicy do mieszanek paszowych (50 % ogólnej zawartości pszenicy) wpływa korzystnie na funkcjonowanie układu pokarmowego oraz stymuluje nieswoiste i swoiste mechanizmy obronne u indyków.
2. Forma stosowanej w mieszankach paszowych metioniny (DLM lub MHA) nie ma tak istotnego znaczenia jak dawka tego aminokwasu. Dotyczy to zarówno oznaczanych wskaźników immunologicznych, jak i wyników produkcyjnych. Wyższy o 40 % poziom metioniny w paszach (niż zalecany przez NRC) korzystnie wpływa na badane wskaźniki immunologiczne u zdrowych indyków oraz łagodził skutki zakażenia immunosupresyjnym HEV.
3. Mieszanka paszowa uzupełniająca AdiCox^{SOL} PF posiada właściwości immunomodulujące i może być z powodzeniem stosowana w profilaktyce i terapii histomonozji u indyków oraz do wzmocnienia ich odporności poszczepiennej.
4. Analiza wyników produkcyjnych wskazuje na postępujący negatywny wpływ rosnącej zawartości mączki z pełnotłustych larw Muchy czarnej w mieszankach paszowych na przyrosty masy ciała, wartość współczynnika konwersji paszy (FCR) i przeżywalność kurcząt brojlerów.
5. Analiza cytometryczna próbek krwi i śledziona, przeprowadzona w badaniach własnych, nie wykazała negatywnego wpływu mączki owadziej na odsetek subpopulacji limfocytów B, ale wskazała na wzrost odsetka limfocytów T CD3⁺CD8 α ⁺ i spadek odsetka subpopulacji komórek CD3⁺CD4⁺.

6. Podawanie brojlerom kurzym paszy, w której sojowy komponent białkowy został zastąpiony białkiem z pełnotłustych larw Muchy czarnej, istotnie obniżało efektywność i skuteczność szczepienia przeciwko IB.
7. Mając na uwadze kluczową rolę układu immunologicznego w zwalczaniu patogenów, na podstawie uzyskanych wyników badań własnych można stwierdzić, że immunomodulatory, w tym fitonocydy, stosowane w profilaktyce i terapii chorób drobiu mogą skutecznie ograniczać, a w niektórych przypadkach zastępować lub wspomagać chemioterapię.
8. Opracowanie schematów podawania środków o działaniu immunomodulującym, z równoczesnym monitorowaniem wielu wskaźników odporności humoralnej i komórkowej, jest niezbędne dla uzyskania korzystnych efektów immunomodulacji.

4.2.4. Piśmiennictwo

1. Adedokun S.A., Olojede O.C. *Optimizing Gastrointestinal Integrity in Poultry: The Role of Nutrients and Feed Additives*. Front Vet Sci. 2019, 5:348.
2. Awoniyi T.A.M., Aletor V.A., Aina J.M. *Performance of broiler-chickens fed on maggot meal in place of fishmeal*. Int J Poult Sci. 2003, 2, 271–274.
3. Beer L.C., Petrone-Garcia V.M., Graham B.D., Hargis B.M., Tellez-Isaias G., Vuong C.N. *Histomonosis in Poultry: A Comprehensive Review*. Front Vet Sci. 2022, 9:880738.
4. Bienenstock J., Befus A.D. *Mucosal immunology*. Immunology. 1980, 41(2), 249-270.
5. Chen C., Sander J.E., Dale N.M. *The Effect of Dietary Lysine Deficiency on the Immune Response to Newcastle Disease Vaccination in Chickens*. Avian Dis. 2003, 47, 1346–1351.
6. Clark S., Kimminau E. *Critical review: Future control of blackhead disease (histomoniasis) in poultry*. Avian Dis. 2017, 61, 281–288.
7. Dabbou S., Gai F., Biasato I., Capucchio M.T., Biasibetti E., Dezzutto D., Meneguz M., Placha I., Gasco L., Schavione A. *Black soldier fly defatted meal as a dietary protein source for broiler chickens: Effects on growth performance, blood traits, gut morphology and histological features*. J Anim Sci Biotechnol. 2018, 9:49.
8. de Souza Vilela J., Andronicos N.M., Kolakshyapati M., Hilliar M., Sibanda T.Z., Andrew N.R., Swick R.A., Wilkinson S., Ruhnke I. *Black soldier fly larvae in*

- broiler diets improve broiler performance and modulate the immune system. Anim Nutr.* 2021, 7, 695–706.
9. Dobermann D., Swift J.A., Field L.M. *Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. Nutr Bull.* 2017, 42, 293–308.
 10. Fortuoso B.F., dos Reis J.H., Gebert R.R., Barreta M., Griss L.G., Casagrande R.A., de Cristo T.G., Santiani F., Campigotto G., Rampazzo L., Stefani L.M., Boiago M.M., Lopes L.Q., Santos R.C.V., Baldissera M.D., Zanette R.A., Tomasi T., Da Silva A.S. *Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: impact on health, performance and meat quality. Microb Pathog.* 2019, 129, 161–167.
 11. Ganas P., Liebhart D., Glösmann M., Hess C., Hess M. *Escherichia coli strongly supports the growth of Histomonas meleagridis, in a monoxenic culture, without influence on its pathogenicity. Int J Parasitol.* 2012, 42, 893–901.
 12. Grabensteiner E., Hess M. *PCR for the identification and differentiation of Histomonas meleagridis, Tetratrichomonas gallinarum and Blastocystis spp. Vet Parasitol.* 2006, 142, 223-230.
 13. Guiro S. *Badania nad immunosupresyjną rolą wirusa krwotocznego zapalenia jelit u indyków. Praca doktorska, UWM w Olsztynie, 2000.*
 14. Guiro S., Koncicki A. *Uodpornianie przeciwko NDV indyków zakażonych wirusem krwotocznego zapalenia jelit. Med Weter.* 2004, 60, 871-873.
 15. Hafez M.H., Houck R. *Efficacy of a herbal product against Histomonas meleagridis after experimental infection of turkey poults. Arch Anim Nutr.* 2006, 60, 436–442.
 16. Harr K.E. *Clinical chemistry of companion avian species: A review. Vet Clin Path.* 2002, 31, 140–151.
 17. Hu J., Fuller L., McDougald L.R. *Infection of turkeys with Histomonas meleagridis by the cloacal drop method. Avian Dis.* 2004, 48, 746–750.
 18. Huo W., Li M., Wang J., Wang Z., Huang Y., Chen W. *On growth performance, nutrient digestibility, blood T lymphocyte subsets, and cardiac antioxidant status of broilers. Anim Nutr.* 2019, 5, 68–73.
 19. Jankowski J., Kubińska M., Zduńczyk Z. *Nutritional and immunomodulatory function of methionine in poultry diets—a review. Ann Anim Sci.* 2014, 14, 17–32.
 20. Jankowski J., Zduńczyk Z., Mikulski D., Przybylska-Gornowicz B., Sosnowska E., Juśkiewicz J. *Effect of whole wheat feeding on gastrointestinal tract development and performance of growing turkeys. Anim Feed Sci Technol.* 2013, 185, 150-159.

21. Kasahara Y., Chen C.L., Gobel T.W.F., Bucy R.P., Cooper M.D. *Intraepithelial lymphocytes in birds*. W: *Mucosal Immunology: Intraepithelial lymphocytes*, eds. H. Kiyono, J.R. McGhee, Raven Press, New York, 1993, 163–174.
22. Khan S., Khan R.U., Alam W., Sultan A. *Evaluating the nutritive profile of three insect meals and their effects to replace soya bean in broiler diet*. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018, 102, 662-668.
23. Khare T., Anand U., Dey A., Assaraf Y.G., Chen Z.S., Liu Z., Kumar V. *Exploring Phytochemicals for Combating Antibiotic Resistance in Microbial Pathogens*. *Front Pharmacol.* 2021, 12:720726.
24. Klasing K.C. *Nutrition and the immune system*. *Br Poult Sci.* 2007, 48(5), 525-537.
25. Klasing K.C. *Nutritional modulation of resistance to infectious diseases*. *Poult Sci.* 1998, 77(8), 1119-1125.
26. Koncicki A. *Pierwsze przypadki adenowirusowego krwotocznego zapalenia jelit indyków w Polsce*. *Med Weter.* 1990, 46, 16-17.
27. Koncicki A. *Charakterystyka krajowych izolatów adenowirusa krwotocznego zapalenia jelit (HE) indyków i ocena sytuacji epizootycznej w Polsce*. Rozprawa habilitacyjna. *Acta Acad Agricult Tech Olst Veterinaria*, 1996, 22, 1-43.
28. Koncicki A., Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Stenzel T. *The influence of phytoncides on the immune system of broiler chickens and turkeys*. *Cent Eur J Immunol.* 2015, 40, 287-291.
29. Krasnodębska-Depta A., Koncicki A. *Diagnostyka hematologiczna i biochemiczna*. W: *Choroby drobiu* Wydanie III, red. M. Mazurkiewicz, A. Wieliczko, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, 2019, 889–909.
30. Lee J., Kim Y.M., Park Y.K., Yang Y.C., Jung B.G., Lee B.J. *Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae enhances immune activities and increases survivability of broiler chicks against experimental infection of *Salmonella Gallinarum**. *J Vet Med Sci.* 2018, 80, 736–740.
31. Li Z., Nestor K.E., Saif Y.M., Anderson J.W., Patterson R.A. *Effect of selection for increased body weight in turkeys on lymphoid organ weights, phagocytosis, and antibody responses to fowl cholera and Newcastle disease-inactivated vaccines*. *Poult Sci.* 2001, 80(6), 689-694.
32. Lillehoj H.S. *Lymphocytes involved in cell-mediated immune responses and methods to assess cell-mediated immunity*. *Poult Sci.* 1991, 70, 1154-1164.

33. Marono S., Loponte R., Lombardi P., Vassalotti G., Pero M.E., Russo F., Gasco L., Parisi G., Piccolo G., Nizza S., Di Meo C., Attia Y.A., Bovera F. *Productive performance and blood profiles of laying hens fed Hermetia illucens larvae meal as total replacement of soybean meal from 24 to 45 weeks of age*. Poultry Sci. 2017, 96, 1783-1790.
34. McDougald L.R. *Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review*. Avian Dis. 2005, 49, 462–476.
35. Montout L., Pouillet N., Bambou J.C. *Systematic Review of the Interaction between Nutrition and Immunity in Livestock: Effect of Dietary Supplementation with Synthetic Amino Acids*. Animals, 2021, 11(10):2813.
36. National Research Council: *Nutrient requirements of poultry*. 9th ed. National Academy Press, Washington, D.C., 1994.
37. Qureshi M.A., Havenstein G.B. *A comparison of the immune performance of a 1991 commercial broiler with a 1957 randombred strain when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets*. Poultry Sci. 1994, 73(12), 1805-1812.
38. Rautenschlein S., Sharma J.M. *Response of turkeys to simultaneous vaccination with hemorrhagic enteritis and Newcastle disease viruses*. Avian Dis. 1999,43:286-292.
39. Rautenschlein S., Sharma J.M. *Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys*. Dev Comp Immunol. 2000, 24, 237-246.
40. Rautenschlein S., Suresh M., Sharma J.M. *Pathogenic avian adenovirus type II induces apoptosis in turkey spleen cells*. Arch Virol. 2000, 145, 1671-1683.
41. Rougière N., Carré B. *Comparison of gastrointestinal transit times between chickens from D+ and D– genetic lines selected for divergent digestion efficiency*. Animal, 2010, 4(11), 1861-1872.
42. Rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1372 z dnia 17 sierpnia 2021 r. zmieniające załącznik IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 w odniesieniu do zakazu karmienia zwierząt gospodarskich innych niż przeżuwacze, innych niż zwierzęta futerkowe, białkiem pochodzącym od zwierząt.
43. Różański H., Abramowicz-Pindor P., Cichocka E., Drymel W. *Fitoncydy i fitoaleksyny w chowie i hodowli drobiu*. Przegląd Hodowlany, 2020, 5, 31-33.
44. Rumińska E., Koncicki A., Stenzel T. *Budowa i funkcjonowanie układu odpornościowego u ptaków*. Med Weter. 2008, 64, 265-268.

45. Saif Y.M., Nestor K.E. *Increased mortality in turkeys selected for increased body weight following vaccination with a live Newcastle disease virus vaccine*. Avian Dis. 2002, 46(2), 505-508.
46. Sánchez-Muros M.J., Barroso F.G., Manzano-Agugliaro F. *Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review*. J Clean Prod. 2014, 65, 16–27.
47. Saunders G.K., Pierson F.W., van den Hurk J.V. *Haemorrhagic enteritis virus infection in turkeys: a comparison of virulent and avirulent virus infections, and a proposed pathogenesis*. Avian Pathol. 1993, 22, 47-58.
48. Singh K.C., Dhawedkar R.G. *Immunomodulating effects of levamisole in chicks immunocompromised by infectious bursal disease virus*. Trop Anim Health Prod. 1993, 25, 11-14.
49. Smulikowska S., Rutkowski A. *Recommended Allowances and Nutritive Value of Feedstuffs. Poultry Feeding Standards*. 4th ed. The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna, 2005.
50. Smulikowska S., Rutkowski A. *Recommended Allowances and Nutritive Value of Feedstuffs. Poultry Feeding Standards*. 5th ed. The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna, 2018, s. 52.
51. Suresh M., Sharma J.M. *Hemorrhagic enteritis virus induced changes in the lymphocyte subpopulations in turkeys and the effect of experimental immunodeficiency on viral pathogenesis*. Vet Immunol Immunopathol. 1995, 45, 139-150.
52. Suresh M., Sharma J.M. *Pathogenesis of type II avian adenovirus infection in turkeys: in vivo immune cell tropism and tissue distribution of the virus*. J Virol. 1996, 70, 30-36.
53. Thøfner I.C.N., Liebhart D., Hess M., Schou T.W., Hess C., Ivarsen E., Fretté X.C., Christensen L.P., Grevsen K., Engberg R.M., Christensen J.P. *Antihistomonal effects of artemisinin and artemisia annua extracts in vitro could not be confirmed by in vivo experiments in turkeys and chickens*. Avian Pathol. 2012, 41, 487–496.
54. Truong H.H., Moss A.F., Liu S.Y., Sellea P.H. *Pre-and post-pellet whole grain inclusions enhance feed conversion efficiency, energy utilization and gut integrity in broiler chickens offered wheat-based diets*. Anim Feed Sci Tech. 2017, 224, 115–123.

55. Tykałowski B. Koncicki A. *Badania and rolą adenowirusa krwotocznego zapalenia jelit w patologii indyków prowadzone w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie w okresie ostatnich 30 lat.* Med Weter. 2017, 73 (9), 522-527.
56. van Huis A., van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., Vantomme P. FAO Forestry Paper 171, *Edible insects: Future prospects for food and feed security.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2013.
57. Veldkamp T., Bosch G. *Insects A protein-rich feed ingredient in pig and poultry diets.* Anim Front. 2015, 5, 45–50.
58. Wójcik R., Świącicka-Grabowska G. *Parametry biochemiczne oraz odporności nieswoistej u indyków uodpornionych szczepem Roakin wirusa NDV po podaniu lewamizolu lub izoprynozyny.* Med Weter. 2003, 59, 713-717.
59. Wu G. *Functional amino acids in nutrition and health.* Amino Acids. 2013, 45, 407-411.

4.3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

4.3.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

W trakcie ostatnich dwóch lat studiów weterynaryjnych oraz podczas realizacji studiów doktoranckich moje zainteresowania związane były z szeroko pojętą immunologią zwierząt, w tym wpływem różnych czynników na funkcjonowanie mechanizmów obronnych oraz możliwości oceny statusu immunologicznego zwierząt w stanach fizjologii i patologii. Moja praca naukowa w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie, koncentrowała się wokół kilku głównych obszarów badawczych:

I. Zastosowanie nowoczesnych metod w badaniach układu immunologicznego u zwierząt

Po rozpoczęciu studiów doktoranckich odbyłem cykl szkoleń stanowiskowych z obsługi analogowego cytometru przepływowego EPICS XL (Baekman Coulter, USA) oraz z obsługi oprogramowania do analizy danych cytometrycznych. W związku z tym,

że erytrocyty i trombocyty u ptaków są komórkami jądrzastymi, przygotowywanie próbek do badań cytometrycznych jest odmienne od standardowego postępowania stosowanego w przypadku badania krwi ssaków. Początkowo badałem możliwości i techniki izolacji limfocytów z krwi i narządów immunologicznych różnych gatunków ptaków z wykorzystaniem odczynników dostępnych w owym czasie na rynku. Metodę lizowania erytrocytów kur i indyków, po barwieniu przeciwciałami znakowanymi fluorochromami z zastosowaniem odczynnika Immuno-prep reagents (Immunotech, USA) i automatycznej stacji Q-prep Immunology Workstation (Beckman Coulter, USA), badałem w Zakładzie Immunologii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Uzyskane wyniki oraz własne zaangażowanie pozwoliły w krótkim czasie na pozyskanie środków i zakup takiej stacji do Katedry Chorób Ptaków i wdrożenie tej metody do pracy w laboratorium immunologicznym. Badałem także powinowactwo przeciwciał monoklonalnych (różnych klonów) i poliklonalnych (dedykowanych przez kilku producentów do znakowania komórek kurcząt) do barwienia limfocytów wyizolowanych od innych gatunków ptaków, w szczególności od indyków i gołębi. Opracowałem metody barwienia wewnątrzkomórkowego limfocytów ptaków z zastosowaniem zestawu Leucoperm (Serotec). Opracowałem także metodę wewnątrzkomórkowego znakowania cytokin w limfocytach T ptaków. Odbyłem także szkolenia w zakresie zastosowania metody ELISA w diagnostyce serologicznej u drobiu w Warszawskiej Akademii Zastosowań Monitoringu Serologicznego WAMSER. Opanowałem warsztat badawczy pracowni serologicznej Katedry Chorób Ptaków oraz metod analizy danych w środowisku oprogramowania xChek (Idexx, USA). Na początku 2009 roku ukończyłem także 3-dniowy kurs pt. „Molekularne metody badań w mikrobiologii i wirusologii” na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi. Po zakupie pod koniec 2009 roku, do Katedry Chorób Ptaków cyfrowego cytometru przepływowego FACSCanto II i sortera komórek FACSAria II (Becton Dickinson), odbyłem kolejne szkolenia stanowiskowe z obsługi tych aparatów oraz w lutym 2010 roku, 5-dniowy kurs w Belgii z obsługi i możliwości zastosowania sortera komórek FACSAria II w badaniach naukowych oraz z obsługi oprogramowania do analizy i akwizycji danych cytometrycznych FACSDiva Software. Szkolenie to odbyłem pod kierunkiem naukowym dr Geralda Pfistera. W 2010 roku nawiązałem współpracę z prof. dr hab. Radosławem Śpiewakiem, kierownikiem Zakładu Dermatologii Doświadczalnej i Kosmetyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, która zaowocowała wprowadzeniem techniki ELISPOT do laboratorium immunologicznego Katedry

Chorób Ptaków. W 2011 roku przygotowałem stosowny wniosek do Funduszu Nauki i Technologii Polskiej i dzięki uzyskaniu finansowania pracownia immunologiczna, której pracę koordynuję do dnia dzisiejszego, powiększyła swój zakres badawczy o technikę cytometrii obrazowej w technologii Image Stream (Amnis, USA). Poza cytometrem obrazowym, Fundusz Nauki i Technologii Polskiej sfinansował także zakup pierwszego w Polsce automatycznego analizatora żywotności komórek Vi-cell XR (Beckman Coulter, USA). Jak dotąd nie ma w naszym kraju tak doskonale wyposażonego laboratorium badań immunologicznych ptaków, które daje możliwość wszechstronnego i wielokierunkowego badania zmian zachodzących w układzie odpornościowym ptaków pod wpływem różnych czynników zakaźnych i niezakaźnych (praca 4.3.1.I-1). Dzięki dużemu zaangażowaniu we wdrażanie cytometrii przepływowej do nauk weterynaryjnych zostałem dostrzeżony i zaproszony do członkostwa w Polskim Towarzystwie Cytometrii, z którym organizowałem sesje nt. pozamedycznych i weterynaryjnych zastosowań cytometrii przepływowej podczas konferencji Polskiego Towarzystwa Cytometrii.

4.3.1.I-1. Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Nowoczesne wyposażenie laboratoriów kluczowym narzędziem w diagnostyce chorób drobiu*. Polskie Drobiarstwo, 2022, 1, 32–33. (MNiSW/MEiN=5; IF-)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zebraniu piśmiennictwa oraz napisaniu manuskryptu. Swoją udział procentowy szacuję na 95%.

II. Wpływ immunomodulacji na układ odpornościowy ptaków

Opanowanie warsztatu badawczego i opracowanie autorskich metod badawczych pozwoliło mi wziąć udział w realizacji wielu doświadczeń i projektów badawczych. Na szczególną uwagę zasługują doświadczenia związane z immunomodulacją u drobiu grzebiącego i gołębi.

Na początku mojej kariery naukowej w Katedrze Chorób Ptaków brałem udział w innowacyjnym doświadczeniu polegającym na immunomodulacji u zarodków indyckich metodą *in ovo*. Do zależonych jaj indyckich podawano w 26 dobie inkubacji różne dawki (5, 10 i 20 mg/zarodek) methizoprinolu i badano jego wpływu na wylęgowość i status zdrowotny piskląt oraz strukturę ich śledziony i torby Fabrycjusza. Badano także wpływ tak podanego immunomodulatora na odsetek subpopulacji limfocytów T CD3⁺, CD4⁺ i CD8⁺ we krwi i śledzionie u 5-dniowych piskląt indyckich

metodą cytometrii przepływowej. Ponadto, badano odpowiedź immunologiczną i wrażliwość na zakażenie wirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV) indycząt wyklutych z jaj immunizowanych *in ovo* szczepionką przeciwko HEV, do których aplikowano jednocześnie tą drogą methizoprinol.

Methizoprinol (*Inosinum pranobexum*) jest kompleksem 1 cząsteczki inozyliny z 3 cząsteczkami N,N-dimetyloamino-2-propanolo-p-acetamidobenzoesanu. Jest to lek stosowany w medycynie człowieka, w terapii zakażeń wywołanych przez wirusy opryszczki, ospy wietrznej, grypy, świnki, odry, HIV, a także w półpaścu oraz w innych zakażeniach wirusowych o powikłanym przebiegu, zwłaszcza u chorych z obniżoną odpornością. Oprócz tego methizoprinol posiada także właściwości modulujące naturalną odporność organizmu, co nasila jej efekt przeciwwirusowy. W ciągu ostatnich kilku lat lek ten przeżywa prawdziwy renesans i jest stosowany powszechnie jako immunostymulator i lek przeciwwirusowy w medycynie człowieka i coraz częściej u zwierząt (szczególnie towarzyszących). Był także stosowany u osób zakażonych wirusem SARS-CoV-2 w pierwszej fazie pandemii COVID-19.

W badaniach wykazano, że methizoprinol zastosowany u zarodków indyckich *in ovo* w 26 dobie inkubacji, bez względu na wielkość dawki (5, 10 lub 20 mg/zarodek), nie wywoływał zaburzeń w procesie lęgu i nie wpływał negatywnie na stan zdrowotny odchowywanych indycząt. Nie odnotowano wpływu tego immunomodulatora na aktywność AST, ALP, LDH, CK, lizozymu oraz poziom białka całkowitego i ceruloplazminy w surowicy wyklutych indycząt (praca 4.3.1.II-1). Zastosowany w dawce 5 mg na jajo (zarodek) pobudzał u wylęzonych z takich jaj 5-dniowych indycząt mechanizmy obronne, czego wyrazem był wzrost odsetka limfocytów T CD3⁺ i CD4⁺ we krwi obwodowej i w śledzionie (praca 4.3.1.II-2) oraz zwiększenie liczby grudek chłonnych w torbie Fabrycjusza (praca 4.3.1.II-3). Z kolei dawka 20 mg/zarodek powodowała wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ w śledzionie oraz wzrost liczby centrów rozrodczych miazgi białej w tym narządzie (praca 4.3.1.II-4). W doświadczeniach wykazano także, że skuteczne jest uodpornianie indyków przeciwko krwotocznemu zapaleniu jelit stosując szczepionkę żywą atenuowaną Dindoral SPF (Merial, Francja) metodą *in ovo*. Z przeprowadzonych badań wynika także, że jednoczesne stosowanie *in ovo* methizoprinolu i szczepionki Dindoral SPF hamuje powstawanie odporności poszczepiennej przeciwko HEV. Wynika z tego, że methizoprinol skutecznie hamuje replikację wirusa szczepionkowego, co manifestowało się zahamowaniem rozwoju odporności poszczepiennej u immunizowanych zarodków

indycznych. Zarodki szczepione przeciwko HEV, które nie otrzymały methizoprinolu budowały dobrą odporność poszczepienną (praca 4.3.1.II-5).

Methisoprinol był także stosowany jako jeden z immunomodulatorów podczas realizacji projektu badawczego nr N N308 221233 pt. „Wpływ różnych immunomodulatorów na wybrane parametry swoistej i nieswoistej u gołębi”. W trakcie badań określono potencjalny wpływ trzech immunomodulatorów: methizoprinolu, β -glukanów i lewamizolu na kształtowanie się odsetka subpopulacji limfocytów T ($CD3^+$, $CD4^+$ i $CD8^+$) we krwi i śledzionie, a także na miano przeciwciał przeciwko paramyksowirusowi gołębi (PPMV-1). β -glukany oraz lewamizol stymulowały odporność humoralną, co manifestowało się wzrostem miana przeciwciał przeciwko PPMV-1. 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 (300 mg/kg) dawki tego immunomodulatora. Wyniki opisywanych badań opublikowano w pracy 4.3.1.II-6.

W kolejnym doświadczeniu ustalono immunostymulującą dawkę methizoprinolu u gołębi. Badania wykonano w analogicznym układzie a ptaki otrzymywały izoprynozynę w dawkach 100 mg, 200 mg lub 600 mg na kg m.c. 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 limfocytów T $CD4^+$ zarówno w krwi obwodowej, jak i śledzionie. Najmniej korzystne efekty uzyskano stosując ten immunomodulator w dawce 600 mg/kg m.c. Nie odnotowano natomiast żadnych statystycznie istotnych różnic w odsetku limfocytów T $CD8^+$ w krwi obwodowej i śledzionie. Podobnie nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w kształtowaniu się mian przeciwciał przeciwko PPMV-1, mimo że u gołębi 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 4.3.1.II-7.

Następnie przeprowadzono doświadczenie zmierzające do potwierdzenia przeciwwirusowego działania methizoprinolu u gołębi zakażonych eksperymentalnie PPMV-1. Ptaki zakażono krajowym izolatem tego wirusa (APMV-1/pigeon/Poland/AR3/95). Gołębiom podano methizoprinol w dawce 200 mg na kg m.c. na 3 dni przed lub 3 dni po zakażeniu eksperymentalnym. 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 (PCR). 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 dobie po zakażeniu. W kolejnych dniach odsetek próbek, w których wykryto materiał genetyczny PPMV-1 wzrósł do blisko 100 % u ptaków ze wszystkich grup, za wyjątkiem próbek nerek i płuc gołębi otrzymujących metizoprinol po zakażeniu. Również w tej grupie wykazano najniższą śmiertelność. Badania pozwoliły stwierdzić, że metizoprinol w dawce 200 mg na kg m.c. podany po zakażeniu eksperymentalnym PPMV-1 wykazuje aktywność przeciwwirusową, co manifestowało się wolniejszym rozwojem i łagodniejszym przebiegiem paramyksowirozy u gołębi. Główny wniosek z przeprowadzonych badań sugeruje, że metizoprinol może być stosowany jako alternatywny lek w terapii chorób wirusowych gołębi (praca 4.3.1.II-8).

Po przeanalizowaniu wyników stosowania methizoprinolu u zarodków indyckich i u gołębi oraz znając jego potencjalne działanie przeciwwirusowe, postanowiono sprawdzić czy ten immunomodulator może być stosowany profilaktycznie i/lub terapeutycznie u indyków w przebiegu krwotocznego zapalenia jelit (HE). Użyty do zakażenia eksperymentalnego adenowirus krwotocznego zapalenia jelit (HEV) jest drobnoustrojem powszechnie występującym i odgrywającym dużą rolę w patologii tego gatunku drobiu w naszym kraju i na świecie. Krajowe izolaty tego wirusa należą do mało patogennych, jednak pomimo to silnie upośledzają humoralną i komórkową reaktywność układu immunologicznego. Stąd pomysł aby u zakażonych tym wirusem indyków zastosować immunomodulację. Poza methizoprinolem wykorzystano także drugi, naturalny immunomodulator - β -glukany izolowane z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W trzech doświadczeniach podawano indykom methizoprinol *per os* w dawce 200 mg/kg m.c. lub β -glukany w dawce 171 mg/kg paszy w różnych układach - przed, po lub przed i po zakażeniu wirusem HE. Uzyskane wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że methizoprinol podawany przez 3 dni przed lub przez 5 dni po zakażeniu eksperymentalnym immunosupresyjnym wirusem HE stymuluje u zakażonych indyków mechanizmy odporności komórkowej, czego wyrazem był wyższy odsetek subpopulacji limfocytów T $CD3^+CD8\alpha^+$ oraz limfocytów B IgM^+ w ich krwi. Methizoprinol stosowany przez 3 dni przed i/lub przez 5 dni po zakażeniu a także β -glukany suplementowane przez 14 dni przed oraz 14 dni przed i 5 dni po infekcji wykazywały u zakażonych indyków działanie przeciwwirusowe, co wynika z mniejszej liczby próbek,

w których wykryto metodą PCR obecność materiału genetycznego wirusa HE, a także istotnie zwiększały syntezę IFN- γ przez limfocyty CD4⁺ wyizolowane z ich śledzion (praca 4.3.1.II-9). Ograniczały również spadek odsetka limfocytów B IgM⁺ w śledzionie. Ponadto methizoprinol zastosowany przez 3 dni przed lub przez 5 dni po zakażeniu eksperymentalnym i β -glukany suplementowane do paszy przez 14 dni przed i/lub przez 5 dni po zakażeniu wykazywały u zakażonych osobników właściwości immunokorygujące, czego dowodem było zahamowanie patologicznego wzrostu odsetka limfocytów T CD3⁺CD4⁺ w śledzionie. Immunomodulatory te powodowały u niezakażonych indyków istotny wzrost odsetka subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD4⁺ w śledzionie a także limfocytów T CD3⁺CD8 α ⁺ i limfocytów B IgM⁺ we krwi.

Opisane badania były w 70 % realizowane w ramach rozwojowego projektu badawczego nr N N308 229636 pt. „Wpływ metizoprinolu i β -glukanów na wybrane parametry odporności nieswoistej i wskaźniki biochemiczne krwi oraz na przebieg zakażenia adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV) u indyków”, którego byłem wykonawcą oraz w 30 % w ramach otrzymanych stypendiów DrINNO i DrINNO 2, finansowanych przez samorząd województwa warmińsko-mazurskiego i współfinansowanych przez UE ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki”. Wyniki omówionych wyżej badań przedstawiłem w mojej rozprawie doktorskiej pt. „Wpływ methizoprinolu i β -glukanów na wybrane parametry odporności nieswoistej oraz na przebieg zakażenia adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV) u indyków” (promotor: prof. dr hab. Andrzej Krzysztof Siwicki), którą obroniłem z wyróżnieniem 06.07.2012 roku na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie.

4.3.1.II-1. Tykałowski B., Stenzel T., Mazur-Lech B., Andrzejewski M., Koncicki A. *The influence of methisoprinol applied in ovo upon hatchability and health status of turkeys.* Polish Journal of Veterinary Sciences, 2009, 12 (2), 203–207.

(MNiSW/MEiN= 15; IF=0,435)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń biochemicznych surowicy, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, zebraniu piśmiennictwa, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 75%.

4.3.1.II-2. Stenzel T., Tykałowski B., Andrzejewski M., Koncicki A. *Wpływ metisoprinolu zastosowanego in ovo na odsetek subpopulacji limfocytów T CD3⁺, CD4⁺ i CD8⁺ u indyków.* Medycyna Weterynaryjna, 2008, 64 (12), 1157–1160.

(MNiSW/MEiN=10; IF-)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badania cytometrycznego, pomocy w wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej, pomocy w interpretacji uzyskanych wyników. Swój udział procentowy szacuję na 20%.

4.3.1.II-3. 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 the Veterinary Institute in Pulawy, 2009, 53(4), 471–474. **(MNiSW/MEiN=15; IF=0,218)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badania histologicznego, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, zebraniu piśmiennictwa oraz przygotowaniu manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 75%.

4.3.1.II-4. Stenzel T., Tykałowski B., Lewczuk B., Przybylska-Gornowicz 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 (2), 225–231.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,507)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badania histologicznego, pomocy w interpretacji wyników oraz udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 15%.

4.3.1.II-5. 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 the Veterinary Institute in Pulawy, 2009, 53 (1), 13–15.

(MNiSW/MEiN=15; IF=0,218)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badania cytometrycznego, wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej, pomocy w

interpretacji uzyskanych wyników, zebraniu piśmiennictwa oraz udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na **30%**.

4.3.1.II-6. 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 titers in pigeons immunised against PPMV-1.* Polish Journal of Veterinary Sciences, 2011, 14 (3), 367–371.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,565)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badania cytometrycznego, pomocy w wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej, pomocy w interpretacji uzyskanych wyników. Swój udział procentowy szacuję na **20%**.*

4.3.1.II-7. 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 titers in pigeons immunised against PPMV-1.* Medycyna Weterynaryjna, 2011, 67 (4), 254–257.

(MNiSW/MEiN=10; IF-)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badania cytometrycznego, pomocy w wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej, pomocy w interpretacji uzyskanych wyników. Swój udział procentowy szacuję na **20%**.*

4.3.1.II-8. 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 (4), 219–223.

(MNiSW/MEiN=15; IF=0,218)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, pomocy w interpretacji uzyskanych wyników. Swój udział procentowy szacuję na **15%**.*

4.3.1.II-9. Tykałowski B., Koncicki A. *Effect of immunomodulation in turkeys infected with haemorrhagic enteritis virus on the percentage of CD4⁺ and CD8α⁺ T lymphocyte subpopulation synthesizing IFN-γ.* Journal of Veterinary Research, 2022, 66 (4), 537–547.

(MNiSW/MEiN=140; IF=2,058)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, pobraniu materiału do badań, wykonaniu wszystkich oznaczeń laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, zebraniu piśmiennictwa oraz przygotowaniu manuskryptu. Swoją udział procentowy szacuję na 95%.

III. Badania nad wpływem czynników żywieniowych na układ immunologiczny u drobiu grzebiącego

Znaczną część mojej pracy naukowej zajmowały badania wpływu dodatków żywieniowych wykorzystywanych w produkcji drobiarskiej na układ immunologiczny ptaków. Było to możliwe po nawiązaniu współpracy z Katedrą Drobiarstwa Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UWM w Olsztynie oraz z Zakładem Biologicznych Funkcji Żywności IRZiBŻ PAN w Olsztynie.

W jednym z wspólnych doświadczeń badano wpływ różnych poziomów chlorku sodu w paszach na kształtowanie się odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz CD4⁺CD8⁺ w krwi obwodowej, a także na poziom makroelementów (Na, K, Cl, Ca, P i Mg) w surowicy u 35-dniowych kurcząt brojlerów. Ptaki doświadczalne karmiono przez 5 tygodni paszą zawierającą różne poziomy NaCl (od 0 do 0,636). Badania wykazały, że zastosowanie różnego stężenia chlorku sodu w paszy dla kurcząt brojlerów nie ma istotnego wpływu na kształtowanie się odsetka badanych subpopulacji limfocytów T we krwi. Wykazano natomiast, że pasza nie zawierająca dodatku chlorku sodu spowodowała istotne obniżenie w surowicy u kurcząt poziomu sodu i chlorków oraz wzrost poziomu potasu, wapnia i magnezu. Niski poziom sodu w paszach powodował także istotne zahamowanie wzrostu kurcząt. Wyniki tych badań opublikowano w pracy 4.3.1.III-1.

Uczestniczyłem również w badaniach nad wpływem różnych form suplementowanego selenu na układ immunologiczny młodych indyków rzeźnych. 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/1kg) lub organicznego (komercyjny preparat Sel-Plex, Alltech). Badania cytometryczne nie wykazały różnic w kształtowaniu się odsetka limfocytów T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ oraz B IgM⁺. 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 wylężonych z jaj indyczek otrzymujących paszę z seleninem sodu. Dodatek organicznej formy selenu wpływał również na zwiększenie koncentracji tego pierwiastka w mięśniach piersiowych oraz powodował 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 jajach oraz u wyklutych piskląt i nie ma negatywnego wpływu na ich układ immunologiczny (praca 4.3.1.III-2).

4.3.1.III-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 the Veterinary Institute in Pulawy, 2011, 55 (2), 333–337.

(MNiSW/MEiN= 20; IF=0,414)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, interpretacji uzyskanych wyników, zebraniu piśmiennictwa, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 75%.

4.3.1.III-2. Jankowski J., Zduńczyk Z., Sartowska K., Tykałowski B., Stenzel T., Wróblewska M., Koncicki A. *Metabolic and immune response of young turkeys originating from parent flocks fed diets with inorganic or organic selenium*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2011, 14 (3), 353–358.

(MNiSW/MEiN= 20; IF=0,565)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowaniu wniosków. Swój udział procentowy szacuję na 15%.

IV. Badania nad wpływem czynników zakaźnych na układ immunologiczny ptaków

Szeroko badanym w Katedrze Chorób Ptaków UWM w Olsztynie patogenem jest krajowy izolat adenowirusa krwotocznego zapalenia jelit (HEV) indyków (praca 4.3.1.IV-1). Od chwili uruchomienia w Katedrze pracowni cytometrii przepływowej badania nad tym wirusem rozszerzono o aspekt immunologiczny wywoływanych przez niego infekcji. Prace badawcze, w których brałem udział dotyczyły wpływu zakażenia HEV indyków rzeźnych na wybrane parametry odporności komórkowej oraz przebieg kolibakteriozy. Badania te wykazały, że 5 dni po zakażeniu HEV odsetek limfocytów T CD3⁺CD8⁺ oraz B IgM⁺ w śledzionie indyków był istotnie niższy niż u ptaków niezakażonych. Natomiast odsetek subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD4⁺ w tym narządzie patologicznie rósł pod wpływem zakażenia HEV. Wykazano również, że przebieg eksperymentalnie wywołanej kolibakteriozy był znacznie cięższy u indyków zakażonych krajowym izolatem HEV, ptaki z tej grupy charakteryzowały się też niższą masą ciała i gorszym współczynnikiem wykorzystania paszy (FCR), co potwierdziło jego immunosupresyjne właściwości. Wyniki tych badań opublikowano w pracy 4.3.1.IV-2 oraz zaprezentowałem je (Keynote Speaker) podczas XI międzynarodowej konferencji „Turkey Times Science and Production Conference” w Anglii.

4.3.1.IV-1. Tykałowski B. Koncicki A. *Badania and rolę adenowirusa krwotocznego zapalenia jelit w patologii indyków prowadzone w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie w okresie ostatnich 30 lat.* Medycyna Weterynaryjna, 2017, 73 (9), 522–527.

(MNiSW/MEiN=15; IF=0,197)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zebraniu piśmiennictwa, przeanalizowaniu wszystkich uzyskanych wyników badań własnych (opublikowanych i nieopublikowanych) oraz innych autorów, wyciągnięciu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Swoją udział procentowy szacuję na 95%.

4.3.1.IV-2. 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 (2), 215–220.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,570)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badania cytometrycznego, wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływową, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków. Swój udział procentowy szacuję na 25%.

V. Aktualne problemy w patologii drobiu, gołębi i ptaków wolnożyjących

W ramach prowadzonych zajęć praktycznych z przedmiotu „Choroby ptaków” dla studentów kierunku weterynaria w fermach wielkotowarowych drobiu, zainteresowałem się etiopatogenezą najczęściej występujących chorób drobiu. Efektem tego było współautorstwo pracy przeglądowej, opisującej etiologię chorób układu krążenia takich jak kardiomiopatia rozstrzeniowa u indyków, samorzutne pęknięcie tętnic oraz syndrom krwawień okołonerkowych (praca 4.3.1.V-1). W drugiej pracy przeglądowej (praca 4.3.1.V-2) opisałem niezwykle złożone zagadnienia dotyczące budowy i funkcjonowania tkanki kostnej u ptaków utrzymywanych w warunkach chowu intensywnego, co w przypadku niskiego poziomu dobrostanu predysponuje do wystąpienia chorób układu lokomotorycznego skutkujących dużymi stratami ekonomicznymi producentów drobiu.

Z kolei u ptaków wolnożyjących trafiających do Katedry Chorób Ptaków pomagałem prowadzić badania monitoringowe (serologiczne) wybranych chorób zakaźnych groźnych dla drobiu. 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 w 25-87 % badanych surowic (w zależności od gatunku ptaków) występowały przeciwciała przeciwko *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis. Wyniki tych badań opisano w pracy 4.3.1.V-3.

Brałem także udział w badaniach rozprzestrzeniania się wybranych infekcji wirusowych u gołębi w Polsce. Miały one na celu ocenę częstości występowania zakażeń adeno-, cirko- i herpeswirusami w stadach gołębi na terenie całego kraju. Łącznie przebadano 107 stad, z czego 61 % stanowiły gołębie pocztowe, a 39 % gołębie ozdobne. Gołębie podzielono na grupy w zależności od rasy (gołębie pocztowe i ozdobne), a także kondycji fizycznej (zdrowe i chore). W badanych stadach gołębi najczęściej wykrywany był (44,5-100 % próbek pozytywnych, w zależności od grupy) materiał genetyczny cirkowirusa gołębi (PiCV), materiał genetyczny herpeswirusa

gołębi (PiHV) był drugi pod względem częstotliwości (0-30 % próbek pozytywnych), podczas gdy materiał genetyczny adenowirusa gołębi (PiAV) stwierdzono tylko w dwóch stadach młodych ptaków z objawami klinicznymi zespołu choroby młodych gołębi (YPDS). Uzyskane wyniki wskazują na szerokie rozprzestrzenienie PiCV w stadach gołębi w Polsce i potwierdzają obserwacje innych autorów, że immunosupresja wywołana zakażeniem tym wirusem jest jedną z głównych przyczyn wywołujących YPDS. Wyniki tych badań opisano w pracy 4.3.1.V-4.

4.3.1.V-1. Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Cardiovascular system diseases in turkeys*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2008, 11 (3), 245–250.

(MNiSW/MEiN=10; IF=0,465)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomocy w zebraniu i analizie piśmiennictwa oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swoj udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.1.V-2. Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Wybrane zagadnienia dotyczące procesów kostnienia i ich zaburzenia u ptaków*. Medycyna Weterynaryjna, 2010, 66 (7), 469–475.

(MNiSW/MEiN=9; IF-)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomocy w zebraniu i analizie piśmiennictwa oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swoj udział procentowy szacuję na 90%.

4.3.1.V-3. Stenzel T., Tykałowski B., Mazur-Lech B., Koncicki A. *Infection of wildlife birds – results of serological screening*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2008, 52 (1), 63–66.

(MNiSW/MEiN=15; IF=0,337)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomocy w pobraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń metodą ELISA. Swoj udział procentowy szacuję na 20%.

4.3.1.V.4. Stenzel T., Pestka D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland*. Veterinary Record, 2012, 171(22), 562–566.

(MNiSW/MEiN=30; IF=1,803)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomocy w pobraniu materiału do badań, pomocy w zebraniu i analizie piśmiennictwa oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swoją udział procentowy szacuję na 15%.

4.3.2. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Moja praca po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nadal koncentruje się wokół badań wpływu różnych czynników na układ immunologiczny ptaków.

I. Wpływ immunomodulatorów naturalnych na układ odpornościowy u drobiu grzebiącego i gołębi domowych

Brałem czynny udział w realizacji projektu badawczego pt. „Wpływ stosowania preparatu AdiSalmo^{SOL} PF na kształtowanie się wybranych parametrów układu immunologicznego przewodu pokarmowego indyków i kurcząt brojlerów” finansowanego przez AdiFeed Sp. z o.o. (Polska). Badania przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego preparatu zawierającego m.in. ekstrakty z kilku gatunków ziół oraz olejki eteryczne o udowodnionym działaniu antybakteryjnym. 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 T podwójnie pozytywnych (CD4⁺CD8⁺) w błonie śluzowej jelita biodrowego oraz torbie Fabrycjusza i istotnie wyższy odsetek limfocytów B w błonie śluzowej jelita biodrowego. Kurczęta, które otrzymywały badany preparat miały istotnie wyższe miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko IBV w porównaniu do ptaków kontrolnych. Immunomodulujące działanie tego preparatu stwierdzono także u indyków, u których wykazano istotnie wyższy, w porównaniu z grupą kontrolną, odsetek limfocytów T CD4⁺ w grasicy i w śledzionie, wyższy odsetek limfocytów T CD8⁺ we krwi oraz migdałkach jelit ślepych, a także wyższy odsetek komórek CD4⁺CD8⁺ w grasicy oraz błonie śluzowej jelita biodrowego. Nie stwierdzono natomiast różnic statystycznych w odsetkach limfocytów B IgM⁺ we krwi i w pobranych narządach u tych ptaków. Uzyskane wyniki wykazały immunostymulujące

działanie badanego preparatu, co może znaleźć zastosowanie praktyczne w wielkotowarowej produkcji tych ptaków. Wyniki tych badań opublikowano w pracy 4.3.2.I-1. Dzięki dalszej współpracy i prowadzonym doświadczeniom udało się udoskonalić skład badanego preparatu i metody ekstrakcji fitoncydów z ziół. Preparat ten poza oddziaływaniem immunostymulującym posiada także dobre działanie przeciw bakteriom z rodziny *Enterobacteriaceae*. Dzięki tym właściwościom, które potwierdzono licznymi badaniami, produkty AdiSalmo^{SOL} PF i adiCox^{SOL} PF posiadają znak „Produkt popierany przez PTNW” na lata 2020-2023.

Następnie podjęto badania zmierzające do oceny wpływu immunomodulatorów pochodzenia naturalnego, tym razem na przebieg kliniczny zakażenia gołębi PPMV-1. Celem pierwszego doświadczenia było określenie wpływu różnych dawek wyciągów z aloesu i z lukrecji na przebieg zakażenia PPMV-1 u gołębi. Gołębie otrzymywały *per os*, przez 7 dni po zakażeniu eksperymentalnym PPMV-1, wyciąg z aloesu lub lukrecji w dawkach 300 lub 500 mg/kg m.c. W wybranych dniach po zakażeniu od ptaków pobierano wymazy z kloaki oraz próbki mózgu, nerek, wątroby i trzustki, w których dokonywano ilościowego oznaczenia kopii RNA PPMV-1 metodą TaqMan qPCR. Wyniki badań potwierdziły hamujące właściwości wyciągów z lukrecji i aloesu na replikację PPMV-1. Najsilniejsze właściwości hamujące replikację PPMV-1 wykazywał aloes podawany w dawce 300 mg/kg m.c (praca 4.3.2.I-2). Następnie zbadano wpływ wyciągów z aloesu i z lukrecji na wybrane mechanizmy odpowiedzi komórkowej i humoralnej u gołębi zakażanych PPMV-1. U klinicznie zdrowych gołębi otrzymujących wyciągi z obu ziół w dawce 300 mg/kg m.c. występował wzrost ekspresji genów kodujących receptory CD4 i CD8. Zanotowano również spadek ekspresji tych genów u ptaków otrzymujących wyciąg z aloesu w dawce 500 mg/kg mc. Z kolei u gołębi zakażanych eksperymentalnie PPMV-1 i otrzymujących ekstrakt z aloesu w obu dawkach wykazano wzrost ekspresji genu kodującego receptor CD4. Ekspresja genu kodującego receptor powierzchniowy CD3 wykazywała dynamikę zbliżoną do ekspresji genu kodującego receptor CD4 i CD8. Ponadto stwierdzono wzrost ekspresji genu kodującego IFN- γ u gołębi ze wszystkich grup poddanych immunomodulacji. Nie stwierdzono różnic w kształtowaniu się odsetka limfocytów B IgM⁺ pomiędzy badanymi grupami gołębi. Wyniki tych badań opublikowano w pracy 4.3.2.I-3. W świetle uzyskanych wyników wykazano potencjalną możliwość zastosowania wyciągów z badanych roślin jako dodatków paszowych dla gołębi stosowanych

zarówno w profilaktyce chorób wirusowych, w celu nieswoistego podniesienia odporności ptaków oraz wspomagająco w trakcie leczenia chorób wirusowych gołębi.

4.3.2.I-1. 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 (3), 287–291.

(MNiSW/MEiN=15; IF=0,309)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, pobraniu materiału do badania cytometrycznego, wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków. Swój udział procentowy szacuję na 25%.

4.3.2.I-2. Dziewulska D., Stenzel T., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *An evaluation of the impact of aloe vera and licorice extracts on the course of experimental pigeon paramyxovirus type 1 infection in pigeons*. Poultry Science, 2018, 97 (2), 470–476.

(MNiSW/MEiN=40; IF=2,027)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na pomocy w obsłudze ptaków doświadczalnych i w pobraniu materiału do badań. Swój udział procentowy szacuję na 5%.

4.3.2.I-3. Dziewulska D., Stenzel T., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *The impact of Aloe vera and licorice extracts on selected mechanisms of humoral and cell-mediated immunity in pigeons experimentally infected with PPMV-1*. BMC Veterinary Research, 2018, 14, 148.

(MNiSW/MEiN=40; IF=1,792)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na pobraniu materiału do badań, analizie uzyskanych wyników i wyciągnięciu wniosków. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

II. Badania nad wpływem czynników żywieniowych na układ immunologiczny i status antyoksydacyjny u indyków

Badania możliwości wykorzystania metioniny jako żywieniowego czynnika kształtującego potencjał antyoksydacyjny i stymulującego funkcje systemu immunologicznego indyków były realizowane w ramach projektu badawczego 2013/11/B/NZ9/02496, którego byłem wykonawcą. Celem przeprowadzonych badań

było zweryfikowanie założenia, że poprzez zwiększenie zawartości metioniny w diecie indyków rzeźnych można, obok możliwego pozytywnego wpływu na wskaźniki produkcyjne, poprawić sprawność mechanizmów obronnych. Wykonano dwa doświadczenia, w których określono wpływ różnych poziomów metioniny w mieszankach paszowych na spożycie i zużycie paszy, przyrosty masy ciała, końcową masę ciała, wskaźnik śmiertelności, wybrane wskaźniki biochemiczne (TP, ALB, GLOB, GLU, ALT, AST, ALP, CALC, PHOS) we krwi, oraz parametry immunologiczne (odsetek subpopulacji limfocytów T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ i limfocytów B IgM⁺) we krwi i centralnych (torba Fabrycjusza i grasica) oraz obwodowych (śledziona i migdałki jelit ślepych) narządach układu immunologicznego. Ponadto, oznaczono całkowitą koncentrację immunoglobulin klasy IgM i IgY w surowicy oraz miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Zbadano także wpływ niskiego, średniego i wysokiego poziomu metioniny w paszach na potencjał antyoksydacyjny w wybranych tkankach oraz wartość rzeźną indyczek doświadczalnych.

W doświadczeniu I materiał badawczy stanowiło 357, 1-dniowych indyczek, które podzielono na trzy grupy doświadczalne w siedmiu powtórzeniach każda. W okresie odchowu indyczki otrzymywały pasze typu starter (1-28 dzień) i grower I (29-56 dzień) o zróżnicowanej zawartości metioniny. Pasze o niskiej zawartości tego aminokwasu zawierały 0,45 % (starter) i 0,40 % grower. Pasze o średniej zawartości zawierały odpowiednio 0,60 % (starter) i 0,51 % (grower) metioniny. Pasze o wysokiej zawartości tego aminokwasu zawierały 0,71 % (starter) i 0,57 % (grower). W 17. i 48. dniu życia połowę indyczek z każdej grupy zaszczepiono przeciwko ORT szczepionką inaktywowaną ORNITIN (ABIC) z adiuwantem olejowym metodą iniekcji podskórnej. W 28. i 56. dniu życia pobierano krew (przyżyciowo) i narządy (poubojowo) od siedmiu szczepionych i siedmiu nieszczepionych indyczek z grupy do badań laboratoryjnych. Natomiast doświadczenie II wykonano na 490, 8-tygodniowych indyczkach rzeźnych podzielonych na pięć grup w siedmiu powtórzeniach każda. Ptaki odchowano od 57. do 112. dnia życia. W okresie odchowu indyczki otrzymywały pasze typu grower II (57-84 dzień) i finisher (85-112 dzień) o zróżnicowanej zawartości metioniny - od 0,34 % - 0,58 % w mieszance grower II do 0,29 % - 0,47 % w paszy typu finisher. W 112. dniu od ośmiu indyczek z każdej grupy pobrano krew (przyżyciowo) i narządy (poubojowo) do badań laboratoryjnych. Tuszki indyczek poddano także analizie wydajności rzeźnej. Wyniki badań wskazują, że zmniejszenie

zawartości metioniny w mieszankach paszowych dla indyków poniżej zaleceń NRC powoduje istotne zmniejszenie końcowej masy ciała indyczek, natomiast wyższe poziomy tego aminokwasu nie zawsze poprawiają wyniki odchowu. Zróżnicowany poziom metioniny w paszach nie wpływa także istotnie na wartość badanych wskaźników biochemicznych i serologicznych u 28-dniowych indyczek. Nie stwierdzono istotnego wpływu zróżnicowanych poziomów metioniny w paszy na odsetek subpopulacji badanych limfocytów we krwi obwodowej. Natomiast wysoki poziom metioniny w diecie powodował istotny spadek odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺ i wzrost odsetka subpopulacji komórek B IgM⁺ w śledzionie u 28-dniowych ptaków. Z kolei w 56-dniu życia u indyczek otrzymujących pasze ze średnią i wysoką zawartością metioniny wykazano statystycznie istotnie wyższe miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko ORT, ale istotnie niższy odsetek subpopulacji limfocytów B we krwi niż indyczki żywione dietą o niskiej zawartości tego aminokwasu. Wysoka zawartość metioniny w paszach powodowała także spadek odsetka limfocytów T CD4⁺ i wzrost odsetka komórek T CD8⁺ w śledzionie u 56-dniowych indyczek. Zwiększenie poziomów metioniny w paszach powodowało także wzrost odsetka subpopulacji limfocytów T CD8⁺ w migdałkach jelit ślepych i spadek odsetka limfocytów B IgM⁺, przy wzroście odsetka komórek CD4⁺ w torbie Fabrycjusza. W grasicy u 56-dniowych indyczek żywionych paszami z wysoką zawartością metioniny zaobserwowano istotny wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺. Zwiększony poziom metioniny wpływał korzystnie na status antyoksydacyjny krwi i wątroby nie wpływając na umięśnienie indyckich tuszek. Wyniki opisanych badań opublikowano w pracach 4.3.2.II-1 i 4.3.2.II-2. Były one także przedmiotem rozprawy doktorskiej pt. „Reakcja indyków na zróżnicowaną zawartość metioniny w paszy” Pani dr inż. Magdaleny Kubińskiej, w której byłem promotorem pomocniczym. Obrona pracy doktorskiej odbyła się 13.10.2017 roku na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt UWM w Olsztynie.

Badalem także wpływ zróżnicowanego poziomu metioniny (suplementowanej w dwóch różnych formach) w mieszankach paszowych dla indyków na wybrane wskaźniki biochemiczne (GLU, TP, TAG, TC, ALB, UA, ALT, AST, ALP, CK, LDH) i status antyoksydacyjny (CAT, GPx, SOD, LOOH, MDA, FRAP, GSH+GSSG, VIT C) w przebiegu zakażenia wirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV). Indyki z grup DLM_L i DLM_H otrzymywały mieszanki paszowe zawierające DL-metioninę (DLM) w dawce zalecanej przez NRC (grupa DLM_L) i w dawce o 40 % wyższej (grupa DLM_H). Z kolei ptaki z grup MHA_L i MHA_H otrzymywały mieszanki paszowe zawierające sól

wapniową hydroksyanalogu metioniny (MHA) w dawce zalecanej przez NRC w grupie MHA_L i w dawce o 40 % wyższej (grupa MHA_H). Doświadczenie było podzielone na dwa okresy żywieniowe od 1. do 4. tyg. i od 5. do 8. tyg. życia. W 42. dniu życia połowę indyków z każdej grupy zakażono krajowym izolatem HEV i utrzymywano do końca doświadczenia w izolowanych boksach klasy biobezpieczeństwa BSL-3. W 47 dniu życia, od 7 ptaków z każdej grupy pobierano krew a następnie te ptaki poddano humanitarnej eutanazji w aparacie UNO Euthanasia Unit (UNOBV, Holandia) i pobierano wycinki wątroby i jelita czczego do analiz laboratoryjnych. Zawartość metioniny w diecie 40 % powyżej poziomu zalecanego przez NRC nasilała peroksydację lipidów w jelicie cienkim, prowadząc do wzrostu poziomu dialdehydu malonowego (MDA) i nadtlenku lipidów (LOOH), ale także stymulowała mechanizmy antyoksydacyjne we krwi i wątrobie indyków zakażonych HEV. W porównaniu z DLM, MHA przyczynił się bardziej do wzrostu wartości wskaźników stresu oksydacyjnego. U indyków zakażonych HEV dieta o zwiększonej zawartości metioniny nie wywierała wyraźnego działania przeciwutleniającego, które odnotowano u niezakażonych ptaków. DL-metionina miała korzystniejszy wpływ na analizowane parametry statusu antyoksydacyjnego w ścianie jelita cienkiego, krwi i wątrobie indyków w porównaniu do MHA. Wyniki tych badań opisano w pracy 4.3.2.II-3.

Brałem także udział jako wykonawca w realizacji projektu badawczego nr UMO-2017/27/B/NZ9/01007 pt. „Antyoksydacyjne i immunostymulujące oddziaływanie zróżnicowanych poziomów i wzajemnego stosunku lizyny, argininy i metioniny w mieszankach dla indyków rzeźnych”. Za całokształt zrealizowanych i opublikowanych badań otrzymałem wraz z pozostałymi członkami zespołu I Nagrodę Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk w 2022 roku.

W doświadczeniu założono, że odpowiedni stosunek argininy (Arg) do lizyny (Lys) w diecie może poprawić status immunologiczny i wydajność produkcyjną indyków zdrowych oraz zakażonych *Clostridium perfringens*. Celem tych badań była ocena wpływu dwóch poziomów suplementacji Arg (95 % lub 105 %) w stosunku do Lys, w paszach dla indyków o zawartości Lys zgodnej z zaleceniami NRC lub o 10 % wyższej, na status immunologiczny ptaków oraz wskaźniki uszkodzeń białek i DNA spowodowanych utlenianiem, nitrowaniem lub zmianami epigenetycznymi. Kolejnym celem było określenie, jaki stosunek Arg:Lys w diecie stymuluje odpowiedź immunologiczną indyków szczepionych przeciwko ORT. Pierwszy eksperyment przeprowadzono na 576 indykach losowo przydzielonych do czterech grup

żywnościowych z dwoma poziomami Lys (niski – zgodny z zaleceniami NRC lub wysoki - NRC + 10 %) i dwoma poziomami Arg (95 % lub 105 %) w stosunku do zawartości Lys w paszy). Mieszanki paszowe z wyższym poziomem Lys (NRC + 10 %) nie miały wpływu na odsetek limfocytów CD4⁺ i CD8⁺, ale przyczyniły się do wzrostu odsetka komórek B IgM⁺ w śledzionie oraz do obniżenia poziomów białka C-reaktywnego (CRP), białek karbonylowanych (PC), 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny (8-OHdG) i kaspazy-3 (Casp 3) w ścianie jelita cienkiego oraz obniżenia poziomu 3-nitrotyrozyny (3-NT) w osoczu u 16-tygodniowych ptaków. W porównaniu z niższym poziomem Arg (95 % Lys), wyższy wskaźnik suplementacji Arg (105 % Lys) doprowadził do wzrostu odsetka komórek B IgM⁺ w śledzionie i spadku poziomów 3-NT w ścianie jelita cienkiego i osoczu krwi indyków. Poziom 8-OHdG zmniejszył się w osoczu krwi i ścianie jelita cienkiego 9-tygodniowych indyków karmionych dietą o wyższej zawartości Arg (105 % Lys). Wyższy poziom suplementacji Arg (105 % Lys) zwiększył metylację DNA w ścianie jelita cienkiego, ale nie w osoczu krwi indyków w wieku 9 i 16 tygodni. Mieszanki paszowe o wyższym poziomie Lys (NRC + 10 %) nie miały wpływu na ekspresję genu kodującego IgA w wątrobie u szczepionych przeciwko ORT indyków. Wyższy poziom Lys (NRC + 10 %) nie miał wpływu na miano przeciwciał poszczepiennych przeciwko ORT w surowicy krwi u 16-tygodniowych indyków. Zarówno niski (95 % Lys), jak i wysoki (105 % Lys) poziom Arg nie wpływał na ekspresję genu kodującego IgA w wątrobie oraz na miano przeciwciał przeciwko ORT w surowicy u indyków. Stwierdzono, że zawartość Lys w diecie indyków powinna być o 10 % wyższa niż zalecana przez NRC i połączona z wyższym poziomem Arg (105 % Lys). Chociaż powyższy stosunek Arg:Lys nie poprawił wydajności wzrostu ptaków, stymulował ich układ odpornościowy i zmniejszał nitrację białek, a także utlenianie białek i DNA (praca 4.3.2.II-4). W drugim eksperymencie, badania przeprowadzono na 192 indykach podzielonych na 6 grup po 8 powtórzeń każda. Ptaki w grupach T1 i T2 otrzymywały mieszanki paszowe o niskiej lub wysokiej koncentracji badanych aminokwasów. Mieszanki o niskiej zawartości Arg Lys i Met zawierały odpowiednio 16 g Lys na kg paszy, 90 % Arg w stosunku do zawartości Lys i 30 % Met w stosunku do zawartości Lys, zgodnie z wytycznymi NRC. Mieszanki o wysokiej zawartości Arg, Lys i Met zawierały odpowiednio 18 g Lys na kg paszy, 110 % Arg w stosunku do zawartości Lys i 45 % Met w stosunku do zawartości Lys. Indyki z grup T3 i T4 były karmione paszami odpowiednio jak ptaki z grup T1 i T2, ale w 25., 26. i 27. dniu życia zostały zakażone *per os* laseczką *C. perfringens* typu A. Indyki z grup T5 i

T6 były karmione paszami odpowiednio jak ptaki z grup T1 i T2, ale w 25., 26. i 27. dniu życia podano im dootrzewnowo lipopolisacharyd (LPS) wyizolowany z *E. coli* w dawce 250 µg/kg m.c. W 28. dniu życia od indyków pobrano krew (przyżyciowo) i narządy (śledziona, wycinek jelita czczego i wątrobę) do badań cytometrycznych, serologicznych i molekularnych. U 28-dniowych indyków wykonano też test integralności jelit. Badane w tym kierunku ptaki otrzymały *per os* dekstran fluoresceino-5-izotiocyjanianu (FITC-d) w dawce 4,17 µg/kg m.c. za pomocą sondy do wola. Po 210 minutach od podania FITC-d od indyków pobierano krew do dalszych badań. Poziom suplementacji badanych aminokwasów nie miał istotnego wpływu na odsetek subpopulacji analizowanych limfocytów. Z kolei odsetek subpopulacji komórek CD4⁺CD8α⁺ w śledzionie indyków był istotnie wyższy u ptaków zakażonych *C. perfringens* niż u ptaków, którym podawano LPS. Odsetek subpopulacji limfocytów B IgM⁺ był istotnie wyższy u indyków otrzymujących LPS niż u zakażonych *C. perfringens*. Analiza wskaźników immunologicznych w osoczu krwi indyków wykazała, że koncentracja badanych aminokwasów w paszach istotnie wpłynęła na poziom immunoglobuliny IgA. Niska zawartość Arg, Lys i Met zwiększała poziom IgA. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w poziomach IgY, IgM, IL-2 oraz IL-6 w osoczu pod wpływem zmiany koncentracji badanych aminokwasów w mieszankach paszowych. U indyków zakażonych *C. perfringens* stwierdzono istotny wzrost poziomu IgA i IL-6 w ścianie jelita czczego, przy czym wzrost ten był wyższy u ptaków otrzymujących pasze z wysoką koncentracją badanych aminokwasów. Zarówno wysoka, jak i niska koncentracja Arg, Lys i Met w paszach nie wpłynęła istotnie na wyniki badania integralności jelit, czyli na stężenie FITC-d w surowicy indyków. Jednak stężenia FITC-d były znacząco wyższe w surowicy u ptaków zakażonych *C. perfringens* niż u ptaków niezakażonych. Podawanie indykom dootrzewnowo LPS nie wpłynęło istotnie na wyniki testu integralności jelit. Wyższa koncentracja badanych aminokwasów istotnie zwiększała masę ciała indyków doświadczalnych zarówno mierzoną w 25. jak i 28. dniu życia oraz poprawiała tempo przyrostów (praca 4.3.2.II-5).

4.3.2.II-1. Kubińska M., Tykałowski B., Jankowski J., Koncicki A. *Immunological and biochemical indicators in turkeys fed diets with a different methionine content*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2014, 17(4), 687–695.

(MNI_{SW}/ME_{iN}=20; IF=0,604)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 35%.

4.3.2.II-2. Kubińska M., Tykałowski B., Koncicki A., Jankowski J. *Biochemical and immunological responses of young turkeys to vaccination against Ornithobacterium rhinotracheale and different levels of dietary methionine.* Polish Journal of Veterinary Sciences, 2015, 18 (4), 807–816.

(MNIŚW/MEiN=20; IF=0,719)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, szczepieniu indyków przeciwko ORT, pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej i ELISA, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 35%.

4.3.2.II-3. Jankowski J., Tykałowski B*, Ognik K., Koncicki A., Kubińska M., Zduńczyk Z. *The effect of different dietary levels of DL-methionine and DL-hydroxy analogue on the antioxidant status of young turkeys infected with the haemorrhagic enteritis virus.* BMC Veterinary Research, 2018, 14, 404.

(MNIŚW/MEiN=40; IF=1,792)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, zakażaniu indyków doświadczalnych, pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, przygotowaniu i wysłaniu końcowej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 45%.

**autor korespondencyjny*

4.3.2.II-4. Ognik K., Mikulski D., Konieczka P., Tykałowski B., Krauze M., Stępniewska A., Nynca A., Jankowski J. *The immune status, oxidative and epigenetic changes in tissues of turkeys fed diets with different ratios of arginine and lysine.* Scientific Reports, 2021, 11(1):15975.

(MNIŚW/MEiN=140; IF=4,997)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, przygotowaniu i korekcie końcowej wersji manuskryptu oraz

pomocy w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Swoj udział procentowy szacuję na 15%.

4.3.2.II-5. Konieczka P., Tykałowski B., Ognik K., Kinsner M., Szkopek D., Wójcik M., Mikulski D., Jankowski J. *Increased arginine, lysine, and methionine levels can improve the performance, gut integrity and immune status of turkeys but the effect is interactive and depends on challenge conditions.* *Veterinary Research*, 2022, 53(1):59. (MNiSW/MEiN=200; IF=3,829)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, przygotowaniu rycin i korekcie końcowej wersji manuskryptu oraz pomocy w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Swoj udział procentowy szacuję na 20%.

III. Badania nad wpływem antybiotyków i kokcydiostatyków na układ immunologiczny ptaków

W przebiegu chorób wywołanych immunosupresyjnymi wirusami, w warunkach chowu wielkotowarowego często dochodzi do wtórnych infekcji bakteryjnych. Wówczas konieczne staje się podanie chorym ptakom antybiotyków, bądź chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych. Część z tych substancji poza oddziaływaniem bakteriobójczym lub bakteriostatycznym wykazuje właściwości immunosupresyjne i przeciwzapalne.

W jednym z pierwszych doświadczeń po obronie pracy doktorskiej badałem wpływ oksytetracykliny na wybrane wskaźniki immunologiczne u indyków. Tetracykliny są powszechnie stosowane w leczeniu drobiu ze względu na szerokie spektrum działania. Efektem ubocznym podawania tetracyklin jest immunosupresja, co u drobiu było potwierdzone metodami *in vitro*. Wobec tego przeprowadzono badania własne na 5-tygodniowych indykach rzeźnych celem, których było określenie wpływu oksytetracykliny na wybrane wskaźniki immunologiczne z zastosowaniem cytometrii przepływownej. Indyki z grupy badanej otrzymywały przez 5 dni oksytetracyklinę w dawce 0,5 g substancji aktywnej na 1 litr wody do picia. Badania wykazały, że podanie tego antybiotyku spowodowało istotne obniżenie odsetka subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD8⁺ we krwi oraz w śledzienie w porównaniu do indyków grupy kontrolnej. Zaobserwowano także spadek odsetka limfocytów B IgM⁺ we krwi. Wyniki pozwoliły potwierdzić, że stosowanie oksytetracykliny w dawce leczniczej ma istotny wpływ na

odsetek badanych subpopulacji limfocytów T i B, co wskazuje na jej immunosupresyjne działanie u indyków (praca 4.3.2.III-1).

Brałem także udział w badaniach wpływu wczesnego podawania antybiotyków lub probiotyku na wybrane wskaźniki immunologiczne u kurcząt brojlerów. Doświadczenie przeprowadzono na 90, 1-dniowych kogutkach brojlerach. Ptaki były podzielone na trzy grupy. Kurczęta kontrolne nie otrzymywała żadnych dodatków do wody pitnej. Grupa GP otrzymywała od 1. do 5. dnia probiotyk zawierający *Enterococcus faecium* i *Bacillus amyloliquefaciens* a ptaki z grupy GA otrzymały w tym czasie 10 % roztwór enrofloksacyny w dawce 0,5 ml/litr wody do picia. Podawanie enrofloksacyny lub probiotyku kurczętom w pierwszych dniach życia wywiera wyraźny wpływ immunomodulujący na humoralne i komórkowe mechanizmy obronne. W śledzeniu 6-dniowych kurcząt z grup otrzymujących probiotyk lub antybiotyk odsetek limfocytów T CD3⁺CD4⁺ był istotnie niższy, ale odsetek komórek B Bu-1⁺ był istotnie wyższy niż u kurcząt z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w odsetku badanych limfocytów T i B w śledzeniu i krwi u 35-dniowych kurcząt. W wieku 35 dni poziomy ceruloplazminy (Cp) i CRP w osoczu kurcząt z grupy GA były statystycznie istotnie niższe niż w grupie kontrolnej. Poziom IgY w osoczu kurcząt z grupy GA był istotnie niższy zarówno w 6. jak i 35. dniu życia niż w grupie GC, w porównaniu z grupą kontrolną. Kurczęta, które otrzymały enrofloksacynę, miały istotnie wyższy poziom IL-2 w osoczu w 6. i 35. dniu życia w porównaniu do ptaków z grupy kontrolnej. Poziom IL-6 w osoczu 6-dniowych kurcząt z grupy otrzymującej probiotyk był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Wczesne podawanie enrofloksacyny może stwarzać ryzyko supresji mechanizmów obronnych u bardzo młodych kurcząt, na co wskazuje znaczny spadek całkowitego stężenia IgY w osoczu kurcząt oraz hamowanie proliferacji limfocytów T CD4⁺. Wyniki tych badań opublikowano w pracy 4.3.2.III-2.

Aktualnie prowadzę badania w ramach projektu nr 2020/39/B/NZ9/00765 pt. „Odpowiedź układu immunologicznego i systemu oksydo-redukcyjnego indyków żywionych dietami z lub bez dodatku kocydiostatyku na wczesne podanie antybiotyków”. W pierwszym doświadczeniu założono, że wczesne podawanie enrofloksacyny (grupy E+ i E-) lub doksycykliny (grupy D+ i D-) lub żywienie ptaków paszami zawierającymi antybiotyk jonoforowy – monenzynę (grupy M+ i M-) może upośledzać funkcje immunologiczne i zmieniać morfologię narządów układu odpornościowego u indyków. Badania przeprowadzono na 3080, 1-dniowych indykach

różnych podzielonych na osiem grup w siedmiu powtórzeniach każda. Ptaki z grup C+, M+, E+ i D+ zaszczepiono w trakcie odchowu przeciwko TRT, ND i ORT, natomiast indyki z grup C-, M-, E- i D- nie były szczepione. Ptaki z grup M+ i M- były żywione paszami zawierającymi monenzynę w dawce 90 mg/kg. Indyki z grup E+ i E- otrzymywały enrofloksacynę w dawce 10 mg/kg m.c. dodawaną do wody pitnej przez pierwsze 5 dni życia, a z grup D+ i D- otrzymywały tą samą drogą doksycyklinę w dawce 50 mg/kg m.c. Indyki z grup kontrolnych C+ i C- nie otrzymywały antybiotyków ani kokcydiostatyku. W 7. i 56. dniu życia pobrano krew (przyżyciowo) od 7 ptaków z każdej grupy a po uboju śledzionę, grasnicę i torbę Fabrycjusza. Narządy ważono i wyliczano indeks śledziony i torby Fabrycjusza. Wycinki śledziony, grasicy i torby Fabrycjusza zostały utrwalone w 5 % zbuforowanym roztworze formaliny i przekazane do badania histologicznego. W osoczu krwi badano zawartość amyloidu A, CRP, Cp, jądrowego czynnika kappa B (NF-kB), immunoglobuliny IgA, rozpuszczalnej formy receptora Toll-like 4 (sTLR-4). Stwierdzono, że zastosowane w doświadczeniu antybiotyki nie wpływają istotnie na indeks śledziony i torby Fabrycjusza u 7- i 56-dniowych indyków. Monenzyna dodana do paszy wywołała istotny wzrost poziomu amyloidu A w osoczu krwi u 7-dniowych indyków w porównaniu do grupy kontrolnej. Wczesne podanie doksycykliny i enrofloksacyny wywołało istotny spadek poziomu sTLR-4 w osoczu krwi u 7-dniowych indyków. U 56-dniowych ptaków poziom CRP, TLR-4 i NF-kB w osoczu krwi był istotnie niższy w grupach, którym podawano doksycyklinę i enrofloksacynę. Antybiotyki podawane szczepionym indykom hamowały wydzielanie czynników regulujących stan zapalny (sTLR-4 i NF-kB), co znalazło odzwierciedlenie w niższych poziomach białek ostrej fazy (CRP i Cp) w osoczu. Najprawdopodobniej antybiotyki wywierały hamujący wpływ na mikrobiom jelitowy piskląt. Badanie histopatologiczne narządów wykazało zwyrodnienie tłuszczowe i przekrwienie, które nasilały się z czasem we wszystkich grupach eksperymentalnych, co może być związane z dietą stosowaną w intensywnej hodowli indyków. Niemniej jednak, intensywność obserwowanych zmian była wyższa u indyków, które otrzymywały antybiotyki we wczesnym okresie życia lub były karmione paszą zawierającą kokcydiostatyk. Monenzyna wywierała najbardziej negatywny wpływ na morfologię badanych narządów (praca 4.3.2.III-3).

4.3.2.III-1. 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 (7), 432–435. (MNiSW/MEiN=15; IF=0,196)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, przygotowaniu i wysłaniu końcowej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 75%.

4.3.2.III-2. Jankowski J., Tykałowski B., Stępniewska A., Konieczka P., Koncicki A., Matusевич P., Ognik K *Immune Parameters in Chickens Treated with Antibiotics and Probiotics during Early Life.* Animals, 2022, 12 (22), 1133. (MNiSW/MEiN=100; IF=3,231)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, korekcie końcowej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 25%.

4.3.2.III-3. Smagiel R., Ognik K., Cholewińska E., Stępniewska A., Listos P., Tykałowski B., Mikulski D., Koncicki A., Jankowski J. *The effect of early administration of antibiotics or feeding diet containing a coccidiostat on inflammatory responses and the morphological structure of selected organs of the immune system in young meat-type turkeys.* Poultry Science, 2023, 102:102876.

(MNiSW/MEiN=140; IF=4,014)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, korekcie końcowej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 15%.

IV. Badania nad patologią i lokalnymi mechanizmami obronnymi w układzie oddechowym u drobiu

Choroby układu oddechowego stanowią istotny problem w patologii drobiu. Specyficzna budowa anatomiczna tego układu sprzyja wielu chorobom 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 obszaru wiedzy, efektem czego był współudział w publikacjach poświęconych

zagadnieniom lokalnej odporności błon śluzowych u drobiu (praca 4.3.2.IV-1), a także immunologii, patogenezы i profilaktyki zakażeń metapneumowirusami ptaków (aMPV) wywołującymi zakaźne zapalenie nosa i tchawicy (TRT) u indyków (praca 4.3.2.IV-2) oraz zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy u kur (praca 4.3.2.IV-3).

Brałem także udział w badaniach kształtowania się odporności poszczepiennej przeciwko TRT u indyków. Były one realizowane w ramach dwóch projektów badawczych finansowanych przez NCN pt. „Odporność swoista i nieswoista błon śluzowych górnych dróg oddechowych oraz wpływ odporności naturalnej biernej na rozwój rezystencji poszczepiennej u piskląt indycznych uodpornianych przeciwko TRT” i „Ocena efektywności programów profilaktyki swoistej zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy (TRT), w stadach indyków rzeźnych o różnym statusie immunologicznym, w kontekście rozwoju odporności przeciwzakaźnej”, w których byłem wykonawcą.

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 (MDA+) lub nie (MDA-) w kontekście szczepienia przeciwko TRT. W badaniach wykorzystano łącznie 782 indyki rzeźne, które dostarczyła wylęgarnia Grelavi S.A. Indyki MDA+ (n=391) pochodziły ze stada reprodukcyjnego indyków zaszczonego przeciwko TRT (3 razy żywą szczepionką aMPV/A i dwukrotnie inaktywowaną szczepionką aMPV/B). Indyki MDA- (n=391) pochodziły ze stada niosek nieszczepionych przeciwko TRT, odchowywanych w Kanadzie. Badania te wykazały różnice w rozwoju odporności poszczepiennej u piskląt indycznych wynikające z różnych poziomów przeciwciał matczynych. U indycząt uzyskanych od rodziców nie szczepionych przeciwko TRT (MDA-) lub posiadających bardzo niskie miana przeciwciał matczynych, stwierdzano 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 (MDA+) posiadały wyższy odsetek limfocytów T CD4⁺ w gruczole Hardera oraz błonie śluzowej tchawicy, ale nie stwierdzano u nich wzrostu miana 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 indyckich 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 swoście uczulonych limfocytów B IgA⁺, jak i zmniejszeniem produkcji i sekrecji IgA przez te komórki. W śledzionach szczepionych ptaków stwierdzono istotny wzrost obu badanych subpopulacji limfocytów T produkujących IFN γ . Wystąpiły jednak różnice, które dotyczyły czasu niezbędnego do tej stymulacji. W porównaniu z indykami grupy MDA-szczepionych tuż po wylęgu, u których odnotowano wzrost obu subpopulacji limfocytów T już w 3. dobie po szczepieniu, w grupie indyków MDA+ szczepionych w tym samym wieku wzrost badanych subpopulacji był późniejszy (od 7. doby) i dotyczył przede wszystkim limfocytów T CD4⁺. W obu grupach ptaków szczepionych w 14 dobie wzrost ten (dotyczący obu subpopulacji) miał miejsce już w 3. dobie po szczepieniu i trwał przez cały okres doświadczenia. Powyższe wskazuje, że różne poziomy przeciwciał matczynych przeciwko TRT mogą mieć związek z brakiem skuteczności szczepień przeciwko tej chorobie oraz powstawaniem zakażeń wirusem TRT w terenie. Wyniki tych badań opublikowano w pracach 4.3.2.IV-4 - 4.3.2.IV-7.

Uczestniczyłem również w badaniach epidemiologicznych dotyczących występowania bordetelozy u indyków oraz ptaków wolnożyjących. 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 4.3.2.IV-8). 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 najczęściej była stwierdzana w materiale pobranym od bażantów łownych (54,54%) i łysiek (9,09%), a w mniejszym stopniu od kaczek

krzyżówek (2,77%) i mew śmieszek (3,22%). Powyższe wskazuje na rolę ptaków dzikich jako rezerwuaru bakterii groźnych dla drobiu (praca 4.3.2.IV-9).

W latach 2014-2015 byłem wykonawcą projektu pt. „Development of humoral and cell-mediated immunity in broiler chickens immunized against aMPV, NDV and IBV with the use of MSD Animal Health vaccines”, realizowanego wspólnie z MSD Animal Health. Projekt dotyczył badania mechanizmów budowania odporności poszczepiennej (przeciwko trzem groźnym patogenom drobiu atakującym układ oddechowy) w zależności od zastosowanego schematu immunoprofilaktyki. Badania przeprowadzono na 359, 1-dniowych kurczętach broilerach. W dniu rozpoczęcia doświadczenia od 23, losowo wybranych z całej partii dostarczonych z wylęgarni piskląt, pobrano krew oraz popłuczyny z tchawicy celem ustalenia poziomu swoistych przeciwciał matczynych anty-IBV. Pozostałe ptaki podzielono na 4 grupy: grupa kontrolna, nieszczepiona przeciwko IB; Ma5 to grupa szczepiona przeciwko IB w 1 dniu życia szczepem Ma5 (serotyp Mass); grupa 4/91 została zaszczepiona szczepem 4/91 (serotyp 793B); a grupa V2 została zaszczepiona szczepem Ma5 i 4/91. Wszystkie szczepionki przygotowano zgodnie z instrukcjami (MSD Animal Health) a ptaki szczepiono okulonaszalnie w dawkach zalecanych przez producenta. W 3., 7. i 14. dniu po szczepieniu pobrano po 5 próbek gruczołu Hardera (HG) i 5 próbek śledziony do oznaczenia liczby komórek T CD4⁺ i CD8⁺ oraz komórek B Bu-1⁺. W 14. i 21. dniu po szczepieniu od ptaków ze wszystkich grup pobrano po 23 próbki krwi do badań serologicznych. W 7., 14. i 21. dniu po szczepieniu pobierano dodatkowo po 15 próbek popłuczyn z tchawicy do serologicznej oceny swoistych poziomów przeciwciał klasy IgY i IgA anty-IBV. Dodatkowo 5 próbek surowicy reagujących dodatnio w teście ELISA, w 21. dobie po szczepieniu, poddano analizie reaktywności krzyżowej z różnymi szczepami diagnostycznymi IBV z wykorzystaniem testu hamowania hemaglutynacji (HI). Ptaki grupy Ma5 charakteryzowały się najszybszą stymulacją parametrów odporności komórkowej na terenie HG po przeprowadzonym szczepieniu. Pomimo opóźnionego charakteru stymulacji tych parametrów, w grupie V2 odnotowano najsilniejszą infiltrację struktur górnych dróg oddechowych (GDO) komórkami immunokompetentnymi w 14. dniu po szczepieniu. Z kolei ptaki grupy 4/91 charakteryzowały się najsłabszą stymulacją tych parametrów. Rozpatrując zależności czasowe odnotowane pomiędzy wzrostem liczby komórek T CD4⁺ oraz limfocytów B Bu-1⁺ można sugerować, iż główną subpopulacją limfocytów pomocniczych, które uległy stymulacji były komórki Th2 zaangażowane w pobudzenie odporności

humoralnej. Podobne zależności procentowego udziału komórek T CD4⁺ oraz B Bu-1⁺ odnotowaliśmy w śledzionach ptaków szczepionych, przy czym parametry te najsilniej stymulowane były w grupie 4/91, czego konsekwencją najprawdopodobniej były uzyskane wyniki badań HI. Rozpatrując wyniki udziału komórek T CD8⁺ w śledzionach okazuje się, że parametr ten wzrósł we wszystkich grupach szczepionych, jednak najsilniej w grupie V2. W surowicach ptaków wszystkich grup szczepionych stwierdzono wzrost poziomu przeciwciał IgY, przy czym najintensywniejszy wzrost odnotowano w grupie V2. Podobnie jak w surowicy, poziom tej immunoglobuliny wzrósł po szczepieniu w popłuczynach z tchawicy, a najwyższy jego wzrost odnotowano w grupie Ma5. Odnotowaliśmy również wzrost poziomu swoistej IgA w popłuczynach z tchawicy, przy czym w 21. dobie po szczepieniu najwyższy jej poziom odnotowano w grupie V2. W grupie 4/91 poziom jej był zbliżony do tego obserwowanego w grupie V2. W grupie Ma5 poziom IgA spadł między 14. a 21. dobą po szczepieniu w porównaniu z grupami 4/91 oraz V2. Z ogólnego podsumowania badań HI pod względem liczby reakcji krzyżowych z różnymi antygenami diagnostycznymi w grupie 4/91 odnotowano reakcje krzyżowe ze wszystkimi badanymi szczepami, a w grupach Ma5 oraz V2 było to odpowiednio 6 i 5 na 7 badanych szczepów. W obrębie poszczególnych szczepów diagnostycznych liczba próbek reagujących pozytywnie była różna, stąd sumarycznie liczba próbek reagujących dodatnio spośród wszystkich badanych wyniosła blisko 80% w grupie 4/91, 60 % w grupie V2 oraz niespełna 40 % w grupie Ma5. Sumaryczna analiza pozwoliła na konkluzję, iż poziom stymulacji i wykształcenia parametrów rozpatrywanych jako główne immunologiczne indykatory protekcji w stosunku do IBV, był najwyższy w grupie V2. Oba zastosowane szczepy są immunogenne i podczas, gdy Mass wydaje się skuteczniej stymulować odporność typu komórkowego (zwłaszcza w strukturach GDO), tak szczep 793B generuje szersze spektrum reaktywności krzyżowej układu odpornościowego i wyższą produkcję IgA w GDO. Ostateczną odpowiedzią może być zatem fakt, że skuteczność tego protokołu szczepienia wynika z addytywnego wpływu szczepów Mass i 793B na różne elementy układu immunologicznego gospodarza po szczepieniu (praca 4.3.2.IV-10). Na potrzeby prowadzonych badań opracowano także test do molekularnego rozpoznawania szczepów szczepionkowych Ma5 i 4/91 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli. Specyficzne startery i sondy dla genów S1 i N zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencje nukleotydowe obu szczepów szczepionkowych. Czulość testu wynosiła $2,373 \times 10^3$ kopii dla szczepu Ma5 i $3,852 \times 10^3$ kopii dla

szczepu 4/91. Próbkki kontrolne należące do znanego genotypu IBV wykazały, że zaprojektowane testy są szybkie i czułe w wykrywaniu szczepów szczepionkowych (Ma5 i 4/91) wirusa IBV (praca 4.3.2.IV-11).

4.3.2.IV-1. Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Local immunity of the respiratory mucosal system in chickens and turkeys*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2011, 14 (2), 291–297.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,565)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomocy w zebraniu i analizie piśmiennictwa oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.IV-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 (1), 175–180.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,570)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomocy w zebraniu i analizie piśmiennictwa oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.IV-3. Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Pestka D., Koncicki A. *Zakaźne zapalenie krtani i tchawicy – patogeneza oraz perspektywy immunoprofilaktyki swoistej*. Medycyna Weterynaryjna, 2012, 68 (11), 656–661.

(MNiSW/MEiN=10; IF=0,203)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomocy w zebraniu i analizie piśmiennictwa oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.IV-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, 7 (11), 28.

(MNiSW/MEiN=35; IF=1,643)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków, korekcie końcowej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 15%.

4.3.2.IV-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 (3), 509–518.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,697)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.IV-6. Śmiałek M., Tykałowski B., Dziewulska D., Kowalczyk J., Koncicki A. *IFN γ production profile in turkeys of different immunological status after TRT vaccination*. Journal of Veterinary Research, 2020, 64, 239-245.

(MNiSW/MEiN=140; IF=1,744)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych i wysortowaniu komórek do badanie metodą ELISPOT. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.IV-7. Śmiałek M., Kowalczyk J., Gesek M., Kaczorek-Łukowska E., Dziewulska D., Tykałowski B., Koncicki A. *The influence of maternally derived antibodies on protection against aMPV/A infection in TRT vaccinated turkeys*. Poultry Science, 2021, 100 (5), 101086.

(MNiSW/MEiN=140; IF=4,014)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń serologicznych. Swój udział procentowy szacuję na 5%.

4.3.2.IV-8. 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 (3), 659–661.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,719)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zbieraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń serologicznych. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.IV-9. Stenzel T., Pestka D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A., Bancierz-Kisiel A. *Detection of Bordetella avium by TaqMan real-time PCR in tracheal swabs from wildlife birds*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2017, 20 (1), 31–36.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,839)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń molekularnych. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.IV-10. Śmiałek M., Tykałowski B., Dziewulska D., Stenzel T., Koncicki A. *Immunological aspects of the efficiency of protectotype vaccination strategy against chicken infectious bronchitis.* BMC Veterinary Research, 2017, 13 (1), 44. (MNiSW/MEiN=40; IF=1,958)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.IV-11. Stenzel T., Dziewulska D., Śmiałek M., Tykałowski B., Kowalczyk J., Koncicki A. *Differentiation of infectious bronchitis virus vaccine strains Ma5 and 4/91 by TaqMan real-time PCR.* Polish Journal of Veterinary Sciences, 2017, 20 (3), 599–601.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,839)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń molekularnych. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

V. Badania odporności lokalnej w układzie rozrodczym indyczek reprodukcyjnych

Układ rozrodczy ptaków, zarówno ze względu na anatomie, jak i funkcje, różni się znacząco od układu rozrodczego ssaków. Składa się tylko z lewego jajnika i jajowodu, który uchodzi do steku, co sprawia, że jest stale narażony na zakażenia wstępujące, ale i na infekcje ogólnoustrojowe. Stąd niezwykle ważne jest prawidłowe funkcjonowanie lokalnych mechanizmów odporności humoralnej i komórkowej w tym układzie. Ponadto, mechanizmy odpornościowe układu rozrodczego ptaków są związane z przekazywaniem przeciwciał matczynych IgY, IgA i IgM do jaja, które pełnią funkcję ochronną zanim układ odpornościowy pisklęcia stanie się w pełni wydajny. Zatem mechanizmy odporności lokalnej na terenie układu rozrodczego ptaków odgrywają istotną rolę w zapobieganiu zakażeniom prowadzącym do zmian funkcjonalnych narządu i kontaminacji jaj (praca 4.3.2.V-1). W badaniach własnych zwróciliśmy szczególną uwagę na mechanizmy oraz poziomy transfer przeciwciał matczynych od niosek indycznych na potomstwo. Przeciwciała przekazywane z nioski na potomstwo, które początkowo obecne są w jajach, a z czasem również w rozwijających się zarodkach i ostatecznie w surowicy wyklutych piskląt, odgrywają istotną rolę protekcyjną w trakcie embriogenezy oraz w trakcie pierwszych tygodni życia ptaków.

Celem przeprowadzonych badań było określenie poziomu przeciwciał klasy IgM i IgY oraz poziomów przeciwciał IgY swoistych w stosunku do wybranych patogenów (APV, NDV, ORT, PM) w próbkach surowicy indyczek reprodukcyjnych oraz ich potomstwa, jak również w żółtku i białku jaj wylęgowych pobranych w różnych okresach nieśności. W badaniach własnych wykazano, że poziom przeciwciał IgY w surowicy indyczek reprodukcyjnych był wyższy niż u kur i wynosił w trakcie produkcji nieśnej średnio 22,04 mg/ml. Ponadto wykazano, że średni poziom transferu przeciwciał klasy IgY z nioski na potomstwo wynosił ok. 31,4 %, jednak poziom tego transferu był zróżnicowany w zależności od charakteru patogenu i wynosił odpowiednio 33,2 %, 51,9 %, 45,1 %, 44,3 % dla APV, NDV, ORT i PM. Dodatkowo stwierdzono różnice w poziomie transferu na różnych etapach nieśności indyczek. Badania własne potwierdziły obserwowaną wcześniej zależność co do klasy przeciwciał przekazywanych do jaj przez nioski. Przeciwciała klasy IgY są dominującą frakcją immunoglobulin w żółtku, IgM stwierdzane były jedynie w białku jaj i nie przechodzą do układu krążenia piskląt indyckich. Zgodnie z naszą wiedzą są to pierwsze badania opisujące szczegółowo zjawisko przekazywania przeciwciał matczyńskich u indyków (praca 4.3.2.V-2). Określono także udział subpopulacji limfocytów B i T w różnych częściach jajowodu u indyczek reprodukcyjnych w kilku okresach nieśności. Wyniki badań dowodzą, iż w początkowym etapie nieśności, niezależnie od analizowanej części jajowodu (część główna, cieśń, część maciczna, część pochwowa), u indyczek ma miejsce intensywna infiltracja błony śluzowej komórkami immunokompetentnymi. Jednakże wraz z wiekiem ptaków na późnym etapie nieśności ma miejsce sukcesywne zmniejszanie się liczby tych komórek w badanych strukturach (praca 4.3.2.V-3). Różnice w organizacji lokalnego układu immunologicznego w jajowodzie, które zależą w głównej mierze od wieku ptaków oraz zaawansowania etapu nieśności, mogą poniekąd tłumaczyć obserwowane w warunkach terenowych zależności dotyczące częstotliwości oraz okresów predylekcyjnych do występowania przypadków schorzeń układu rozrodczego u indyczek reprodukcyjnych.

4.3.2.V-1. Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *Selected issues in local immune system of hen's reproductive tract*. Medycyna Weterynaryjna, 2016, 72, 671-676.

(MNiSW/MEiN=15; IF=0,161)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomocy w zebraniu i analizie piśmiennictwa oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.V-2. Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Dziewulska D., Stenzel T., Koncicki A. *Field evaluation of maternal antibody transfer from breeder turkey hens to egg yolks, egg whites and poults.* Poultry Science, 2019, 98, 3150-3157. (MNiSW/MEiN=140; IF=2,659)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobieraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń serologicznych. Swój udział procentowy szacuję na 5%.

4.3.2.V-3. Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Dziewulska D., Stenzel T., Koncicki A. *Research Note: Effect of age on the distribution of lymphocytes in the oviduct in Turkey breeder hens.* Poultry Science, 2020, 99, 3009-3014. (MNiSW/MEiN=140; IF=3,352)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych i analizie uzyskanych wyników. Swój udział procentowy szacuję na 20%.

VI. Badania nad rolą cirkowirusów w patologii gołębi

Biorąc pod uwagę, że zakażenia cirkowirusem gołębi (PiCV) są najczęściej diagnozowaną (metodami molekularnymi) chorobą wirusową u gołębi w Polsce, podjęto badania własne zmierzające do opracowania testu ELISA do wykrywania przeciwciał przeciwko PiCV w surowicy oraz szczepionki podjednostkowej przeciwko zakażeniom PiCV. Celem pierwszego doświadczenia była ocena statusu serologicznego gołębi domowych niezakażonych i bezobjawowo zakażonych PiCV za pomocą testu ELISA opartego na rekombinowanym białku kapsydu tego wirusa. Białko to uzyskano przez transformację kolonii *E. coli* BL21 (DE3) plazmidem pET6xHN-N-PiCoV. Próbkę krwi i wymazy z kloaki pobrano od 171 klinicznie zdrowych gołębi, które podzielono na dwie grupy (zakażone i niezakażone PiCV), zależnie od wyników przesiewowego badania PCR. Około 70 % gołębi uzyskało wynik pozytywny na obecność przeciwciał anty-PiCV, niezależnie od statusu zakażenia, jednak poziomy tych przeciwciał były istotnie wyższe w grupie gołębi, u których wykryto obecność materiału genetycznego PiCV. Wyniki wskazują, że test ELISA jest bardzo użytecznym narzędziem uzupełniającym metody molekularne w ocenie stanu zakażenia PiCV u gołębi domowych (praca 4.3.2.VI-1). Celem kolejnych badań była ocena odpowiedzi

immunologicznej gołębi na szczepienie przeciwko PiCV z wykorzystaniem rekombinowanego białka kapsydu wirusa (rCP) jako szczepionki. W dniu szczepienia oraz 2, 23, 39 i 46 dni po pierwszej immunizacji od ptaków z każdej grupy pobierano próbki krwi, śledziona i torby Fabrycjusza w celu określenia poziomu przeciwciał anti-PiCV w surowicy, swoistych komórek B pamięci immunologicznej anti-PiCV rCP+ metodą ELISPOT w śledziona, ekspresji genu IFN- γ i odsetka limfocytów T CD3⁺, CD4⁺ i CD8⁺ oraz B IgM⁺ metodą cytometrii przepływowej. W badaniach odnotowano iż szczepienie stymuluje humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną, co przejawiało się produkcją swoistych przeciwciał, istotnie wyższą liczbą komórek B pamięci immunologicznej anti-PiCV rCP+ oraz istotnie wyższym poziomem ekspresji genu IFN- γ . Podsumowując, rCP PiCV wykazuje właściwości immunogenne i można je uznać za potencjalnego kandydata na antygen w podjednostkowych szczepionkach przeciwko infekcjom PiCV u gołębi (praca 4.3.2.VI-2). Biorąc jednak pod uwagę powszechność występowania subklinicznych zakażeń PiCV w populacji gołębi, podjęto badania mające na celu określenie skuteczności własnej szczepionki podjednostkowej. W kolejnych badaniach, celem nadrzędnym była odpowiedź na pytanie, czy szczepienie bezobjawowo zakażonych gołębi wywołuje podobną odpowiedź immunologiczną na PiCV rCP, jak u ptaków niezakażonych. Podsumowując uzyskane wyniki badań można wywnioskować, że rekombinowane białko kapsydu cirkowirusa gołębi wywołuje odpowiedź immunologiczną zarówno u gołębi naturalnie zakażonych, jak i niezakażonych, ale szybkość tej odpowiedzi zmienia się w zależności od statusu zdrowotnego gołębi. Zakażenie PiCV prowadzi do nabywania gorszej odporności po szczepieniu gołębi szczepionką podjednostkową rCP (praca 4.3.2.VI-3). Ze względu na negatywny wynik badań zmierzających do wyodrębnienia genotypu lub mutacji, która mogłaby być powiązana z patogennością tego wirusa, przeprowadzono badania kohortowe zmierzające do określenia wpływu naturalnego zakażenia PiCV na wybrane mechanizmy odporności u gołębi. Jako materiał badawczy wykorzystano młode gołębie pocztowe, które podzielono na grupy na podstawie statusu klinicznego w kontekście zakażenia PiCV (zakażone objawowo, zakażone bezobjawowo oraz niezakażone). U badanych ptaków przeprowadzono analizy metodą cytometrii przepływowej (określenie odsetka oraz liczby komórek apoptotycznych w populacji limfocytów T CD3⁺ oraz B IgM⁺) oraz biologii molekularnej (ekspresja genów kodujących receptory CD4, CD8 limfocytów T oraz genu kodującego IFN- γ , a także bezwzględne ilościowe oznaczanie kopii genomu PiCV metodą ddPCR). Badania te wykazały wyraźny wpływ zakażenia

cirkowirusem na kształtowanie się odsetka badanych subpopulacji limfocytów, bowiem liczba komórek B IgM⁺ była prawie dwukrotnie niższa w grupie ptaków objawowo zakażonych niż u ptaków określonych jako klinicznie zdrowe. Ponadto, około 20 % populacji tych limfocytów wykazywała cechy apoptozy. Zależność odwrotną stwierdzono w odniesieniu do limfocytów T CD3⁺, których najwięcej było u ptaków zakażonych klinicznie. Nie stwierdzono natomiast podwyższonego odsetka komórek apoptotycznych. Powyższe obserwacje korelowały z ilością materiału genetycznego w próbkach torby Fabrycjusza badanych gołębi. Dzięki przeprowadzeniu wymienionych badań wykazano wyraźne powiązanie pomiędzy intensywnością infekcji (liczba kopii genomu PiCV), a występowaniem klinicznej postaci choroby oraz z supresją odporności komórkowej (spadek odsetka limfocytów B IgM⁺), której konsekwencją jest upośledzenie odpowiedzi humoralnej. Powyższe należy uznać za główne konsekwencje zakażeń cirkowirusem gołębi (praca 4.3.2.VI-4).

Opisane wyżej badania były realizowane w ramach projektu nr 2014/15/D/NZ6/02416, finansowanego przez NCN pt. „Ocena wpływu rekombinowanego białka kapsydu cirkowirusa gołębiego na kształtowanie się wybranych zjawisk odpornościowych u gołębi”, w którym byłem wykonawcą.

4.3.2.VI-1. 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, 2017, 96 (2), 303–308. **(MNiSW/MEiN=140; IF=2,659)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobieraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń serologicznych. Swój udział procentowy szacuję na 5%.

4.3.2.VI-2. Stenzel T., Dziewulska D., Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Koncicki A. *Immunogenicity of pigeon circovirus recombinant capsid protein in pigeons.* Viruses, 2018, 10 (11):596. **(MNiSW/MEiN=30; IF=3,811)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, wysortowaniu komórek do badanie metodą ELISPOT, analizie danych cytometrycznych i przygotowaniu rycin do manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 15%.

4.3.2.VI-3. Stenzel T., Dziewulska D., Śmiałek M., Tykałowski B., Kowalczyk J., Koncicki A. *Comparison of the immune response to vaccination with pigeon circovirus recombinant capsid protein (PiCV rCP) in pigeons uninfected and subclinically infected with PiCV.* Plos One, 2019, 14 (6):e0219175.

(MNiSW/MEiN=100; IF=2,740)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych i wysortowaniu komórek do badanie metodą ELISPOT. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.VI-4. Stenzel T., Dziewulska D., Tykałowski B., Koncicki A. *The clinical infection with pigeon circovirus (PiCV) leads to lymphocyte B apoptosis but has no effect on lymphocyte T subpopulation.* Pathogens, 2020, 9(8):632.

(MNiSW/MEiN=100; IF=3,492)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, analizie uzyskanych wyników i przygotowaniu rycin do manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 20%.

VII. Pozostałe prace badawcze prowadzone w tym okresie

Uczestniczyłem w badaniach lekooporności bakterii występujących u gołębi domowych. W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano, że brak wrażliwości na antybiotyki jest powszechnym zjawiskiem wśród bakterii izolowanych od gołębi domowych. Najmniejszą skutecznością wobec *E. coli* charakteryzowały się tetracykliny oraz amoksylicyna, 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) tych bakterii. Najmniejszą lekoopornością charakteryzowały się izolaty *Salmonella* Typhimurium, z których tylko nieliczne były niewrażliwe na kolistynę oraz neomycynę (praca 4.3.2.VII-1).

Brałem także udział w badaniach nad możliwością zastosowania preparatów probiotycznych w wielkotowarowej produkcji drobiarskiej, w celu zminimalizowania ryzyka zakażeń drobnoustrojami zoonotycznymi (*Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp.). W badaniach własnych wykazaliśmy skuteczność krajowej produkcji probiotyku Lavipan (JHJ), w kontekście ograniczania zdolności zasiedlania przewodu pokarmowego kurcząt przez pałeczki *S. Enteritidis* (SE). Jak się bowiem okazało, 6

tygodni po zakażeniu kurcząt SE w grupie kontrolnej wzrost tej bakterii odnotowano w 87,5 % próbek kału z jelit ślepych, podczas gdy w grupie otrzymującej badany preparat probiotyczny wynik pozytywny uzyskano jedynie w 12,5 % przypadków. Równocześnie, zastosowany preparat wpłynął znacznie na ograniczenie możliwości izolacji *Salmonelli* z mięśni piersiowych zakażonych kurcząt (praca 4.3.2.VII-2).

Ze względu na fakt, że intensywne produkcje zwierzęca jest identyfikowana jako jedno ze źródeł wysokich stężeń gazów szkodliwych związanych z zanieczyszczeniem powietrza, co przekłada się również na problemy zdrowotne organizmów żywych, podejmowane są prace zmierzające do minimalizowania tego zjawiska. Powszechną metodą ograniczania emisji gazów takich jak amoniak jest stosowanie preparatów zawierających probiotyki oraz związki o działaniu higroskopijnym lub dezynfekującym. W związku z powyższym podjęto badania zmierzające do określenia wpływu stosowania na ściółkę w obecności ptaków preparatu mineralno-mikrobiologicznego, na stan fizjologiczny oraz wybrane komponenty odporności komórkowej i humoralnej u różnych gatunków i typów użytkowych drobiu (kury reprodukcyjne, brojlery kurze oraz indyki rzeźne). W próbkach surowicy analizowano markery biochemiczne profilu wątroby i nerek (ALT, AST, LDH, ALP, CK, TP, CALC, PHOS) oraz miano swoistych przeciwciał przeciwko AEV, aMPV, NDV, IBDV, HEV i BA. Procentowy udział subpopulacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ oraz limfocytów B określono w próbkach błony śluzowej tchawicy, krwi i śledziony. Badania przeprowadzone z użyciem metod cytometrii przepływowej i ELISA, podobnie jak oznaczenia wybranych wskaźników biochemicznych w surowicy ptaków doświadczalnych, nie wykazały istotnych różnic pomiędzy grupami badanymi i odpowiadającymi im grupami kontrolnymi. Tym samym wykazano nie tylko skuteczność testowanego preparatu, ale i jego bezpieczeństwo w trakcie stosowania w obecności ptaków, co ma duże znaczenie w odniesieniu do praktyki terenowej (praca 4.3.2.VII-3).

Poza badaniem wpływu fitoncydów i olejków eterycznych znajdujących się w preparacie komercyjnym AdiSalmo^{SOL} PF na układ immunologiczny kurcząt, postanowiliśmy sprawdzić czy wpływają one na morfologię narządów wewnętrznych i morfometrię jelit u tych ptaków. Badanie przeprowadzono na 60 ptakach podzielonych na 3 grupy - jedną kontrolną i dwie eksperymentalne. Począwszy od 21. dnia życia, kurczęta z grup eksperymentalnych otrzymywały wodę z dodatkiem badanego preparatu. Grupa 1 otrzymywała suplement dwukrotnie: przez 3 dni w dawce 1 ml/l a po dziewięciu dniach przerwy podawano im do wody badany preparat w dawce 1 ml/l

przez kolejne 5 dni. Grupa 2 otrzymywała AdiSalmo^{SOL} PF od 21. do 24. dnia w dawce 1 ml/l wody do picia. Po uboju od 40-dniowych kurcząt pobrano: żołądek, dwunastnicę, jelito czcze, jelito biodrowe, jelito ślepe, wątrobę, śledzionę, nerki, torbę Fabrycjusza, płuca i mięśnie piersiowe do analiz histologicznych. Dodatkowo analizowano wysokość kosmków (VH) i głębokość krypt (CD) w dwunastnicy, jelicie czczym i jelicie krętym. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami w liczbie zmian histologicznych w pobranych narządach. Ocena morfometryczna wykazała statystycznie istotne różnice między grupami w wysokości kosmków i głębokości krypt w dwunastnicy i jelicie biodrowym (praca 4.3.2.VII-4).

4.3.2.VII-1. Stenzel T., Bancercz-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 (1), 169–171.

(MNiSW/MEiN=20; IF=0,604)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobieraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych. Swój udział procentowy szacuję na 5%.

4.3.2.VII-2. Śmiałek M., Kaczorek E., Szczucinska E., Burchardt S., Kowalczyk J., Tykałowski B., Koncicki A. *Evaluation of Lactobacillus spp. and yeast based probiotic (Lavipan) supplementation for the reduction of Salmonella Enteritidis after infection of broiler chickens.* Polish Journal of Veterinary Sciences, 2019, 22 (1), 5–10.

(MNiSW/MEiN=100; IF=0,516)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pobieraniu materiału do badań, pomocy w wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych. Swój udział procentowy szacuję na 5%.

4.3.2.VII-3. Kowalczyk J., Tykałowski B., Śmiałek M., Stenzel T., Dziewulska D., Koncicki A. *Effect of a Mineral–Microbial Deodorizing Preparation on the Functions of Internal Organs and the Immune System in Commercial Poultry.* Animals, 2021, 11 (9):2592.

(MNiSW/MEiN=100; IF=3,231)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, opiece weterynaryjnej nad ptakami doświadczalnymi, szczepieniu kurcząt brojlerów, pobraniu materiału do badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, analizie uzyskanych wyników i wyciągnięciu wniosków. Swój udział procentowy szacuję na 20%.

4.3.2.VII-4. Wojtacka J., Wysok B., Wiszniewska-Łaszczych A., Gomółka-Pawlicka M., Gesek M., Chłódowska A., Tykałowski B., Rózański H., Iwiński H., Koncicki A. *Effect of water supplemented with a herbal product on the internal organs of broiler chickens.* Medycyna Weterynaryjna, 2023, 79(8), 422-427.

(MNiSW/MEiN=70; IF=0,398)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, opiece weterynaryjnej nad ptakami doświadczalnymi, podawaniu badanego preparatu ptakom i pobieraniu próbek do badań mikrobiologicznych w trakcie doświadczenia. Swój udział procentowy szacuję na 10%.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

5.1. Badania naukowe prowadzone w Katedrze Biochemii i Toksykologii Wydziału Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki UP w Lublinie

W zespole prof. dr hab. Katarzyny Ognik realizowałem projekt badawczy nr UMO-2017/27/B/NZ9/01007 pt. „Antyoksydacyjne i immunostymulujące oddziaływanie zróżnicowanych poziomów i wzajemnego stosunku lizyny, argininy i metioniny w mieszankach dla indyków rzeźnych”. Za całokształt zrealizowanych i opublikowanych badań otrzymaliśmy I Nagrodę Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk w 2022 roku.

Obecnie realizujemy wspólnie projekt badawczy nr 2020/39/B/NZ9/00765 pt. „Odpowiedź układu immunologicznego i systemu oksydoredukcyjnego indyków żywionych dietami z lub bez dodatku kocydiostatyku na wczesne podanie antybiotyków”. Planowany termin zakończenia projektu to 2025 rok.

Efektom prowadzonych wspólnie badań są następujące publikacje:

5.1.1. Ognik K., Mikulski D., Konieczka P., Tykałowski B., Krauze M., Stępińska A., Nynca A., Jankowski J.: *The immune status, oxidative and epigenetic changes in tissues of turkeys fed diets with different ratios of arginine and lysine.* Scientific Reports, 2021, 11(1):15975. **(MNiSW/MEiN=140; IF=4,997)**

5.1.2. Jankowski J., Tykałowski B., Stępniewska A., Konieczka P., Koncicki A., Matusевич P., Ognik K. *Immune Parameters in Chickens Treated with Antibiotics and Probiotics during Early Life*. *Animals*, 2022, 12 (22):1133. (MNiSW/MEiN=100; IF=3,231)

5.1.3. Smagiel R., Ognik K., Cholewińska E., Stępniewska A., Listos P., Tykałowski B., Mikulski D., Koncicki A., Jankowski J. *The effect of early administration of antibiotics or feeding diet containing a coccidiostat on inflammatory responses and the morphological structure of selected organs of the immune system in young meat-type turkeys*. *Poultry Science*, 2023, 102:102876. (MNiSW/MEiN=140; IF=4,014)

5.2. Badania naukowe prowadzone w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Prowadząc wspólne badania z zespołem prof. dr hab. Artura Niedźwiedzia opracowałem metodykę oznaczania odsetka limfocytów, neutrofilii i makrofagów oraz ich apoptozy w wypluczynach z tchawicy i drzewa oskrzelowego u koni z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wykazaliśmy, że apoptoza neutrofilii/makrofagów w wypluczynach z tchawicy i drzewa oskrzelowego, jest odmienna u koni dotkniętych nawracającą chorobą obturacyjną w porównaniu z końmi klinicznie zdrowymi. Stwierdziliśmy istotną różnicę między odsetkiem neutrofilii we wczesnej i w późnej apoptozie neutrofilii między grupą badaną i kontrolną.

Efektom prowadzonych wspólnie badań jest następująca publikacja:

5.2.1. Niedźwiedź A., Jaworski Z., Tykałowski B., Śmiałek M. *Neutrophil and macrophage apoptosis in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with recurrent airway obstruction (RAO)*. *BMC Veterinary Research*, 2014, 10:29. (MNiSW/MEiN=40; IF=1,777)

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne:

- Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej pt. „Reakcja indyków na zróżnicowaną zawartość metioniny w paszy” dr inż. Magdaleny Kubińskiej. Obrona odbyła się 13.10.2017 roku na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt UWM w Olsztynie
- Opracowanie autorskiego programu nowego przedmiotu:
 - „Zastosowanie cytometrii przepływowej” dla doktorantów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie
 - „Najważniejsze choroby drobiu i ich profilaktyka” dla studentów studiów dualnych Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UWM w Olsztynie
- Koordynator przedmiotów:
 - Choroby ptaków sem. II
 - Zastosowanie cytometrii przepływowej
 - Najważniejsze choroby drobiu i ich profilaktyka
 - Staż kliniczny z chorób ptaków
- Realizacja przedmiotów:
 - Technologie w produkcji zwierzęcej
 - Choroby ptaków sem I i II
 - Zastosowanie cytometrii przepływowej
 - Najważniejsze choroby drobiu i ich profilaktyka
 - Staż kliniczny z chorób ptaków
- Wykłady dla słuchaczy szkolenia specjalizacyjnego nr 5 „Choroby drobiu” realizowanego przez:
 - WCKP w Puławach
 - Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych UP we Wrocławiu
- Współautorstwo podręcznika dla studentów i lekarzy weterynarii „Choroby drobiu” pod redakcją M. Mazurkiewicza i A. Wieliczko, Wrocław, 2019, ISBN 978-83-7717-314-5

- Przygotowanie materiałów do e-learningu:
 - na Warmińsko-Mazurskim Portalu Weterynaryjnym dla studentów i lekarzy weterynarii (artykuły, prezentacje, atlasy)
 - na platformie edukacyjnej Moodle UWM dla studentów weterynarii i zootechniki (webinary)

6.2. Osiągnięcia organizacyjne:

- Opiekun pracowni cytometrii przepływowej
- Opiekun Pawilonu Zakazań Eksperymentalnych Ptaków
- Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych:
 - Członek Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych
 - Członek Komisji Ekspertów ds. produktu popieranego przez PTNW (autor czterech opinii nt. produktów firm, które ubiegały się o status „Produktu popieranego przez PTNW)
 - Członek Polskiego Towarzystwa Cytometrii
 - Członek Światowego Stowarzyszenia Patologów Drobiu (World Veterinary Poultry Association)
- Nagrody za działalność organizacyjną:
 - Nagroda indywidualna II st. Rektora UWM (2022 r.)
 - Nagroda indywidualna II st. Rektora UWM w Olsztynie (2019 r.)
 - Nagroda indywidualna III st. Rektora UWM w Olsztynie (2015 r.)
 - Nagroda indywidualna II st. Rektora UWM w Olsztynie (2012 r.)
- Recenzent prac naukowych w czasopismach:
 - Polish Journal of Veterinary Sciences (IF=0,859)
 - Journal of Veterinary Research (IF=1,8)
 - Veterinary Sciences (IF=2,4)
 - Animals (IF=3,0)
 - BMC Veterinary Research (IF=2,62)
- W moim dorobku znajduje się również opracowanie opinii sądowej w sprawie cywilnej dla Wydziału Gospodarczego Sądu Okręgowego w Elblągu oraz opracowanie opinii nt. ustalenia przyczyn padnięć indyków na zlecenie firmy Golpasz S.A.

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę:

6.3.1. Publikacje przeglądowe w czasopismach naukowych:

- Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *Bakterie z rodzaju Klebsiella spp. w patologii drobiu i ich znaczenie w epidemiologii zatruc pokarmowych*. Medycyna Weterynaryjna, 2017, 73 (9), 528–531.
- Tykałowski B., Koncicki A. *The principles of rational chemotherapy of bacterial infections in poultry*. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 2018, 20 (87), 45–49.

6.3.2. Publikacje w czasopismach popularno-naukowych przeznaczonych dla praktykujących lekarzy weterynarii:

- Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T. *Profikatyka swoista chorób drobiu*. Magazyn Weterynaryjny, Supplement- Choroby Ptaków, 2006, 34-38.
- Koncicki A., Stenzel T., Tykałowski B. *Etiopatogeneza, profilaktyka i leczenie histomonozji indyków*. Magazyn Weterynaryjny, Supplement - Choroby Ptaków 2007, 41–44.
- Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Immunomodulacja – nowy kierunek w immunologii klinicznej*. Polskie Drobiarstwo, Supplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2007, 3–8.
- Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T. *Ptaki – potencjalne źródło zagrożeń zdrowia człowieka*. Weterynaria w terenie, 2008, 2 (1), 30–33.
- Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Dzikie ptaki. Ich rola w rozprzestrzenianiu groźnych dla drobiu chorób wirusowych*. Weterynaria w terenie, 2008, 2 (1), 26–29.
- Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Choroba okrągłego serca u indyków*. Weterynaria w terenie, 2008, 4, 47–49.

- Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicka-Świdorska K. *Ornitobakterioza indyków - zapobiegać, czy leczyć?* Magazyn Weterynaryjny, Suplement - Choroby Ptaków, 2008, 396–400.
- Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Choroby naczyń u indyków.* Magazyn Weterynaryjny, Suplement - Choroby Ptaków, 2009, 412–415.
- Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Kolibakteriozy drobiu.* Weterynaria w terenie, 2009, 58–60.
- Koncicki A., Stenzel T., Tykałowski B., Koncicka - Świdorska K. *Aktualne poglądy na temat profilaktyki i leczenia nekrotycznego zapalenia jelit u drobiu.* Magazyn Weterynaryjny, Suplement - Choroby Ptaków, 2009, 415–419.
- Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Wpływ wybranych czynników genetycznych i żywieniowych na występowanie osteopatii u drobiu.* Magazyn Weterynaryjny, Suplement - Choroby Ptaków, 2009, 436–441.
- Koncicki A., Stenzel T., Tykałowski B., Koncicka-Świdorska K. *Ocena skuteczności poliwalentnej szczepionki ORNITIN w immunoprofilaktyce ornitobakteriozy indyków.* Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2008, 8–10.
- Tykałowski B., Stenzel T., Mazur-Lech B., Koncicki A. *Niski poziom dobrostanu, jako główna przyczyna występowania problemów zdrowotnych na fermach drobiu.* Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2010, 32–36.
- Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Mazur-Lech B., Tykałowska K., Koncicka-Świdorska K. *Wpływ profilaktyki swoistej i bioasekuracji na zachorowalność indyków oraz przydatność testu ELISA w ocenie skuteczności szczepień i w diagnostyce chorób zakaźnych indyków.* Magazyn Weterynaryjny, Suplement - Choroby Ptaków, 2010, 436–440.
- Stenzel T., Tykałowski B., Mazur-Lech B., Kwiatkowska A., Koncicki A. *Trichomonozą – stary, lecz wciąż aktualny problem zdrowotny w hodowli*

- gołębi. Magazyn Weterynaryjny, Suplement - Choroby Ptaków, 2010, 466–469.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Kontaktowe zapalenie skóry oraz cellulitis u indyków*. Magazyn Weterynaryjny, Suplement- Choroby ptaków, 2011, 740–744.
 - Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Pestka D., Koncicki A. *Układ odpornościowy, a czynniki immunosupresyjne i ich następstwa w chowie indyków*. Polskie Drobiarstwo- Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2012, 49–55.
 - Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Koncicki A. *Stany patologiczne wola u ptaków grzebiących*. Życie Weterynaryjne, 2012, 87, 1029–1031.
 - Pestka D., Śmiałek M., Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Diagnostyka molekularna zakażeń mykoplazmami kur i indyków*. Magazyn Weterynaryjny, 2012, 462–467.
 - Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Pestka D., Koncicki A. *Patogeneza oraz wybrane zjawiska immunologiczne w przebiegu zakażeń Mycoplasma spp. u drobiu grzebiącego*. Magazyn Weterynaryjny, 2013, 335–340.
 - Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D. *Możliwości zastosowania żywieniowych dodatków funkcjonalnych do modulacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej u ptaków*. Magazyn Weterynaryjny, Suplement- Choroby Ptaków, 2014, 359–362.
 - Pestka D., Stenzel T., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Paramyksowiroza gołębi – aktualny stan wiedzy*. Magazyn Weterynaryjny, 2014, 9, 915–918.
 - Śmiałek M., Śmiałek A., Tykałowski B., Koncicki A. *Przyczyny występowania zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego u kurcząt na przykładzie przypadku terenowego*. Magazyn Weterynaryjny, Suplement- Choroby Ptaków, 2014, 385–391.

- Stenzel T., Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D., Koncicki A. *Medycyna naturalna w profilaktyce i terapii chorób gołębi*. Magazyn Weterynaryjny, Suplement- Choroby Ptaków, 2014, 410–413.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Stenzel T., Pestka D., Koncicki A. *Rola wirusa krwotocznego zapalenia jelit w patologii indyków*. Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2014, 34–39.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Stenzel T., Pestka D., Koncicki A., Gesek M. *Rola beztlenowców z rodzaju Clostridium w patologii indyków*. Magazyn Weterynaryjny, Suplement- Choroby Ptaków, 2015, 36–41.
- Stenzel T., Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D., Koncicki A. *Problemy immunoprofilaktyki w stadach gołębi*. Magazyn Weterynaryjny, Suplement- Choroby Ptaków, 2015, 48–54.
- Tykałowski B., Koncicki P., Śmiałek M., Tykałowska K., Welenc J., Koncicki A. *Kardiomiopatia rozstrzeniowa u indyków*. Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2015, 28–31.
- Koncicki A., Koncicka-Świdorska K., Stenzel T., Śmiałek M., Tykałowski B., Welenc J. *Praktyczne uwagi o racjonalnej antybiotykoterapii chorób drobiu*. Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2016, 3–9.
- Koncicki A., Stenzel T., Koncicka-Świdorska K., Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J. *Algorytmy diagnostyczno-terapeutyczne w przebiegu wybranych bakteryjnych chorób indyków*. Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2017, 42–44.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Stenzel T., Koncicki A. *Immunoprofilaktyka krwotocznego zapalenia jelit u indyków*. Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2020, 78–84.
- Koncicki A., Koncicka-Świdorska K., Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Stenzel T. *Czy fitoncydy stosowane w profilaktyce i terapii chorób drobiu mogą ograniczyć antybiotykoterapię?* Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2020, 96–100.

- Tykałowski B., Kowalczyk J., Koncicki A. *Problemy zdrowotne w stadach przyzagrodowych kur w dobie pandemii COVID-19*. Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2021, 72–79.
- Tykałowski B., Koncicki A. *Wpływ stosowania antybiotyków i sulfonamidów na układ immunologiczny ptaków*. Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2022, 38–41.
- Koncicki A., Koncicka-Świdierska K., Śmiałek M., Tykałowski B., Kowalczyk J., Stenzel T. *Czy jest możliwy bezantybiotykowy chów drobiu?* Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie dla lekarzy weterynarii, 2022, 77–82.

6.3.3. Artykuły w czasopismach popularno-naukowych dla hodowców drobiu i lekarzy weterynarii:

- Koncicki A., Tykałowski B. *Nieśność i wartość biologiczna jaj indyckich – wybrane aspekty*. Polskie Drobiarstwo, 2005, 12 (14), 3–6.
- Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Histomonozą indyków*. Polskie Drobiarstwo, 2007, 30–36.
- Koncicki A., Tykałowski B., Koncicka-Świdierska K. *Czy fale elektromagnetyczne i pole magnetyczne stanowią zagrożenie dla zdrowia i produktywności drobiu?* Polskie Drobiarstwo, 2008, 4, 20–22.
- Koncicka-Świdierska K., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Rola beztlenowców z rodzaju Clostridium w patologii drobiu*. Polskie Drobiarstwo, 2009, 4, 18–21.
- Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicka-Świdierska K. *Przyczyny zaburzeń fizjologii przewodu pokarmowego u indyków - wybrane zagadnienia*. Polskie Drobiarstwo, 2009, 11, 58–62.
- Tykałowski B., Stenzel T. *Pęknięcie worków powietrznych u ptaków*. Woliera, 2009, 6, 150–152.

- Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Niektóre czynniki wpływające na występowanie schorzeń kończyn u ptaków. cz. 1.* Magazyn Hodowcy, 2010, 3, 28–31.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Niektóre czynniki wpływające na występowanie schorzeń kończyn u ptaków. cz. 2.* Magazyn Hodowcy, 2011, 1, 31–33.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Zakaźne zapalenie nosa i tchawicy indyków (TRT) – poznaj... i kontroluj swojego wroga.* Polskie Drobiarstwo, 2011, 6, 32–35.
- Tykałowski B., Stenzel T., Śmiałek M., Pestka D., Koncicki A. *Zaburzenia rozwojowe u kur i indyków obserwowane podczas zajęć dydaktycznych z przedmiotu Choroby ptaków.* Polskie Drobiarstwo, 2014, 8, 10–13.
- Koncicki A., Tykałowski B., Śmiałek M., Pomianowski A., Koncicka-Świdorska K. *DIAROSAN P (JHJ) w leczeniu biegunek u drobiu.* Polskie Drobiarstwo, 2014, 9, 67–72.
- Tykałowski B., Łoś A., Kapusto A. *Nekrotyczne zapalenie jelit (NE) u drobiu.* Magazyn Hodowcy, 2016, 2, 28–31.
- Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *Znaczenie zakażeń bakteryjnych w patologii układu rozrodczego u drobiu grzebiącego.* Polskie Drobiarstwo, 2017, 2, 18–25.
- Śmiałek M., Kowalczyk J., Tykałowski B., Śmiałek A., Koncicki A. *Protektotypy IBV - znaczenie, ogólne założenia strategii oraz immunologiczne podstawy skuteczności.* Polskie Drobiarstwo, 2017, 5, 56–62.
- Dziewulska D., Stenzel T., Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *Zasady pobierania materiału biologicznego od ptaków do badań z wykorzystaniem technik biologii molekularnej.* Polskie Drobiarstwo, 2017, 12, 12–27.

- Śmiałek M., Gesek M., Tykałowski B., Welenc J., Milewska N., Koncicki A. *Znaczenie aviadenowirusów w patologii indyków*. Polskie Drobiarstwo, 2019, 2, 26–30.
- Tykałowski B., Kowalczyk J., Tykałowska K., Koncicki A. *Wszółowica - najczęściej diagnozowana wiosną parazytoza w przyzagrodowych stadach kur*. Polskie Drobiarstwo, 2019, 5, 30-33
- Kowalczyk J., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Wpływ fitoncydów na mikroflorę przewodu pokarmowego u drobiu*. Polskie Drobiarstwo, 2019, 9, 32–35.
- Tykałowski B., Kowalczyk J., Koncicki P., Koncicki A. *Samorzutne pęknięcie tętnic u indyków*. Polskie Drobiarstwo, 2019, 6, 26-29
- Koncicki A., Tykałowski B. *Badania nad możliwością zastosowania fitoncydów w profilaktyce i terapii chorób drobiu*. Polskie Drobiarstwo, 2020, 2, 58.
- Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *Enteropatie wirusowe u indyków*. Polskie Drobiarstwo, 2020, 11, 6–9.
- Śmiałek M., Kowalczyk J., Tykałowski B., Koncicki A. *Test ELISA - tajemnica „jednego słupka”*. Polskie Drobiarstwo, 2021, 1, 16–18.
- Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Nowoczesne wyposażenie laboratoriów kluczowym narzędziem w diagnostyce chorób drobiu*. Polskie Drobiarstwo, 1, 2022, 32–33.
- Śmiałek M., Kowalczyk J., Tykałowski B., Stenzel T., Dziewulska D., Koncicki A. *Plusy i minusy różnicy czułości testów ELISA w kontekście monitoringu stanu zdrowia ptaków*. Polskie Drobiarstwo, 2022, 7, 22–25.
- Koncicki A., Koncicka-Świdorska K., Śmiałek M., Tykałowski B., Kowalczyk J., Stenzel T. *Czy jest możliwy bezantybiotykowy chów drobiu? Cz. I*. Polskie Drobiarstwo, 2022, 9, 30–33.

- Koncicki A., Koncicka-Świderska K., Śmiałek M., Tykałowski B., Kowalczyk J., Stenzel T. *Czy jest możliwy bezantybiotykowy chów drobiu? Cz. II.* Polskie Drobiarstwo, 2022, 10, 2–5.
- Łoś A., Tykałowski B., Koncicki A. *Ornitobakterioza – jeden z głównych problemów w wielkotowarowym chowie drobiu.* Indyk Polski, 2023, 1, 58–60.

6.3.4. Wystąpienia ustne na konferencjach zagranicznych:

- Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Pestka D, Stenzel T, Koncicki A *The influence of haemorrhagic enteritis virus infection on the immunological system and the associated risk of pathogenic E. coli in turkeys in Poland.* XI Turkey Times Science and Production Conference, 9-10.03.2017 r., Chester, Anglia, s. 38-40.
- Kubińska M., Tykałowski B., Jankowski J., Zduńczyk Z. *The effect of different dietary levels and sources of methionine on turkeys.* XII Turkey Times Science and Production Conference, 21-23.03.2018 r., Chester, Anglia, s. 59-62.

6.3.5. Wystąpienia ustne na konferencjach krajowych i międzynarodowych organizowanych w Polsce:

- Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Wpływ technologii chowu i żywienia na procesy kostnienia u ptaków.* Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu. 03-05.07.2009 r., Wrocław, s. 26-35.
- Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Wpływ metizoprinolu stosowanego in ovo na wybrane elementy układu odpornościowego u 1-dniowych piskląt indyckich.* Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem embriopatologii i okresu okołolęgowego. 01-02.07.2010 r., Wrocław, s. 94–102.
- Tykałowski B., Stenzel T., Śmiałek M., Koncicki A. *Chosen problems concerning ossification processes and their disorders in birds.* XXII International Poultry Symposium PB WPSA, 06-08.08.2010 r., Olsztyn, s. 135.

- Tykałowski B., Śmiałek M., Stenzel T., Jankowski J., Koncicki A. *Wybrane parametry odporności komórkowej u kurcząt brojlerów w przebiegu eksperymentalnej kokcydiozy*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem pasożytów. 01-02.07.2011 r., Wrocław, s.64-69.
- Tykałowski B. *Wpływ zakażenia indyków wirusem krwotocznego zapalenia jelit i immunomodulacji na kształtowanie się odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ syntetyzujących IFN-Gamma*. II Zjazd Polskiego Towarzystwa Cytometrii. 07-08.09.2012 r. Kazimierz Dolny.
- Tykałowski B., Stenzel T., Śmiałek M., Pestka D., Koncicki A. *Wpływ oksytetracykliny stosowanej per os na wybrane parametry układu odpornościowego indyków*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem lekooporności drobnoustrojów. 27-28.06.2013 r., Wrocław, s. 82–87.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Stenzel T., Pestka D., Koncicki A. *Możliwość zastosowania immunomodulatorów we wspomaganiu terapii chorób bakteryjnych drobiu wywołanych przez szczepy odporne na antybiotyki*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem lekooporności drobnoustrojów. 27-28.06.2013 r., Wrocław, s. 88–96.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D. *Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny stanu komórek układu immunologicznego ptaków w przebiegu chorób o etiologii wirusowej*. Kotwicka M. (red.): Poznańskie dni cytometrii i immunopatologii. 16-17.05.2013 r., Poznań, s. 87.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Immunomodulacja w kontekście odporności poszczepiennej przeciwko wybranym chorobom drobiu o etiologii wirusowej*. Minta Z. (red.): Szczepionki i szczepienia u drobiu: terażniejszość i przyszłość. 17-18.10.2014 r., Puławy, s. 145–153.
- Tykałowski B. *Wpływ immunomodulatorów naturalnych i syntetycznych na wybrane parametry odporności nieswoistej u indyków*. Vet Forum, IV Kongres Praktyki Weterynaryjnej. 05-06.04.2014 r., Łódź, s. 151–154.

- Tykałowski B. *Możliwości zastosowania naturalnych immunomodulatorów roślinnych w wielkotowarowym chowie drobiu i ich wpływ na humoralne i komórkowe mechanizmy obronne u ptaków*. III Zjazd Polskiego Towarzystwa Cytometrii, 17-19.09.2014 r., Kazimierz Dolny.
- Tykałowski B. *Mechanizmy pamięci immunologicznej u ptaków*. Vet Forum, V Kongres Praktyki Weterynaryjnej, 25-26.04.2015 r., Łódź, s. 167–168.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Stenzel T., Pestka D., Tykałowska K., Koncicki A. *Wpływ wirusa krwotocznego zapalenia jelit na układ odpornościowy indyków*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem aspektów zootechniczno-weterynaryjnych w chowie kur mięsnych i indyków. 25-26.06.2015 r., Wrocław, s. 103–110.
- Tykałowski B. *Wpływ warunków chowu na funkcjonowanie układu immunologicznego ptaków utrzymywanych systemem intensywnym*. Vet Forum VI Kongres Praktyki Weterynaryjnej, 23-24.04.2016 r., Łódź, s. 145–148.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D., Welenc J., Stenzel T., Koncicki A. *Wpływ izoprinozyny na kształtowanie się wybranych parametrów odporności u zielononózek kuropatwianych szczepionych przeciwko IB i ND*. XV Kongres PTNW, 22-24.09.2016 r., Lublin, s. 501.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Dziewulska D., Stenzel T., Koncicki A. *Wpływ uodporniania indyków przeciwko adenowirusowi krwotocznego zapalenia jelit na mechanizmy odpowiedzi komórkowej w warunkach dużej presji wirusa terenowego*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem monitorowania zdrowia ptaków. 23-24.06.2018 r., Wrocław, s. 100-106.
- Tykałowski B. *Immunoprofilaktyka rzekomego pomoru drobiu jako jeden z elementów poprawy zdrowotności i produktywności indyków rzeźnych*. Konferencja firmy De Heus Sp. z o. o. dla lekarzy weterynarii i producentów drobiu. 29-30.05.2019 r., Sulęcín.

- Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Koncicki A. *Fitonocydy w profilaktyce i terapii histomonozы indyków*. Wieliczko A. (red.): 50. Jubileuszowa konferencja naukowa - Aktualne problemy w patologii drobiu. 28-30.06.2019 r., Polanica Zdrój, s. 155–160.
- Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Koncicki A. *Wpływ szczepienia indyków przeciwko krwotocznemu zapaleniu jelit na wybrane wskaźniki odporności humoralnej i komórkowej*. XVI Kongres PTNW „Omnia Autem Animalia Sunt”. 26-27.11.2021 r., Warszawa s. 375. Referat wygłoszony on-line.
- Tykałowski B., Koncicki A. *Immunoprofilaktyka krwotocznego zapalenia jelit u indyków*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem możliwości zapobiegania szerzeniu się chorób zakaźnych. 30.06-01.07.2022 r., Wrocław s. 35–40.

6.3.6. Doniesienia na konferencje zagraniczne:

- Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Pestka D., Koncicki A. *Selected parameters of upper respiratory tract immunity in turkey vaccinated against the TRT*. XVIII World Veterinary Poultry Association Congress, 19-23.08. 2013 r., Nantes, Francja.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Stenzel T., Furmanek D., Koopman R., Koncicki A. *New insight into protectotype strategy as a tool in chicken infectious bronchitis control*. AAAP Annual Meeting, 11-15.05.2015 r., Boston, USA.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Stenzel T., Furmanek D., Koopman R., Koncicki A. *Application of Infectious bronchitis (IB) vaccines at hatch day of broiler chickens in different vaccination schedules*. XIX World Veterinary Poultry Association Congress, 07-11.09.2015 r., Cape Town, RPA.
- Dziewulska D., Stenzel T., Śmiałek M., Tykałowski B., Kowalczyk J., Koncicki A. *An evaluation of the impact of Aloe vera and licorice extracts on immune response to PPMV-1 infection in pigeons*. International Avian

Respiratory Disease Conference. 29.05.- 01.06. 2018. Athens, Georgia, USA.

- Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Stenzel T., Koncicki A. *The influence of vaccination of turkeys against HEV on mechanisms of humoral and cell-mediated immunity under conditions of the high pressure of the field virus*. XXI World Veterinary Poultry Association Congress, 16-20.09.2019 r., Bangkok, Tajlandia.
- Tykałowski B. *Effect of vaccination of turkeys against Marek's disease on selected parameters of humoral and cellular immunity*. XXII World Veterinary Poultry Association Congress, 04-08.09.2023 r., Verona, Włochy.

6.3.7. Doniesienia na konferencje krajowe i międzynarodowe organizowane w Polsce:

- Koncicki A., Stenzel T., Tykałowski B. *Krajowy program zwalczania zakażeń pałeczkami salmonella u drobiu*. Szweda W., Siwicki A. (red.): Epizootyczne aspekty monitorowania i zwalczania zoonoz w Polsce i Unii Europejskiej, 15.06.2007 r., Olsztyn, s. 21–25.
- Koncicki A., Rumińska E., Stenzel T., Mazur-Gonkowska B., Tykałowski B. *Application of izoprinosine in ovo to immunomodulation in turkeys*. Rutkowski A., Jankowski J. (red.): XIX International Poultry Symposium WPSA, "Science of poultry practice - poultry practice for science". 10-12.09.2007 r., Olsztyn, s. 63.
- Stenzel T., Tykałowski B., Mazur-Lech B., Koncicki A. *Zakażenia ptaków wolnożyjących w świetle monitoringu serologicznego*. Wieliczko A. (red.) Monitoring zagrożeń w produkcji drobiarskiej - aspekty bezpieczeństwa żywności. 07-08.09.2007 r., Wrocław, s. 208–212.
- Stenzel T., Tykałowski B., Bednarek D., Tomczyk G., Andrzejewski M., Koncicki A. *Wpływ methisoprinolu aplikowanego in ovo na nieswoiste mechanizmy odporności komórkowej u indyków*. XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Od Nauki do Praktyki”. 18-20.09.2008 r., Olsztyn, s. 61–62.

- Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicka-Świdowska K., Skoradzki A. *Ocena efektywności inaktywowanej szczepionki „ORNITIN” (ABIC) w profilaktyce ornitobakteriozy indyków*. XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Od Nauki do Praktyki”, 18-20.09.2008 r., Olsztyn, s. 62–63.
- Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T. *Wybrane zagadnienia z fizjologii przewodu pokarmowego oraz przyczyny jej zaburzeń u indyków*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu. 03-05.07.2009 r., Wrocław, s. 19–25.
- Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Wpływ β -glukanów, lewamizolu i metizoprinolu na dynamikę swoistej odporności humoralnej oraz wybrane parametry nieswoistej odporności komórkowej u gołębi uodpornianych czynnie przeciwko PPMV-1*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu. 03-05.07.2009 r., Wrocław, s. 200–208.
- Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T. *Zastosowanie metizoprinolu in ovo w modulowaniu odporności u ptaków*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem embriopatologii i okresu okołolęgowego. 01-02.07.2010 r., Wrocław, s. 85–94.
- Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Hepatotoksyczność metizoprinolu zastosowanego jako immunomodulator u gołębi sportowych (Columba livia domestica)*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem embriopatologii i okresu okołolęgowego. 01-02.07.2010 r., Wrocław, s. 278–283.
- Koncicki A., Stenzel T., Tykałowski B., Śmiałek M. *Current problems in turkey pathology*. XXII International Poultry Symposium, PB WPSA, 06-08.08.2010 r., Olsztyn, s. 89.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Rola gruczołu Hardera w odporności lokalnej błony śluzowej górnych dróg oddechowych u drobiu*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze

szczególnym uwzględnieniem pasożytów. 01-02.07.2011 r., Wrocław, s. 79–84.

- Tykałowski B., Stenzel T., Śmiałek M., Koncicki A. *Wpływ zakażenia indyków adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit i immunomodulacji na kształtowanie się odsetka śledzionowej subpopulacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ syntetyzujących IFN-Gamma w odpowiedzi na mitogeny (badania in vitro)*. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, 13-15.09.2012 r., Wrocław, s. 432.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Wybrane parametry lokalnej odporności komórkowej oraz humoralnej u indyków uodpornianych przeciwko TRT*. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, 13-15.09.2012 r., Wrocław, s. 400.
- Stenzel T., Pestka D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Monitoring wybranych zakażeń wirusowych gołębi na terenie Polski*. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, 13-15.09.2012 r., Wrocław, s. 427.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Stenzel T., Koncicki A. *Wykorzystanie sortera komórek oraz techniki elispot do oceny rozwoju pamięci immunologicznej komórek B IGA⁺ po szczepieniu indyków przeciwko aMPV*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem lekooporności drobnoustrojów. 27-28.06.2013 r., Wrocław, s. 147–153.
- Stenzel T., Szulia G., Fordońska J., Górska J., Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Koncicki A. *Antybiotykooporność wybranych bakterii izolowanych od gołębi w Polsce na przestrzeni lat 2010-2013*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem lekooporności drobnoustrojów. 27-28.06.2013 r., Wrocław, s. 174–181.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Czynniki warunkujące skuteczność programów profilaktyki swoistej w stadach indyków reprodukcyjnych i rzeźnych*. Minta Z. (red.): Szczepionki i szczepienia u drobiu: teraźniejszość i przyszłość. 17-18.10.2014 r., Puławy, s. 95–106.

- Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Stenzel T., Koncicki A. *Fizjologia układu oddechowego ptaków grzebiących w kontekście zjawisk odporności poszczepiennej i zakażeń naturalnych*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem chorób układu oddechowego. 26-27.06.2014 r., Wrocław, s. 11–26.
- Koncicki A., Stenzel T., Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D. *Występowanie zakażeń *Bordetela avium* u indyków i ptaków wolno żyjących*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem chorób układu oddechowego. 26-27.06.2014 r., Wrocław, s. 55–60.
- Stenzel T., Pestka D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Występowanie i zróżnicowanie genetyczne *Chlamydia psittaci* izolowanych od gołębi w Polsce*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem chorób układu oddechowego. 26-27.06.2014 r., Wrocław, s. 117–124.
- Koncicki A., Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T. *Fizjologia przewodu pokarmowego i przyczyny jej zaburzeń u drobiu*. Vet Forum, IV Kongres Praktyki Weterynaryjnej. 05-06.04.2014 r., Łódź, s. 139–141.
- Koncicki A., Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T. *Błędy w żywieniu jako przyczyna problemów zdrowotnych w wielkostadnej produkcji drobiu*. Vet Forum, V Kongres Praktyki Weterynaryjnej, 25-26.04.2015 r., Łódź, s. 153–155.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *Wybrane polietiologiczne stany patologiczne skóry u drobiu grzebiącego – przyczyny, występowanie i ich następstwa*. Vet Forum, V Kongres Praktyki Weterynaryjnej, 25-26.04.2015 r., Łódź, s. 169–172.
- Koncicki A., Tykałowski B., Śmiałek M., Stenzel T. *Wpływ żywienia i warunków chowu na odporność i stan zdrowotny indyków*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem aspektów zootechniczno-weterynaryjnych w chowie kur mięsnych i indyków. 25-26.06.2015 r., Wrocław, s. 44–53.

- Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Stenzel T., Furmanek D., Koncicki A. *Immunologiczne podstawy skuteczności protektotypowej strategii uodporniania kurcząt broilerów przeciwko IB*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem aspektów zootechniczno-weterynaryjnych w chowie kur mięsnych i indyków. 25-26.06.2015 r., Wrocław, s. 95–103.
- Koncicki A., Śmiałek M., Tykałowski B. *Aspekty kliniczne i epidemiologiczne kamylobakteriozy drobiu*. Szteyn J. (red.): Kamylobakteriozy – stan obecny i perspektywy zmian. 23.09.2015 r., Olsztyn, s. 45-50.
- Koncicki A., Koncicka-Świdarska K., Stenzel T., Śmiałek M., Tykałowski B., Welenc J. *Wprowadzenie do racjonalnej antybiotykoterapii chorób drobiu – czy teoria pokrywa się z praktyką*. Szeleszczuk P. (red.): Teoria i praktyka koncepcji „Jedno Zdrowie” w zrównoważonej produkcji drobiarskiej. II Międzynarodowa Konferencja Techniczna PROHEALTH, 17.06.2016 r., Jachranka, s. 75–85.
- Koncicki A., Stenzel T., Koncicka-Świdarska K., Tykałowski B., Śmiałek M., Welenc J. *Profile antybiotykoodporności bakterii izolowanych z materiału klinicznego badanego w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie*. Szeleszczuk P. (red.): Teoria i praktyka koncepcji „Jedno Zdrowie” w zrównoważonej produkcji drobiarskiej. II Międzynarodowa Konferencja Techniczna PROHEALTH, 17.06.2016 r., Jachranka, s. 134–140.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Welenc J., Stenzel T., Koncicki A. *Kształtowanie się odporności poszczepiennej przeciwko TRT u indyków o różnym statusie immunologicznym*. XV Kongres PTNW, 22-24.09.2016 r., Lublin, s. 490.
- Welenc J., Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Mechanizmy odporności lokalnej w układzie rozrodczym u indyczek*. XV Kongres PTNW, 22-24.09.2016 r., Lublin, s. 500.

- Śmiałek M., Kowalczyk J., Tykałowski B., Koncicki A. *Mechanizmy odporności poszczepiennej przeciwko TRT u indyków o różnym statusie immunologicznym*. I Symposium „Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność”. Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW), 11-13.06.2017 r., Wierzba, s. 47–48.
- Śmiałek M., Burchardt S., Kowalczyk J., Tykałowski B., Koncicki A. *Możliwość redukcji stopnia infekcji bakteriami zoonotycznymi u drobiu poprzez zastosowanie preparatów probiotycznych. Wyniki badań własnych z zastosowaniem preparatu Lavipan (JHJ, Polska)*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu - stare i nowe wyzwania istotne w produkcji drobiarskiej. 29-30.06.2017 r., Wrocław, s. 49–56.
- Stenzel T., Dziewulska D., Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Koncicki A. *Ocena prewalencji i seroprewalencji cirkowirusa gołębiego (PICV) u reprodukcyjnych gołębi pocztowych*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu - stare i nowe wyzwania istotne w produkcji drobiarskiej. 29-30.06.2017 r., Wrocław, s. 124–128.
- Dziewulska D., Stenzel T., Śmiałek M., Tykałowski B., Kowalczyk J., Koncicki A. *Ocena wpływu ekstraktu z aloesu i lukrecji na przebieg zakażenia PPMV-1 u gołębi*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu - stare i nowe wyzwania istotne w produkcji drobiarskiej. 29-30.06.2017 r., Wrocław, s. 129–132.
- Kowalczyk J., Śmiałek M., Dziewulska D., Stenzel T., Tykałowski B., Koncicki A. *Bakterie z rodzaju Klebsiella spp. w patologii drobiu*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu - stare i nowe wyzwania istotne w produkcji drobiarskiej. 29-30.06.2017 r., Wrocław, s. 141–143.
- Koncicki A., Stenzel T., Koncicka-Świdorska K., Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J. *Algorytmy diagnostyczno-terapeutyczne w przebiegu wybranych bakteryjnych chorób indyków*. Szeleszczuk P. (red.): III Międzynarodowa Konferencja Techniczna PROHEALTH. Zrównoważona produkcja drobiarska w erze poantybiotykowej – czyli praktyczne

alternatywy dla środków przeciwdrobnoustrojowych. 13-15.09.2017 r., Jachranka, s. 70–74.

- Stenzel T., Kaczorek E., Szczucińska E., Dziewulska D., Kowalczyk J., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A. *Algorytmy diagnostyczno-terapeutyczne w przebiegu bakteryjnych chorób gołębi*. Szeleszczuk P. (red.): III Międzynarodowa Konferencja Techniczna PROHEALTH. Zrównoważona produkcja drobiarska w erze poantybiotykowej – czyli praktyczne alternatywy dla środków przeciwdrobnoustrojowych. 13-15.09.2017 r., Jachranka, s. 160–164.
- Śmiałek M., Tykałowski B., Dziewulska D., Kowalczyk J., Stenzel T., Gesek M., Koncicki A. *TVP - aktualne dane na temat sytuacji epidemiologicznej w stadach broilerów kurzych*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem monitorowania zdrowia ptaków. 23-24.06.2018 r., Wrocław, s. 24–26.
- Dziewulska D., Stenzel T., Tykałowski B., Śmiałek M., Kowalczyk J., Koncicki A. *Ocena wpływu ekstraktu z aloesu i lukrecji na wybrane mechanizmy odporności humoralnej i komórkowej u gołębi zakażonych eksperymentalnie PPMV-1*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem monitorowania zdrowia ptaków. 23-24.06.2018 r., Wrocław, s. 132–137.
- Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Dziewulska D., Stenzel T., Koncicki A. *Wpływ okresu nieśności indyczek reprodukcyjnych na transfer przeciwciał matczynych na potomstwo*. Wieliczko A. (red.): Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem monitorowania zdrowia ptaków. 23-24.06.2018 r., Wrocław, s. 142–145.
- Śmiałek M., Kowalczyk J., Tykałowski B., Pestka D., Koncicki A. *Koncepcja odporności protektotypowej przeciwko zakażeniom wirusami zakaźnego zapalenia oskrzeli kur*. Domańska-Blicharz K. (red.): Zakaźne zapalenie oskrzeli kur - ogólnościowy problem w przemyśle drobiarskim. 28-29.09.2018 r., Puławy, s. 35–36.

- Dziewulska D., Stenzel T., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *Wpływ wybranych ekstraktów roślinnych na zakazanie PPMV-1 oraz na odporność komórkową u gołębi*. Szeleszczuk P. (red.): VII Zlot Kolumbopatologów Polskich. Opieka nad zdrowiem stad gołębi w UE – gdzie jesteśmy i gdzie chcielibyśmy być. 07-08.06.2018 r., Kraków, s. 108-109.
- Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. *Struktura układu immunologicznego jajowodu indyczek reprodukcyjnych w zależności od okresu nieśności*. Wieliczko A. (red.): 50. Jubileuszowa konferencja naukowa - Aktualne problemy w patologii drobiu. 28-30.06.2019 r., Polanica Zdrój, s. 153–154.
- Śmiałek M., Kowalczyk J., Tykałowski B., Dziewulska D., Koncicki A. *Wpływ przeciwciał matczynych na rozwój odporności poszczepiennej w stosunku do aMPV u indyków szczepionych przeciwko TRT*. XVI Kongres PTNW „Omnia Autem Animalia Sunt”. 26-27.11.2021 r., Warszawa s. 347. Referat wygłoszony on-line.
- Kowalczyk J., Śmiałek M., Tykałowski B., Koncicki A. *Wpływ wieku indyczek reprodukcyjnych na lokalne mechanizmy odpornościowe w jajowodzie*. XVI Kongres PTNW „Omnia Autem Animalia Sunt”. 26-27.11.2021 r., Warszawa s. 366. Referat wygłoszony on-line.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Kierownik projektów badawczych:

- W latach 2021-2022: Grant finansowany przez NCN w ramach konkursu Miniatura-5, pt. „Wpływ szczepień indyków przeciwko chorobie Mareka na wybrane wskaźniki odporności humoralnej i komórkowej” nr projektu 2021/05/X/NZ6/01304. Projekt w trakcie oceny końcowej.
- W latach 2015-2016: Grant finansowany przez KNOW (Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący) w ramach konkursu ESR1 (Early Stage Research) pt. „Badanie mechanizmów pamięci immunologicznej u

indyków zakażonych wirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV)” nr projektu UMO-KNOW2015/UWM/ESR1/01/1. Projekt zrealizowany.

- W latach 2008-2010 kierownik projektu w ramach stypendium doktoranckiego Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego „DrINNO- zwiększenie podaży technologicznej w województwie warmińsko-mazurskim poprzez stypendia dla doktorantów” finansowane przez samorząd województwa warmińsko-mazurskiego i współfinansowanych przez UE ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki”.
- W latach 2011-2012 kierownik projektu w ramach stypendium doktoranckiego Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego „DrINNO 2 – budowanie potencjału społecznego wysokiej klasy specjalistów w województwie warmińsko-mazurskim, finansowane przez samorząd województwa warmińsko-mazurskiego i współfinansowanych przez UE ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki”.

7.2. Wykonawca w projektach badawczych:

- W latach 2009-2011: Grant pt. „Wpływ methisoprinolu i β -glukanów na wybrane parametry odporności nieswoistej i wskaźniki biochemiczne krwi oraz na przebieg zakażenia adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV) u indyków”, nr projektu N N308 229636, MNISW. Projekt zrealizowany.
- W latach 2011-2014: Grant pt. „Znaczenie zwierząt wolno żyjących jako rezerwuaru bakteryjnych, wirusowych i pasożytniczych czynników chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt domowych” – projekt badawczy NR12 012610 - zadanie „Ptaki wolnożyjące jako rezerwuar i wektor Salmonella Typhimurium, Salmonella Enteritidis oraz Bordetella avium”; finansowanego przez NCBiR. Projekt zrealizowany.
- W latach 2011-2014: Grant pt. „Odporność swoista i nieswoista błon śluzowych górnych dróg oddechowych oraz wpływ odporności naturalnej biernej na rozwój rezystencji poszczepiennej u piskląt indyczych

uodpornianych przeciwko TRT” ; finansowanego przez NCN, nr projektu UMO-2011/01/N/NZ6/05757. Projekt zrealizowany.

- W latach 2014-2015: projekt badawczy pt. „Development of humoral and cell-mediated immunity in broiler chickens immunized against aMPV, NDV and IBV with the use of MSD Animal Health vaccines”, finansowanego przez MSD Animal Health. Projekt zrealizowany.
- W latach 2014-2017: Grant pt. “Innowacyjny biopreparat deodoryzujący dla drobiarskich pomieszczeń produkcyjnych. Wpływ związków odorowych na zdrowie zwierząt”; finansowanego przez NCBiR, nr projektu PBS2/B8/14/2014. Projekt zrealizowany.
- W latach 2014-2017: Grant pt. „Możliwości wykorzystania metioniny jako żywieniowego czynnika kształtującego potencjał antyoksydacyjny i stymulującego funkcje systemu immunologicznego indyków”; finansowanego przez NCN, nr projektu 2013/11/B/NZ9/02496. Projekt zrealizowany.
- W latach 2015-2018: Grant pt. “Ocena wpływu rekombinowanego białka kapsydu cirkowirusa gołębiego na kształtowanie się wybranych zjawisk odpornościowych u gołębi”; finansowanego przez NCN, nr projektu UMO-2014/15/D/NZ6/02416. Projekt zrealizowany.
- W latach 2017-2020: Grant pt. „Ocena efektywności programów profilaktyki swoistej zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy (TRT), w stadach indyków rzeźnych o różnym statusie immunologicznym, w kontekście rozwoju odporności przeciwwzakaźnej”; finansowanego przez NCN, nr projektu UMO-2016/23/D/MZ6/00099. Projekt zrealizowany.
- W latach 2018-2021: Grant pt. „Antyoksydacyjne i immunostymulujące oddziaływanie zróżnicowanych poziomów i wzajemnego stosunku lizyny, argininy i metioniny w mieszankach dla indyków rzeźnych”; finansowanego przez NCN, nr projektu UMO-2017/27/B/NZ9/01007. Projekt zrealizowany.
- W latach 2018-2021: Grant pt. „Opracowanie strategii wykorzystania alternatywnych źródeł białka owadów w żywieniu zwierząt umożliwiającej

rozwój jego produkcji na terytorium RP”; finansowanego przez NCBiR, nr projektu GOSPOSTRATEG1/385141/16/NCBR/2018. Projekt zrealizowany.

- W 2021 roku: Projekt badawczy pt. „Efektywność stosowania różnych preparatów z krwi w żywieniu kurcząt brojlerów” finansowanego przez podmiot gospodarczy, firmę Deveris Polska Sp. z o. o. Projekt zrealizowany.
- Od 2021 roku: Grant pt. „Czy gołębie cirkowirusy (PiCV) mogą ewoluować na drodze rekombinacji w systemie chowu typu ‘one loft race’?”; finansowanego przez NCN, nr projektu 2021/41/B/NZ6/00713. Projekt w trakcie realizacji. Planowany termin zakończenia grudzień 2023 r.
- Od 2021 roku: Grant pt. „Odpowiedź układu immunologicznego i systemu oksydoredukcyjnego indyków żywionych dietami z lub bez dodatku kocydiostatyku na wczesne podanie antybiotyków”; finansowanego przez NCN, nr projektu 2020/39/B/NZ9/00765. Projekt w trakcie realizacji. Planowany termin zakończenia 2025 rok.

7.3. Stypendia, nagrody i wyróżnienia:

- W 2008 roku - stypendium doktoranckie Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego „DrINNO- zwiększenie podaży technologicznej w województwie warmińsko-mazurskim poprzez stypendia dla doktorantów” finansowane przez samorząd województwa warmińsko-mazurskiego i współfinansowanych przez UE ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki”.
- W 2011 roku - stypendium doktoranckie Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego „DrINNO 2 – budowanie potencjału społecznego wysokiej klasy specjalistów w województwie warmińsko-mazurskim, finansowane przez samorząd województwa warmińsko-mazurskiego i współfinansowanych przez UE ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego „Kapitał Ludzki”.
- Nagroda Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych w 2008 roku za współautorstwo wybitnej monografii z zakresu nauk weterynaryjnych pt.

„Cardiovascular system diseases in turkeys” opublikowanej w Polish Journal of Veterinary Sciences, 2008, 11 (3), 245–250.

- Nagroda zespołowa II st. Rektora UWM w Olsztynie za osiągnięcia w dziedzinie naukowej w 2018 roku.
- Nagroda Rektora UWM w Olsztynie za wyróżniające artykuły naukowe opublikowane w 2019 roku.
- Nagroda indywidualna Rektora UWM w Olsztynie za wyróżniającą się publikację naukową wydaną w 2020 roku.
- Nagroda Rady Naukowej projektu Regionalna Inicjatywa Doskonałości dla wyróżniających zespołów badawczych za badania naukowe i prace rozwojowe w 2021 roku w dyscyplinie WETERYNARIA.
- Nagroda indywidualna Rektora UWM w Olsztynie za wyróżniające się publikacje naukowe wydane w 2021 roku.
- Nagroda za najlepsze wystąpienie plakatowe w Sesji Fizjologii i Patologii Ptaków pt. „Wpływ szczepienia indyków przeciwko krwotocznemu zapaleniu jelit na wybrane wskaźniki odporności humoralnej i komórkowej” podczas XVI kongresu PTNW 26-27 listopada 2021 r.
- Nagroda Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk w 2022 roku za osiągnięcie naukowe: „Antyoksydacyjne i immunostymulujące oddziaływanie zróżnicowanych poziomów i wzajemnego stosunku lizyny, argininy i metioniny w mieszankach dla indyków rzeźnych”, dla Zespołu badawczego w składzie: prof. dr hab. D. Mikulski, prof. dr hab. K. Ognik, dr hab. P. Konieczka, dr hab. M. Krauze, dr A. Stępniewska, dr E. Cholewińska, **dr B. Tykałowski**, prof. dr hab. Z. Zduńczyk, prof. dr hab. J. Juśkiewicz.
- Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za najlepszą pracę przeglądową opublikowaną w 2022 r. w Medycynie Weterynaryjnej pt. *“Immunomodulacja jako narzędzie ograniczające antybiotykoterapię w intensywnym chowie drobiu”*. Medycyna Weterynaryjna, 2022, 78 (8), 369-375.

- Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za współautorstwo pracy pt. „Wpływ metisoprinolu zastosowanego in ovo na odsetek subpopulacji limfocytów T CD3⁺, CD4⁺ i CD8⁺ u indyków” opublikowanej w *Medycyna Weterynaryjna*, 2008, 64 (12), 1157–1160.
- Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za współautorstwo pracy pt. „Local immunity of the respiratory mucosal system in chickens and turkeys” opublikowanej w *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2011, 14 (2), 291–297.
- Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za współautorstwo pracy pt. „The effect of different doses of methisoprinol on the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes subpopulations and the antibody titers in pigeons immunised against PPMV-1” opublikowanej w *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2011, 14 (3), 367–371.

7.4. Specjalizacje, szkolenia, kursy, certyfikaty:

- Specjalista Chorób Drobiu i Ptaków Ozdobnych (2017 rok, WCKP PIW-PIB w Puławach)
- Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich wykonywanie oraz dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach nr certyfikatu: 1530/2015, Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych PolLASA
- Certyfikat znajomości języka rosyjskiego nr 014248 od 2007 roku
- Szkolenie z obsługi cytometru FACSCantio II (UWM 2009 rok)
- Szkolenie z obsługi zintegrowanego systemu do analizy płytek ELISPOT (2010 rok)
- Certyfikat ukończenia kursu obsługi sortera komórek FACSAria II (Belgia, 2010 rok)
- Certyfikat ukończenia szkolenia z obsługi skanera Immunospot S6 Ultimate do analizy płytek metodą ELISPOT i FluoroSPOT (2022 rok)
- Ukończenie kursu pt. „Molekularne metody badań w mikrobiologii i wirusologii” (Łódź, 2009 rok)

7.5. Krótkoterminowe zagraniczne staże naukowo-szkoleniowe:

- 07-10.11.2011 r. Laboratoria i farmy indyków prarodzicielskich firmy Hybrid (Hendrix Genetics Company), Kitchener, Ontario, Kanada oraz

farmy indyków rzeźnych Ohio, USA; szkolenie z metod genetycznego doskonalenia indyków oraz zarządzania nowoczesną fermą drobiu

- 11-18.09.2015 r. Republika Południowej Afryki, warsztaty naukowo-szkoleniowe w ośrodkach rehabilitacji ptaków wolnożyjących z zakresu zapobiegania i zwalczania chorób zakaźnych
- 12-15.09.2016 r. Laboratoria R&D firmy Hipra, Amer, Hiszpania; szkolenie z metod produkcji szczepionek oraz oceny odporności poszczepiennej

7.6. Staże naukowo-szkoleniowe krajowe:

- 02.08-03.09.2021 r. Katedra Biochemii i Toksykologii Wydziału Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki UP w Lublinie; staż naukowy z zakresu metod oznaczania wskaźników zmian oksydacyjnych i epigenetycznych we krwi i narządach kurcząt i indyków. Wspólne opracowywanie metody oznaczania przeciwciał matczynych w woreczkach żółtkowych u piskląt indyckich
- 01.08-02.09.2022 r. Katedra Biochemii i Toksykologii Wydziału Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki UP w Lublinie; staż naukowy z zakresu zastosowania metody immunoenzymatycznej do oznaczania wybranych wskaźników immunologicznych we krwi u indyków rzeźnych
- 23.01-22.02.2023 r. Laboratorium SLW BIOLAB w Ostródzie; staż naukowo-szkoleniowy z zakresu zastosowania metod serologicznych i molekularnych w diagnostyce chorób zakaźnych drobiu

7.7. Współpraca międzynarodowa z firmami farmaceutycznymi i producentami drobiu:

- MSD Animal Health - badania szczepionek przeciwko aMPV, ND, IB stosowanych w różnych konfiguracjach u piskląt 1-dniowych
- Boehringer Ingelheim - badanie bezpieczeństwa szczepionek Dindoral SPF i Prevexxion RN
- Hendrix Genetics Company - badania odpowiedzi immunologicznej przeciwko TRT u indyków MDA- wylężonych z jaj importowanych z Kanady

- CEVA Sante Animale - badania bezpieczeństwa szczepionki Vectormune ND u indyków

7.8. Współpraca krajowa:

7.8.1. Uczelnie, Instytuty, Szpitale:

- Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Biochemii i Toksykologii Wydziału Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
- Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
- Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Zakład Dermatologii Doświadczalnej i Kosmetologii
- PIW-PIB w Puławach, Zakład Chorób Drobiu
- Instytut Zootechniki w Balicach, Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
- Wojewódzki Specjalistyczny Szpital Dziecięcy w Olsztynie, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Pracownia Cytometrii Przepływowej
- Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Olsztynie, Laboratorium Badań nad Komórkami Macierzystymi w Centrum Medycyny Eksperymentalnej im. Emila Behringa

7.8.2. Firmy:

- Grelavi S.A. Kętrzyn - badania układu immunologicznego prowadzone na indykach reprodukcyjnych i rzeźnych, badania mikrobiologiczne w zakładzie wylęgowym i na fermach reprodukcyjnych indyków
- JHJ Sp. z o.o. Nowa Wieś - badania preparatów Diarosan i Lavipan
- AdiFeed z o.o. Warszawa- badania preparatów AdiSalmoSOL PF i AdiCoxSOL PF

- DeVeris Warszawa - badania preparatów z krwi w żywieniu kurcząt brojlerów
- Proteon Pharmaceuticals – badania preparatów BAFACOL w terapii kolibakteriozy i BAFASAL w terapii zakażeń S. Enteritidis i S. Typhimurium u drobiu
- Agrocentrum Sp. z o.o. Kolno – badania pasz dla drobiu, obsługa weterynaryjna ferm drobiu
- Wipasz S.A. Mława – badania poubojowe kurcząt doświadczalnych, badania pasz dla drobiu, obsługa weterynaryjna ferm drobiu

6.1. Parametry naukowe dorobku:

- Łączna liczba punktów ministerialnych MNiSW/MNiE opublikowanych artykułów: **3183 pkt**
- Łączny IF: **77,978**

Źródło	Całkowita liczba cytowań	Liczba cytowań bez autocytowań	Indeks Hirsch'a
Web of Science (Core Collection)	382	291	10
Scopus	422	327	11
Google Scholar	454	-	12

Dane w powyższym zakresie zostały podane zgodnie z raportem bibliometrycznym przygotowanym przez Oddział Informacji Naukowej Biblioteki Uniwersyteckiej UWM w Olsztynie 27.06.2023 r. oraz z ogólnodostępnych baz danych.

Bartłomiej Tykałowski
 (podpis wnioskodawcy)