

Warszawa, 2016.11.07

Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk  
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej  
Zakład Chorób Ptaków  
Wydz. Medycyny Weterynaryjnej  
02-786 Warszawa  
ul. Ciszewskiego 8

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej

**mgr Anny Pikuły pod tytułem**

### **„ZASTOSOWANIE METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ DO WYKRYWANIA I CHARAKTERYSTYKI SZCZEPÓW WIRUSA ZAKAŹNEGO ZAPALENIA TORBY FABRYCJUSZA”**

Oceny dokonano na zlecenie Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zgodnie z jej uchwałą z dnia 30 11 2011 roku, na podstawie materiałów przekazanych przez Pana prof. dr hab. Dariusza Bednarka przewodniczącego Komisji Doktorskiej.

#### **Wstęp**

Generalna, bardzo pozytywna uwaga, jaka nasuwa się po lekturze recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr Anny Pikuły jest taka iż, potwierdza ona, to co powiedział przed laty francuski geniusz Ludwik Pasteur „*Odkrycia naukowe otwierają nowe niezbadane horyzonty, rodząc potrzebę dalszych badań*”!

O jakości tej rozprawy świadczyć bowiem może fakt, że wskazuje ona, jak wiele jeszcze jest do zbadania w starym temacie, jakim wydaje się być znane od blisko 60 lat zakaźne zapalenie bursy Fabrycjusza!

Osobiście wybór tego tematu uważam, za bardzo cenny i niezwykle potrzebny zwłaszcza w aspekcie aktualnej sytuacji epidemiologicznej w kraju. Niewątpliwie podjęcie tak szeroko zakrojonych badań w tym zakresie było możliwe dzięki wieloletnim pracom realizowanym od końca lat siedemdziesiątych przez Zakład Chorób Drobiu, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego i izolacji słynnego szczepu 78/GSI (*Minta Z., Karczewski W., Roszkowski J.: Badania nad krajowym szczepem wirusa*

choroby Gumboro. *Medycyna Wet.* 38, 34, 1982), który jest pierwszym na liście izolatów wirusa charakteryzowanych przez Doktorantkę.

Z ogólnobiologicznego punktu widzenia należy podkreślić, że IBD jest pierwszą opisaną w weterynarii chorobą immunosupresyjną. Wirus zakaźnego zapalenia bursy (torby) Fabrycjusza (choroby Gumboro, Infectious Bursal Disease – IBD) należy do rodziny *Birnaviridae*, rodzaju *Avibirnavirus*, a jego genom złożony jest z dwóch segmentów dwuniciowego RNA. W porównaniu z innymi patogennymi dla drobiu zarazkami, jest to wirus stosunkowo stabilny, występują bowiem tylko dwa serotypy IBDV, choć w obrębie serotypu 1 mamy szczepy klasyczne i szczepy wariantowe.

Bez wątplenia choroba Gumboro jest jednym z problemów zdrowotnych bez próby opanowania, którego intensywna produkcja drobiarska nie mogłaby się rozwijać, stąd ważność podjętych przez Panią Magister badań.

### **Ocena pracy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny praca doktorska „Zastosowanie metod biologii molekularnej do wykrywania i charakterystyki szczepów wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza” została wykonana w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem prof. dr hab. Zenona Minty. Odnotować należy, że o wysoki poziom merytoryczny rozprawy dbał także dr hab. Krzysztof Śmietanka, prof. nadzw. PIWet – promotor pomocniczy.

Dysertacja posiada układ typowy dla opracowań na stopień naukowy i zawarta jest na 142 stronach uwzględniających 22 tabele, 38 rycin (w tym 13 kolorowych fotografii klinicznych) oraz podzielona jest na następujące rozdziały: wstęp, cel, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, streszczenie, summary oraz piśmiennictwo.

Szata edytorska ocenianej rozprawy jest staranna i estetyczna, zawiera ona dobrej jakości oryginalne fotografie zarówno makro jak i mikroskopowe. Ogólne wrażenie z lektury dysertacji jest bardzo pozytywne i można z pełnym przekonaniem stwierdzić, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Anny Pikuły napisana jest poprawnym językiem, spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane opracowaniom na stopień naukowy doktora. Bardzo bogate i prawidłowo używane w tekście opracowania nazewnictwo fachowe świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Dotyczy to szczególnie części poświęconej badaniom molekularnym i analizie uzyskanych wyników. Na korzyść Doktorantki przemawia i to, że stara się przybliżyć zrozumienie wykonywanych badań opisując krótko i przystępnie zasady stosowanych metodyk. Oczywiście w tak obszernym i obejmującym wiele bardzo specjalistycznych obszarów opracowaniu trudno nie popełnić drobnych nieścisłości i pewnych

niezręczności językowych, które zaznaczono w tekście. Jako przykład można podać użycie przymiotnika „najlepszego” do opisu rozwoju bursy Fabrycjusza (str. 84; 6 wiersz od góry) czy użycie określenia „ w hodowli” zamiast „w chowie”(str.8, 15 wiersz od dołu strony) lub „rasy kurcząt brojlerów” (str.97, 14 wiersz od góry). Zdanie „Podobne obserwacje uzyskali Chui i Thorsen” (str.10, 7 wiersz od pierwszego akapitu) lepiej brzmi w wersji „podobne obserwacje poczynili Chui i Thorsen”. Ponadto bardzo nieliczne literówki zaznaczono w tekście pracy.

Cytowane w pracy doktorskiej, wydawałoby się bardzo obszerne, piśmiennictwo zamykające się liczbą 225 publikacji jest w istocie wyborem bardzo starannie wyselekcjonowanych pozycji literaturowych poświęconych chorobie Gumboro. Dobór piśmiennictwa wskazuje na pełną dojrzałość naukową i umiejętność wyboru bardzo bogatej w tym zakresie literatury źródłowej. Podkreślić należy, że Autorka równie starannie wyselekcjonowała pozycje piśmiennictwa krajowego wybierając 18 najbardziej reprezentatywnych prac. Ze względów emocjonalnych pozwolę sobie przypomnieć o jeszcze dwóch pracach, które nie zostały uwzględnione przez Panią Magister bowiem powstały w czasach przed elektroniczną rejestracją dorobku naukowego i nie są łatwo dostępne w obiegu bibliotecznym, a zasługują na wyróżnienie, bowiem potwierdziły wzrost epidemiologicznego znaczenia choroby Gumboro w kraju, co było bezpośrednim powodem podjęcia badań nad tą jednostką chorobową przez Zakład Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (Borzemska W.B. (red.) Historia awiopatologii Polskiej w latach 1942 – 2001, Wyd. SGGW, 2001). Są to prace doktorskie Pani dr Krystyny Lisowskiej „Badania nad występowaniem choroby Gumboro u kur w Wielkopolsce” oraz Pani dr Zofii Radoń „Przebieg choroby Gumboro w zależności od występowania przeciwciał matczynych”. Obie rozprawy obroniono w roku 1980, a promotorem był Pan Profesor Zenon Wachnik współtwórca polskiej patologii drobiu.

Wydaje się, że praktyczniej byłoby wyłączyć z zestawu cytowanego piśmiennictwa akty prawne (pozycje: 42,43,77,150,151). Autorka podaje, że „**choroba IBD** (poprawnie winno być choroba Gumboro lub IBD – Infectious Bursal Disease = zakaźna **choroba** bursy) *znajduje się również na liście chorób OIE (2016 a)*”, (str. 7, wiersz kończący punkt 1.1.) zaś w bibliografii jest ta pozycja opisana, pod numerem 150 jako „OIEa”. Podanie numeru w tekście ułatwiłoby odszukanie tego cytatu. Z obowiązku recenzenta omawiając listę publikacji odnotuję jedynie, że zespołem autorów pierwszego w Polsce opisu klinicznego przypadku IBD u 18 tyg. kur kierowała Pani Profesor Wanda Barbara Borzemska (nie Borzemaska!). Poprawienia wymaga również cytowanie rozdziału z podręcznika „Choroby drobiu” pod redakcją Profesora Michała Mazurkiewicza (pozycja 103 w zestawieniu), winno mieć ono formę przyjętą dla cytowań

rozdziałów w monografiach. Oczywiście pomyłką wydaje się być z kolei znajdująca się w pozycji 205 piśmiennictwa praca Prof. Thierrego van den Berga.

Opiniowaną pracę rozpoczyna obszerny wstęp, obejmujący 21 stron, wprowadzający czytelnika w zagadnienia związane z chorobą Gumboro. Doktorantka w 21 podrozdziałach omawia w syntetycznej formie całość problematyki poczynając od historii choroby poprzez jej epidemiologię i zwalczanie. Czytelnikowi niezajmującemu się na co dzień wirusologią w kilku podrozdziałach przypomina budowę czynnika etiologicznego choroby Gumboro. Dla zrozumienia wykonanych przez Doktorantkę badań szczególnie przydatne są podrozdziały 1.8. (genom wirusa IBD) oraz 1.9. (białka wirusa IBD). Bardzo dobrze napisany jest także podrozdział 1.11. – zmienność genetyczna IBDV i 1.12. – molekularne podstawy zjadliwości IBDV. Jako patolog dość dobrze oceniam napisany przez Panią Magister lapidarny fragment wstępu poświęcony obrazowi klinicznemu i zmianom sekcyjnym w przebiegu choroby Gumboro. Część ogólną wstępu kończy podrozdział 1.20 sumujący wiedzę Doktorantki o diagnostyce IBDV i podrozdział 1.21 o zapobieganiu chorobie Gumboro, który jednak nie opisuje wystarczająco stopnia złożoności immunoprofilaktyki tej jednostki. Trudno nie zgodzić się ze stanowiskiem zawartym w tej części opracowania, że nie istnieją obecnie terapeutyki i szczepionki, które pozwalałyby kontrolować w pełni tę chorobę. Jest to oczywiście największy problem i wyzwanie, jakie stoi przed patologami drobiu, które to wyzwanie, mimo wielu prób i badań nie zostało pomyślnie rozwiązane.

W mojej ocenie wstęp jest zwięzły i poprawnie skomponowaną częścią pracy, dobrze wprowadzającą czytającego w całość zagadnień będących przedmiotem badań.

Cel badań (rozdział 2) jest krótko i jasno sprecyzowany. Autorka stwierdza, że celem Jej pracy jest: *„opracowanie i optymalizacja metody RT-PCR oraz real time RT-PCR do wykrywania materiału genetycznego IBDV, charakterystyka zmienności genetycznej krajowych szczepów wirusa zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza wyizolowanych z przypadków terenowych na przestrzeni ostatnich 35 lat i określenie zjadliwości in vivo potencjalnych rekombinantów wirusa IBD”*.

Rozdział 3 dysertacji opisuje z kolei materiał i metody zastosowane przez Doktorantkę. Jak wspomniano we wstępie kolekcjonowanie materiału będącego przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej rozpoczął Pan Profesor Minta w roku 1978. Bardzo ciekawa jest tabela 2 podająca charakterystykę szczepów użytych w badaniach. Było ich łącznie 52. Doktorantka nie analizowała szczegółowo danych zawartych w tym zestawieniu, ale moim zdaniem oddaje ono bardzo dobrze sytuację epidemiologiczną IBD w ciągu 37 lat gromadzenia prób. Jest to dla recenzenta żywa historia, w której współuczestniczył, bowiem znam dobrze

historię kliniczną niektórych z tych stad. W mojej ocenie jest związek między liczbą izolatów zbadanych w danym roku, a sytuacją epidemiologiczną w tym czasie. Na marginesie należy podkreślić, że wykonywanie badań z materiału pobieranego z ferm produkcyjnych jest zawsze wielkim wyzwaniem logistycznym i dużym utrudnieniem metodologicznym dla prowadzących doświadczenia, stąd trudno zwłaszcza zebrać dane produkcyjne i informacje o przebiegu infekcji, choć byłby to niezwykle ciekawy materiał wskazujący na kształtowanie się dynamiki enzootii na przestrzeni lat, który jak wskazują to dane zgromadzone w omawianej tabeli ulegał zmianie. Jakie trudności napotyka się przy gromadzeniu danych o materiale może świadczyć fakt, że w przypadku ponad 11,5 % badanych szczepów nie było możliwe ustalenia miejsca z którego one pochodziły!

Opis metod zastosowanych przy realizacji pracy doktorskiej rozpoczyna zwięzła informacja na temat sekwencji szczepów IBDV wykorzystanych w badaniach filogenetycznych (Tab.3.) oraz technik wirusologicznych stosowanych w celu izolacji zarodka z opisem zarodków i kurcząt SPF stosowanych w tym celu. Badanie zjadliwości rekombinantów IBDV w warunkach *in vivo* przeprowadzono na 5 tyg. kurczętach SPF odnotowując w czasie 10 dniowej obserwacji wpływ zakażenia na klinikę, kształtowanie się indeksu B/BW, zmiany sekcyjne i mikroskopowe (do oceny zmian histopatologicznych zastosowano 5 stopniową skalę). Na przeprowadzenie tych bardzo ciekawych badań Autorka uzyskała zgodę lokalnej komisji etycznej.

Dalej Doktorantka podaje bardzo szczegółowy opis wykonywanych badań molekularnych. Podanie opisu metod badań genetycznych w formie tabel ułatwia zapoznanie się ze szczegółami prowadzonych reakcji. Najbardziej nowatorskim elementem warsztatowym opiniowanej pracy doktorskiej jest zaproponowanie do analizy molekularnej IBDV w metodzie konwencjonalnej RT-PCR własnych starterów amplifikujących fragment genu białka kapsydu (VP2) przy projektowaniu, których skorzystano z sekwencji kilkunastu izolatów wirusa dostępnych w bazie GenBank. Z uznaniem należy podkreślić dużą troskę Autorki o poprawność metodologiczną użytych metod, były one nie tylko optymalizowane, ale i walidowane w celu określenia ich czułości i specyficzności. Produkty PCR uzyskane po amplifikacji genów białka VP1 i VP2, a także sekwencji kodującej segmentu A zostały przesłane do sekwencjonowania do uznanej firmy Genomed w Warszawie. Dla pełnej analizy uzyskane sekwencje przepisywano na sekwencje aminokwasowe, które również porównywano między badanymi izolatami oraz szczepami referencyjnymi.

Rozdział „Materiał i metody” kończy opis metod statystycznych zastosowanych do analizy wyników. Magister Pikuła wykazała się dużą wiedzą z tego bardzo specjalistycznego

zakresu wykorzystując między innymi profesjonalny program RDP4 v.4.56 oraz dla oceny wskaźnika rozwoju narządów (B/BW) test Mana-Whitneya. Znajomość tych testów jest wymagana przy analizie uzyskanych wyników.

Rozdział „Wyniki” jest najobszerniejszym fragmentem ocenianej pracy (38 stron) i bardzo zróżnicowanym pod względem formy, ale doskonale prezentującym dokonania Doktorantki. Zgrupowanie wyników w siedmiu podrozdziałach ułatwia śledzenie uzyskanych danych. Pierwsze trzy podrozdziały przedstawiają informacje o izolacji szczepów IBDV i dane o czułości analitycznej i specyficzności metod real time RT-PCR i konwencjonalnej RT-PCR. Podrozdział 4 opisuje z kolei najważniejszą i najbardziej pracowitą część dysertacji analizę filogenetyczną genu białka VP2, VP1, oraz identyfikację rekombinantów i ustalenie sekwencji kodującej segment A genomu IBDV.

Jest oryginalnym osiągnięciem Pani mgr Pikuły sporządzenie drzew filogenetycznych 52 szczepów wirusa IBD wyosobnionych w kraju z przypadków klinicznych choroby Gumboro. Doktorantka zgromadziła olbrzymią ilość oryginalnych informacji, rzucających zupełnie nowe światło na epidemiologię choroby Gumboro w kraju. Nie jest zaskoczeniem, że wszystkie analizowane szczepy należały do serotypu 1. Większość z nich (ponad 90 %) należała do grupy szczepów wysoce zjadliwych (vvIBDV). Pozostałe 5 polskich szczepów wykazywało filogenetycznie pokrewieństwo do grupy szczepów klasycznych zjadliwych (cIBDV). Grupę polskich szczepów tzw. „wczesnych” w panelu zbadanym przez Panią Magister, tworzą trzy szczepy pochodzące z lat 1978- 1980 (VP2.7) i dwa izolaty z roku 2014 i 2015 (VP2.8). Oryginalność krajowych szczepów „wczesnych” została wykazana wcześniej przez Domańską-Blicharz i wsp. (2004) . Badania Zespołu Profesora Minty rzuciły nowe światło na wczesny okres epidemiologii choroby Gumboro w Europie. Polskie badania potwierdziły, że we wczesnym okresie krążyła linia genetyczna wirusów IBD o unikalnych i odmiennych cechach w stosunku do grupy „Faragher 52/70-like”. Pod względem epidemiologicznym, jak wynika z publikacji Borzemskiej i Golnika (1969) i Mazurkiewicza i Wachnika (1970) podających pierwsze opisy choroby Gumboro w kraju można mówić o dużym rozprzestrzenieniu się choroby już w roku 1969. Opisywana klinika odpowiadała przebiegowi klinicznemu charakterystycznemu dla postaci klasycznej z bardzo dużym uszkodzeniem bursy Fabrycjusza i upadkami od 3,5 – do 6 % (Mazurkiewicz ) i do 15 % (Borzemska). Kierunek z jakiego mogła pojawić się choroba w kraju? Można spekulować, że transmisja odbyła się za pośrednictwem materiału hodowlanego sprowadzanego w tym czasie z Holandii, Republiki Federalnej Niemiec i Francji. Przez Europę przetaczała się w tym czasie epizootia tej choroby. Pierwsze przypadki IBD na starym kontynencie stwierdzono bowiem w 1962 r. w Wielkiej

Brytanii, następnie w roku 1964 w Belgii. Rok później Landgraf i wsp. [1965] opisali ją w Niemczech, a Rinaldi i wsp. we Włoszech. W tym samym okresie choroba pojawiła się w Szwajcarii, a w 1967 r. została opisana przez Riggenbacha. Jak słusznie stwierdza Doktorantka w owym czasie (druga połowa lat siedemdziesiątych) dynamicznie rozwijająca się intensywna produkcja drobiarska ponosiła duże straty w powodu tej choroby. Przykładem jak poważne były to straty może być publikacja dr Kubaloka z 1980 roku opisująca endemiczne ognisko IBD i pierwsze w kraju próby immunoprofilaktyki tej choroby (Kubalok R., Larski Z., Karczewski W.: *Medycyna Wet.* 36, 133, 1980).

Izolowane w Polsce szczepy vvIBDV są bardzo zróżnicowane pod względem sekwencji nukleotydowej badanego genu białka VP2 formują w drzewie filogenetycznym 6 odrębnych podgrup (VP2.1. – VP.6). Jest ciekawe, że podobieństwo genetyczne tych szczepów obejmowało izolaty pochodzące z Holandii, Francji, Wielkiej Brytanii i Izraela. Z kolei analiza filogenetyczna w oparciu o sekwencję aminokwasową wykazała, że polskie szczepy klasyczne wykazywały dużo większą liczbę zmian aminokwasowych w obrębie białka VP2 w porównaniu z klasycznym szczepem referencyjnym Faraghera 52/70. Za cenne w pracy doktorskiej Pani mgr Anny Pikuły można także uznać analizę sekwencji kodującej białka wirusowej polimerazy (VP1) zawartej na segmencie B genomu zarazka. Badania tego genu są bowiem stosunkowo rzadko wykonywane. Autorka stwierdziła, że krajowe szczepy klasyczne IBDV należą do dwóch odrębnych podgrup F i G. Tak zwane „wczesne” izolaty (78/GSi; 78GSz; 80GA) największą homologię wykazują względem szczepu Edgar i szczepu 9190. Pozostałe izolaty cIBDV z 2014 i 2015 roku tworzą razem ze szczepami szczepionkowymi 228E, D78 i S706 podgrupę G. W tym miejscu pracy pojawia się informacja o unikatowych właściwościach izolatu Bug-pop/03 który okazał się naturalnym reasortantem, gdzie segment A pochodził od szczepów wysoce zjadliwych, a segment B od klasycznych szczepów zjadliwych. Zgromadzone dane o sekwencji nukleotydów kodujących białko VP2 i VP1 zostały bowiem poddane analizie w celu identyfikacji rekombinantów. Wśród badanych izolatów dwa szczepy (75/01.K4; 177/03) okazały się efektem rekombinacji między szczepem zjadliwym szczepem klasycznym, a szczepem vvIBDV. Posiadały one fragment długości ponad 400 nt pochodzący od szczepu Cu-1 (cIBDV) w obrębie genu białka VP1. Przy zastosowaniu programu RDP4 udało się potwierdzić istnienie dwóch szczepów vvIBDV charakteryzujących się zmienioną sekwencją w obrębie segmentu B (izolaty Bug/03 i 117/14). Ponieważ w piśmiennictwie nie znaleziono danych na temat zjadliwości rekombinantów w warunkach *in vivo* Doktorantka poprzez zakażenie eksperymentalne udowodniła, że wszystkie one zachowały zjadliwość, choć niższą i zróżnicowaną (śmiertelność od 20 do 60 %) i powodowały bardzo silne uszkodzenie

bursy Fabrycjusza. W odniesieniu do polskiego reasortanta badania nie wykazały spadku zjadliwości dla kurcząt SPF (80 % śmiertelności). Uzupełnieniem opisu wyników uzyskanych po zakażeniu są liczne, dobrej jakości, fotografie zmian w mięśniach, bursie, śledzionie, nerkach i przedzwołdaku. Z obowiązku recenzenta sugeruję zmianę żargonowych określeń w podpisach pod te fotografie: „Ryc. 28. A. Wybroczyny mięśnia piersiowego” na „Ryc. 28. A. Wybroczyny i wylewy w mięśniach piersiowych” oraz „28.B. Wybroczyny w mięśniu udowym” na „28.B. wybroczyny w mięśniach kończyny miednicznej”.

Rozdział piąty „Omówienie wyników i dyskusja” to próba oceny własnych badań Autorki na tle literatury światowej. Cytując dane piśmiennictwa Autorka stara się odnieść uzyskane wyniki badań własnych do rezultatów innych autorów. Pierwsze trzy strony, przypominają (powtarzają za wstępem) informacje o chorobie, jej historii i metodach diagnostyki. Pod koniec tej części rozdziału piątego Autorka formułuje główne przesłanie metodologiczne dysertacji: „*sekwencjonowanie produktów PCR i porównywanie ich z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank wydaje się być najlepszym narzędziem do identyfikacji patotypu wirusa IBD*”, co w pełni tłumaczy zastosowanie użytych w pracy metod wykrywania genomu IBDV. Szczególnie cenna jest opracowana przez Autorkę metoda RT-PCR charakteryzującą się wysoką czułością analityczną na poziomie 25 EID 50/1ml, a jej niekwestionowaną zaletą jest to, że zaprojektowane startery są specyficzne dla obu serotypów IBDV, dzięki czemu metoda jest uniwersalnym narzędziem diagnostycznym. Szkoda jednak, że Pani Magister nie potwierdziła przydatności opracowanego protokołu w odniesieniu do izolatów serotypu 2. Wirusy IBD należące do tego serotypu nie są patogenne dla kur i indyków i brak jest danych potwierdzających ich obecność w naszym kraju, ale być może, że nikt jeszcze nie podjął się takich badań.

Dzięki zastosowanej metodzie badawczej było możliwe zrealizowanie najważniejszego celu pracy doktorskiej, opracowanie sekwencji aminokwasowej białka VP2 i VP1 oraz poliproteiny (pVP1-VP4-VP3) 52 dwóch krajowych izolatów wirusa zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza, jest to kolejne duże osiągnięcie Autorki. Trudno jest Doktorantce odnieść uzyskane przez siebie wyniki do badań innych autorów bowiem, jak dotąd w kraju nie wykonywano na tak szeroką skalę charakterystyki molekularnej wirusów IBD.

W pełni podzielam opinię Pani mgr Pikuły, iż ważnym wnioskiem wypływającym z wykonanych przez Nią badań jest wskazanie negatywnych implikacji związanych ze stosowaniem w produkcji drobiarskiej na szeroką skalę szczepionek żywych, jak również krążenia szczepów o naturalnie niskiej patogenności, u których w wyniku presji selekcyjnej mogą pojawiać się zmiany, które mogą w konsekwencji prowadzić do wzrostu wirulencji



szczepów szczepionkowych. Z typową ostrożnością naukowca Autorka rozprawy nie precyzuje ostro problemu, bowiem tej hipotezy w odniesieniu do IBDV rzeczywiście nikt jeszcze naukowo nie potwierdził, ale opis izolatu Bug.pop./03 jednoznacznie wskazuje, że jest to pierwszy w Europie reasortant z segmentem B o homologii sięgającej 99,7% z powszechnie stosowanymi w Polsce szczepami szczepionkowi D78 i S 706. Jak udowodniła Pani Magister w badaniach na żywych ptakach, szczep ten charakteryzował się wysoką patogennością.

Rozdział „Wnioski” – ten bardzo istotny element pracy doktorskiej, jest bardzo często krytykowany przez recenzentów, choć w przypadku wniosków wyciągniętych przez Panią mgr Pikuleń trzeba wyraźnie stwierdzić, że są one klasycznie akademickie i bardzo poprawne! Uzyskane wyniki badań oraz ich analiza upoważniły Autorkę do wyciągnięcia, trzech wniosków ściśle powiązanych z celami jakie doktorantka postawiła sobie do rozwiązania rozpoczynając badania.

Wniosek pierwszy informuje czytelnika, że *„zaadaptowana metoda RT-PCR w czasie rzeczywistym stanowi szybkie i czułe narzędzie do wykrywania genomu IBDV oraz, że własna metoda RT-PCR, która w połączeniu z sekwencjonowaniem pozwala na identyfikację patotypu wirusa i stanowi instrument służący do różnicowania zidentyfikowanego szczepu IBDV”*. Wniosek ten opisuje bardzo ważne osiągnięcie Doktorantki zaprojektowanie bardzo efektywnej pary starterów amplifikujących fragment genu białka kapsydu (VP2) wielkości 735 pz oraz w sposób bardzo poprawny metodycznie zoptymalizowała opracowaną metodę dokonując jej walidacji.

Wniosek drugi, który składa się z sześciu podpunktów jest odpowiedzią na oczekiwania sformułowane w celu pracy mającym przedstawić pierwszą i jak dotychczas jedyną tak pogłębioną charakterystykę zmienności genetycznej krajowych szczepów wirusa zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza wyizolowanych z przypadków terenowych na przestrzeni ostatnich 35 lat. Wnioski wysnute przez Doktorantkę są odbiciem skomplikowanej historii trwającej do dzisiejszego dnia blisko 50 letniej klinicznej obecności choroby Gumboro w kraju. Pod względem klinicznym przebiegu infekcji nasilenia i charakteru zmian anatomopatologicznych strat i efektywność immunoprofilaktyki były niezwykle dynamiczne i różnorodne. Badania przedstawione przez Doktorantkę potwierdzają, że filogenetycznie krajowe szczepy wirusa choroby Gumboro cechują się dużą zmiennością genetyczną czego miernikiem jest ich przynależność do różnych podgrup. Za najciekawsze pod względem naukowym należy uznać opisane w punkcie F drugiego wniosku, pierwsze w Europie potwierdzenie obecności reasortanta IBDV z elementami genomu pochodzącymi od wirusów szczepionkowych (segment B) i wysoce zjadliwych (segment B) co potwierdza możliwość

powstania w warunkach terenowych „chimer” wirusowych o potencjalnie nowych właściwościach biologicznych. Pod sformułowaniem nowe właściwości biologiczne należy roznieć bardzo praktyczne pytanie, jak zachowują się nowe reasortanty w warunkach terenowych – czy będą patogenne, czy dostępne będą skuteczne metody immunoprofilaktyki? Jest niekwestionowaną wartością pracy doktorskiej Pani mgr Pikuły, że próbowała odpowiedzieć na to pytanie w serii bardzo pracochłonnych i warsztatowo trudnych doświadczeń *in vivo*. Wniosek podsumowujący badania w tym zakresie (wniosek trzeci) stwierdza, że pomimo pochodzenia segmentów genomu od szczepów o różnym patotypie polski reasortant IBDV nie stracił swojej patogenności. Istotne jest również stwierdzenie, że szczepy atypowe vvIBDV mimo ich mniejszej zjadliwości dla kurcząt SPF w porównaniu do szczepu wysoce zjadliwego wywołują objawy choroby w stadach szczepionych przeciwko chorobie Gumboro. Mimo zdobycia olbrzymiej wiedzy o budowie genetycznej krajowych izolatów IBDV Doktorantka w ostatnim zdaniu dysertacji stwierdza, że „badania *in vivo* potwierdzają złożoność mechanizmu warunkującego zjadliwość IBDV i skłaniają do dalszego badania nad skutecznością rutynowych programów immunoprofilaktyki choroby Gumboro wobec zakażeń wirusami IBD o nietypowej konfiguracji genetycznej”.

Mam nadzieję, że w czasie publicznej obrony pracy uzyskam od Doktorantki odpowiedź (opartą o zdobytą w ciągu wielu lat badań wiedzę) na pytanie o Jej zdaniem najbardziej właściwy dobór szczepionek teoretycznie genetycznie najbardziej zbliżonych do krążących w kraju patogennych szczepów wirusa zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza.

W kraju dostępnych jest ponad 10 preparatów zawierających różne genetyczne warianty atenuowanych wirusów IBD, zatem postawione wcześniej pytanie jest jak najbardziej zasadne? Bowiem choroba Gumboro jest realnie istniejącym problemem, w mojej ocenie jednym z najważniejszych w produkcji brojlerów kurzych i istotnym w odchowie kurek lekkich, dotyczy to szczególnie regionów z intensywną produkcją drobiarską (Mazowieckie, Wielkopolskie, Zachodnio-Pomorskie).

Po bardzo krytycznej analizie opracowania, z nadzieją, że uwagi i sugestie pomogą Autorce w poprawieniu dysertacji przy jej publikacji, stwierdzam, iż Pani mgr Anna Pikuła wykazała w pracy doktorskiej bardzo dobre przygotowanie merytoryczne do samodzielnego rozwiązywania postawionych celów badawczych.

Recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz w pełni potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a tym samym w pełni spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom określone w art.13 ust.1. Ustawy o stopniach

naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365).

Po całościowym rozważeniu wartości poznawczej recenzowanej dysertacji zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie Pani mgr Anny Pikuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
KIEROWNIK KATEDRY

/ Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk /