

Warszawa, 2016.02.17

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 Jacukowicz pod tytułem**

### **„OCENA WYSTĘPOWANIA I CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA ASTROWIRUSÓW W POPULACJI DROBIU GRZEBIĄCEGO W POLSCE”**

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 (Nr pisma BRN-410/7/16).

#### **Wstęp**

W latach 2005-2016 branża drobiarska w Polsce bardzo dynamicznie się rozwija, w tym okresie wzrost produkcji uległ podwojeniu. Obok wielu innych czynników temu wzrostowi sprzyjały szczególnie: sytuacja globalna (światowa konsumpcja mięsa drobiowego wzrosła w tym czasie o ok. 35 %); wejście Polski do Unii Europejskiej (dostęp do europejskiego rynku); rozwój lokalnego rynku (wzrost konsumpcji o ok. 40%) . W efekcie Polska jest dziś 7 największym producentem i 4 eksporterem mięsa drobiowego na świecie. Bardziej obrazowo wielkość produkcji drobiu opisują dane stwierdzające, że w naszym kraju, pod względem produkcji na 1 mieszkańca dorównujemy światowym liderom branży. Dane za rok 2015 potwierdzają, iż jesteśmy wiceliderem rankingów światowych, produkujemy bowiem 63 kg mięsa drobiowego na głowę statystycznego obywatela (ten wskaźnik w przypadku lidera Brazylii wynosi 66 kg) . Polska jest już od kilku lat liderem w produkcji mięsa kurcząt rzeźnych w EU, przewiduje się, że w najbliższym czasie będziemy również produkować najwięcej mięsa indyczego wśród krajów wspólnoty. Mamy także mocną pozycję w produkcji gęsiny i mięsa kaczego. W produkcji jaj mieścimy się w pierwszej siódemce unijnych producentów. Blisko połowa produkcji mięsa drobiowego jest eksportowana na najbardziej wymagające rynki europejskie. Bez wątplenia krajowa branża drobiarska osiągnęła swój sukces ponieważ

produkuje tanio, nasze produkty drobiowe są dobrej jakości i bezpieczne dla zdrowia konsumenta.

Jest oczywiste, że bez właściwie zorganizowanej i efektywnej opieki weterynaryjnej nad każdym etapem produkcji, nie byłby możliwy tak spektakularny sukces branży. Krajowi specjaliści – awiopatolodzy to skonsolidowana grupa, obecnie działająca w zespołach liczących kilku- kilkudziesięciu lekarzy. Taka organizacja praktyk drobiarskich umożliwia kompleksową obsługę zwłaszcza dużych, integrujących się podmiotów produkcyjnych.

Jednym z tematów, który był i ciągle jest aktualny w praktycznej profilaktyce i terapii chorób stad drobiu jest problem chorób przewodu pokarmowego, które są najistotniejszą przyczyną strat ekonomicznych w intensywnej produkcji drobiarskiej (Szeleszczuk P., Dolka B., Żbikowski A.: *Stany biegunkowe u drobiu: diagnostyka, postępowanie terapeutyczne, profilaktyka, metafilaktyka i prewencja. Mat. Kon. Nauk. „Enteropatie u drobiu”*. 13-14. 09. 2013, Puławy, str. 86-119). Straty spowodowane przez enteropatie wynikają głównie z obniżonej masy ciała ptaków rzeźnych, wzrostu śmiertelności, złego wykorzystania paszy (podwyższenie współczynnika konwersji) i często wysokich kosztów leczenia. Choroby przewodu pokarmowego zwiększają także ryzyko zanieczyszczenia tuszek, obniżając bezpieczeństwo produktów drobiowych dla ludzi. Z punktu widzenia efektywnej produkcji drobiarskiej nawet niewielkie zaburzenia w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego są niepożądane, prowadzą bowiem do strat. Od sprawnej pracy, zwłaszcza jelit, zależy tempo przyrostów masy ciała. Stopień skomplikowania budowy i funkcji układu trawiennego oraz presja wielu niekorzystnych, wynikających z technologii produkcji czynników, są przyczyną jego częstych dysfunkcji. Jak się szacuje enteropatie kliniczne stanowią od 30 do 50 % patologii w odchowcie kurcząt brojlerów i indyków rzeźnych. Patogeneza chorób jelit u drobiu jest wynikiem wielu procesów zmieniających strukturę tego narządu i prowadzących do zmiany jego funkcji. Jak wynika z danych piśmiennictwa zmiany patologiczne występują w różnym nasileniu w stadach klinicznie zdrowych z wiekiem stając się coraz bardziej zaawansowane obejmując całe stado. Największym zagrożeniem zdrowotnym wynikającym z biegunki jest utrata płynów oraz zaburzenia gospodarki elektrolitowej. W szczególności u piskląt biegunka szybko doprowadza do odwodnienia i upadków. Najczęstsza przyczyna biegunki ostrej to zaburzenia funkcji przewodu pokarmowego na tle zakażeń wirusowych (np. *Coronaviridae*, *Reoviridae*, *Caliciviridae*, *Parvoviridae*, *Circoviridae*, *Picornaviridae*, *Astroviridae* oraz *Picobirnaviridae*), bakteryjnych (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella sp.*, *Yersinia sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp*) inwazji pasożytniczych (*Eimeria tenella*) i ostrych

zatruc (związanych z działaniem mykotoksyn oraz toksyn wytwarzanych przez niektóre gatunki bakterii – np. *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*).

Jest oczywiste, że sprawnie funkcjonujący przewód pokarmowy u drobiu to istotny warunek osiągnięcia dobrych wyników produkcyjnych i ekonomicznych chowu. W USA oszacowano straty wynikające z występowania różnego rodzaju enteropatii na ok. 10 centów amerykańskich/funt mięsa drobiowego.

W Polsce do czasu rozpoczęcia przez Panią Profesor Domańską - Blicharz około 10 lat temu, nie prowadzono pogłębionych badań nad enteropatiami drobiu, nie prowadzono również obliczeń szacujących straty wynikające z występowaniem różnego rodzaju stanów patologicznych przewodu pokarmowego w stadach kur i indyków. Pani Profesor zrealizowała dwa ważne granty [N308 033 32/2836- *Doskonalenie metod diagnozowania oraz ocena sytuacji epidemiologicznej zakażeń koronawirusami u kur i indyków w Polsce* (2007-2011) oraz N N308 578 040- *Rola zakażeń wirusowych w enteropatiach u drobiu w Polsce* (2011-2014)], które wskazały na znaczenie tego problemu w krajowym drobiarstwie. Wyniki tych prac zostały omówione w publikacjach: *Domańska-Blicharz K., Seroka A., Minta Z.: One-year molecular survey of astrovirus infection in turkeys in Poland Arch Virol 2011, 156, 1065–1072* i *Domanska-Blicharz K., Jacukowicz A., Lisowska A., Minta Z.: Genetic characterization of parvoviruses circulating in turkey and chicken flocks in Poland, Archives of Virology, 2012; 157: 2425-2430*). Warto podkreślić, że zakres badań zespołu Profesor Domańskiej – Blicharz (do którego należała Doktorantka) objął 4 różne wirusy: astrowirusy, rotawirusy, parwovirusy i koronawirusy. Łącznie Autorzy przebadali ponad 260 stad indyków (styczeń 2008-grudzień 2012) oraz 86 stad kur i kurcząt (czerwiec 2011 – grudzień 2012). Ptaki w stadach, w których pobierano próbki były w dobrej kondycji zdrowotnej lub wykazywały objawy chorobowe charakterystyczne dla enteropatii. Spośród przebadanych 264 stad indyków, astrowirusowe RNA wykrywano w 114 (43,8%) stadach, natomiast sekwencje nukleotydowe charakterystyczne dla koronawirusów w 23 (8,7%) stadach. Z kolei obecność genomu rotawirusów i parwovirusów zidentyfikowano odpowiednio w 63 (23,8%) i 74 (28%) stadach. Na przebadanych łącznie 86 stad kurcząt i kur w 38 (44,1%) stadach zidentyfikowano obecność parwovirusów. W 11 stadach (12,7%) stwierdzono obecność rotawirusów a zaledwie w 2 stadach (2,3%) obecność astrowirusów. Najwięcej, bo 64 stad (74,4%) było zakażonych CoV odpowiedzialnych za IB. Uzyskane wyniki sugerują, że u indyków najpowszechniejszymi spośród wirusów odpowiedzialnych za enteropatie są zakażenia astrowirusami (43,8%), w mniejszym stopniu parwovirusami (28%) oraz rotawirusami (23,8%), natomiast zakażenia koronawirusami są sporadyczne (8,7%). Z kolei u kurcząt i kur najczęściej identyfikowane były

parwovirusy (44,1%) oraz rotawirusy (12,7%), natomiast zakażenia astrowirusami były wykrywane incydentalnie. Ponadto, niektóre z w/w wirusów zostały poddane dokładniejszej charakterystyce molekularnej. W przypadku astrowirusów indyckich badacze dokonali ich zróżnicowania na poszczególne typy (astrowirus indycki typu 1 czyli TAstV-1, typu 2 czyli TAstV-2 i wirus zakaźnego zapalenia nerek czyli ANV). Wykorzystano do tego cztery różne metody molekularne wykrywające ten sam gen polimerazy (ORF1b) lecz różne jego fragmenty. Obecność TAstV-2 stwierdzono w 30 stadach (38,9%), natomiast typ TAstV-1 w 9 stadach (11,6%), przy czym niektóre stada zakażone były kilkoma typami TAstV. Obecność genomu ANV wykryto tylko w jednym stadzie (1,29%) i był to pierwszy przypadek identyfikacji ANV u indyków poza Stanami Zjednoczonymi. Analiza filogenetyczna w oparciu o fragment ORF1 wykazała duże zróżnicowanie genetyczne w sekwencjach wybranych polskich TAstV. Niektóre ze szczepów wykazywały podobieństwo do północnoamerykańskich TAstV-2, jednak większość tworzyła odrębną podgrupę szczepów europejskich, co może sugerować ich odrębne pochodzenie. Stwierdzona duża zmienność sekwencji astrowirusów indyków sprawia, że metody RT-PCR ukierunkowane na określanie poszczególnych typów okazały się mało przydatne, natomiast najlepszą wydaje się być sekwencjonowanie produktu z RT-PCR ukierunkowane na wykrywanie wszystkich typów astrowirusów.

Jak można sądzić ze względu na rozprzestrzenienie zakażeń astrowirusowych Pani mgr Jacukowicz podjęła się pogłębienia prowadzonych w Zakładzie Chorób Ptaków PIWet-PIB badań w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej.

Od czasu pierwszego odkrycia astrowirusów (AstV) w 1975 r. u dzieci, są one wykrywane u wielu gatunków zwierząt, w tym także u ptaków i związane głównie ze stanami patologicznymi jelit. Enteropatie te opisywane są pod różnymi nazwami, u kurcząt: syndrom zahamowania wzrostu (RSS-runting stunting syndrom) lub syndrom złego wchłaniania (MAS-malabsorption syndrom), natomiast u indyków: zespół zapalenia jelit indycząt (PEC - poult enteritis complex) oraz syndrom śmiertelności na tle zapalenia jelit indycząt (PEMS - poult enteritis mortality syndrome).

Generalna, pozytywna uwaga, jaka nasuwa się po lekturze recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr Anny Jacukowicz jest taka, iż doktorantka wykazała się niezwykłą determinacją w gromadzeniu prób do badań epidemiologicznych trwających, w przypadku stad indyków przez 6 kolejnych lat. 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 byłyby to niezwykle ciekawy

materiał wskazujący na kształtowanie się dynamiki zakażeń na przestrzeni lat, która jak wskazują to dane zgromadzone w tabeli 11 ulegała zmianom. Często w pracy pojawia się sformułowanie „nie uzyskano informacji odnośnie...”, „nie otrzymano informacji...”, „nie uzyskano informacji...”. Jakie trudności napotkała Doktorantka przy gromadzeniu danych o materiale może świadczyć fakt, że jedynie dla 134 stad indyckich uzyskano informacje odnośnie liczebności stad i płci badanych ptaków co stanowi 45,7 % badanych ferm!

Osobiście, wybór tematu pracy doktorskiej uważam, za cenny i potrzebny zwłaszcza w aspekcie aktualnej sytuacji epidemiologicznej w zakresie zakaźnych chorób przewodu pokarmowego drobiu rzeźnego. Niewątpliwie podjęcie tak szeroko zakrojonych badań nad enteropatiami ptaków gospodarskich, było możliwe dzięki wieloletnim pracom, których wyniki cytowałem wcześniej, realizowanym przez Zakład Chorób Drobiu, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego przez wspomnianą już Panią Profesor Domańską – Blicharz.

### **Ocena pracy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny praca doktorska „**Ocena występowania i charakterystyka molekularna astrowirusów w populacji drobiu grzebiącego w Polsce**” 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 dbała także dr hab. Katarzyna Domańska-Blicharz, prof. nadzw. PIWet-PIB – promotor pomocniczy.

Dysertacja posiada układ typowy dla opracowań na stopień naukowy i zawarta jest na 100 stronach uwzględniających 20 tabel, 21 rycin oraz podzielona jest na następujące rozdziały: wstęp, cel, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie, summary, figury oraz piśmiennictwo.

Szata edytorska ocenianej rozprawy jest staranna i estetyczna. Ogólne wrażenie z lektury dysertacji jest pozytywne i można stwierdzić, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Anny Jacukowicz 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. 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 niezręczności językowych, które

zaznaczono w tekście. Jako przykład można podać niewłaściwe określenie „*Jednodniowych kurcząt SPF*”. Jednodniowe mogą być tylko pisklęta kurze SPF. Ponadto nieliczne literówki zaznaczono w tekście pracy. Cytowane w pracy doktorskiej, piśmiennictwo zamykające się liczbą 129 publikacji jest wyborem wyselekcjonowanych pozycji literaturowych poświęconych astrowirusom. Dobór piśmiennictwa wskazuje na dojrzałość naukową i umiejętność wyboru dostępnej w tym zakresie literatury źródłowej. Podkreślić należy, że Autorka uwzględniła również pozycje piśmiennictwa krajowego wybierając 7 najbardziej reprezentatywnych prac. W tej liczbie pracę Minty i Bartnickiej, w której Autorzy opisali przeprowadzone po raz pierwszy w kraju badania seroepidemiologiczne (1996-99) w kierunku wirusowego zapalenia nerek (ANV) i które wykazały częste występowanie zakażeń tym wirusem zarówno w stadach towarowych kurcząt brojlerów jak też w stadach reprodukcyjnych kur typu mięsnego. Badania te potwierdzały wcześniejsze obserwacje kliniczne o pojawieniu się klinicznych przypadków ANV w Polsce (*Szeleszczuk P.: Wirusowe zapalenie nerek ptaków. Medycyna Wet. 51, 568-571, 1995*). W zestawie znalazły się również cytowane wcześniej prace z tego zakresu wykonane pod kierunkiem Profesor Katarzyny Domańskiej - Blicharz w latach 2007 -2014.

Opiniowaną pracę doktorską rozpoczyna obszerny wstęp, obejmujący 17 stron, wprowadzający czytelnika w problematykę związaną z przebiegiem zakażeń astrowirusami u drobiu. Doktorantka w 7 podrozdziałach omawia w syntetycznej formie całość tej problematyki poczynając od obszernego wprowadzenia, poprzez podział taksonomiczny, charakterystykę budowy molekularnej oraz epidemiologię, diagnostykę i zwalczanie. W szerokim wprowadzeniu Pani Magister przedstawia historię występowania zakażeń astrowirusowych u ludzi, zwierząt i ptaków na świecie oraz w Polsce. Zawarty w tej części dysertacji emocjonalny opis „*zmuszania drobiu do większego wysiłku i wyciskania z nich większej ilości produktów*” proponuję usunąć z tekstu pracy jako mało profesjonalny. Podane przez Doktorantkę kryteria różnicowania PEC/PES; LTS; PEMS; RSS; MAS, są dość lakoniczne, zasadniczo arbitralne i wskazują na potrzebę uzgodnień terminologicznych w krajowym nazewnictwie awiopatologicznym. Moim zdaniem sytuację, w której tempo prowadzonych badań i lawinowy przyrost nowych wyników zmienia diametralnie dotychczas panujące poglądy na taksonomię jest podrozdział 1.2 opisujący klasyfikację astrowirusów. Zebrana liczba danych jednostkowych na temat tych zarazków jest tak duża i różnorodna, że Grupa Badań Astrowirusów ICTV wprowadziła interesującą pozycję taksonomiczną: „wirus spokrewniony, który może być sklasyfikowany do rodzaju Astrowirus lecz nie zatwierdzony do żadnego gatunku”. W obszernym podrozdziale 1.3. Autorka podaje charakterystykę molekularną

astrowirusów. Jest to bardzo głęboko specjalistyczne zagadnienie niezbędne jednak dla zrozumienia wykonanych przez Doktorantkę badań. Szczególnie przydatne są fragmenty opisujące organizację genomu wirusa. Ciekawym mechanizmem wykorzystanym w klasyfikacji nowych astrowirusów jest obecność lub brak przesunięcia ramki odczytu „retrovirus like” zlokalizowanej pomiędzy ORF 1a i ORF 1b.

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

Cel pracy (rozdział 2) jest ukryty w dość obszernym wprowadzeniu mającym przekonać czytelnika o zasadności podjętych badań. Autorka stwierdza, iż „*w celu poznania sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania astrowirusów w populacji drobiu grzebiącego w Polsce podjęto badania nad wykrywaniem i charakterystyką molekularną aktualnie występujących szczepów astrowirusów*”. By zrealizować to zamierzenie wykonywane w pierwszym etapie prace badawcze miały na celu opracowanie metod wykrywania i różnicowania szczepów astrowirusów oraz analizę molekularną genów wirusowej polimerazy i kapsydu. Przygotowane protokoły badawcze zostały wykorzystane do oceny sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania zakażeń astrowirusami w krajowej populacji drobiu grzebiącego oraz określenie roli tych zakażeń w wywoływaniu stanów patologicznych jelit u drobiu. Doktorantka sformułowała cztery szczegółowe zadania, których wykonanie winno spełnić wcześniejszą deklarację czyli określenie roli astrowirusów w wywoływaniu enteropatii u kur i indyków rzeźnych. Zadania te to:

- Wdrożenie molekularnych metod wykrywania i różnicowania astrowirusów na poszczególne typy: TAstV-1, TAstV-2, CAstV, ANV,
- Ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania astrowirusów u kur i indyków w kraju,
- Określenie taksonomii zidentyfikowanych krajowych izolatów AstV w oparciu o fragmenty ORF1b (wcześniejsza klasyfikacja Astroviridae) oraz ORF2 (obowiązująca klasyfikacja Astroviridae),
- Analiza filogenetyczna polskich szczepów AstV w oparciu o fragment genów RdRp oraz kapsydu.

Trzeba podkreślić, że kluczowe znaczenie w ocenie występowania zakażeń astrowirusowych w krajowej populacji drobiu grzebiącego oraz oszacowaniu czy odgrywają one istotną rolę w wywoływaniu enteropatii stanowi posiadanie nowoczesnego warsztatu diagnostycznego opartego na metodach biologii molekularnej, który w kraju jest najpełniej

dostępny w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

W rozdziale 3 dysertacji, opisującym materiał i metody zastosowane przez Doktorantkę, w czterech odrębnych podrozdziałach przedstawiła ona kolejno szczepy wirusowe, zastosowane metody molekularne, analizę sekwencyjną szczepów AstV oraz w podrozdziale czwartym użyte metody statystyczne. Procedurę oraz stopień jej skomplikowania, zastosowaną przy gromadzenia materiału do badań Autorka przedstawiła w podrozdziale 3.1. Materiał pozyskano dzięki bardzo szerokiej współpracy z lekarzami weterynarii praktykami opiekującymi się stadami indyków rzeźnych i kurcząt brojlerów. Dla potrzeb badań opracowano bardzo proste kwestionariusze dotyczące badanych stad. W okresie 6 lat przebadano łącznie blisko 300 stad indyków rzeźnych pochodzących z całej Polski oraz w ciągu 3 lat trwania badań 114 stad kurcząt brojlerów. W porównaniu do liczby stad produkcyjnych w kraju jest to stosunkowo niewielka liczba, wynikająca w głównej mierze z kosztowności wykonywanych badań. Następnie przedstawiony jest szczegółowy protokół przygotowania próbek do badań. Po wstępnej identyfikacji wybrano 49 terenowych izolatów AV od kur i indyków pochodzących z różnych regionów Polski, choć blisko połowa z nich pochodziła z województwa warmińsko-mazurskiego. Zdecydowana większość badanych izolatów pochodziła od indyków rzeźnych (około 86 %).

W podrozdziale 3.2. Autorka podaje zasady przeprowadzania badań molekularnych. W celu wykrycia genomu AstV oraz różnicowania wykrytych astrowirusów na poszczególne typy AstV zastosowano cztery różne metody molekularne wykrywające różne fragmenty genu polimerazy wirusowej znajdujący się w obrębie ORF1b. W celu wykrycia wszystkich typów astrowirusów wdrożono jednoetapową reakcję RT-PCR według Tanga i wsp. (2005). Obecność RNA astrowirusów należących do typu TAstV-2 wykrywano stosując reakcję odwrotnej transkrypcji – amplifikację cDNA w czasie rzeczywistym - real time RT-PCR.

Podanie opisu metod badań genetycznych w formie tabel ułatwia zapoznanie się ze szczegółami prowadzonych reakcji. Z zadowoleniem należy odnotować dużą troskę Autorki o poprawność metodologiczną użytych metod, były one nie tylko optymalizowane, ale i walidowane w celu określenia ich czułości i specyficzności. Należy podkreślić, że Doktorantka nie mając możliwości pozyskania komercyjnie dostępnych szczepów wzorcowych przygotowała własne kontrole dodatnie (Tab.5.).

Podrozdział 3.4. opisuje bardzo szczegółowo analizę statystyczną uzyskanych wyników, dostosowaną do charakteru zgromadzonych danych. Zastosowano między innymi test  $\chi^2$ , posłużono się również testem istotności dla różnicy dwóch frakcji oraz wyliczono



współczynnik Cohena kappa.

Rozdział „Wyniki” jest najobszerniejszym fragmentem ocenianej pracy (31 stron) i bardzo zróżnicowanym pod względem formy, ale poprawnie prezentującym dokonania Doktorantki. Zgrupowanie wyników w czterech podrozdziałach ułatwia śledzenie uzyskanych danych. Z klinicznego punktu widzenia najbardziej interesujące są pierwsze dwa podrozdziały przedstawiające informacje o rozprzestrzenieniu AstV w badanych stadach indyków i kur. W odniesieniu do wybranych 49 szczepów terenowych (39 indyckich i 10 kurzych) Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę filogenetyczną fragmentu genu wirusowej polimerazy za pomocą starterów TAPG-L1/TAPB-R-1. Jednym z najbardziej interesujących osiągnięć Doktorantki jest sporządzenie drzew filogenetycznego polskich szczepów AstV. Oprócz porównania sekwencji nukleotydowych mgr Jacukowicz zestawiała ze sobą przewidywane sekwencje aminokwasowe polskich szczepów oraz szczepów referencyjnych AstV. Analizie filogenetycznej genu kapsydu wirusowego poddano 40 polskich szczepów AstV zidentyfikowanych w stadach indyków oraz szczepy ze stad kur. Sekwencjonowanie prowadziła Doktorantka z użyciem starterów MKCap8/MKCap19. Do tej analizy wybrano 39 szczepów indyckich i 8 szczepów wykrytych w stadach kur. Jest również oryginalnym osiągnięciem Autorki opracowanie drzewa filogenetycznego zarówno dla szczepów indyckich jak i izolowanych od kur. Podobnie jak w przypadku sekwencji genu polimerazy wirusowej oprócz porównania sekwencji nukleotydowych zestawiała ze sobą przewidywane sekwencje aminokwasowe szczepów AstV polskich i zagranicznych.

Podrozdział 4.4. wyników jest stosunkowo obszerny, ale bardzo dydaktycznie przedstawiony w formie 3 tabel i 4 wykresów obrazujących istotność statystyczną uzyskanych wyników.

Spośród 293 badanych stad indyków mięsnych, w wieku od 1 dnia do 19 tygodnia życia, obecność astrowirusów wykazano w 143 (48,8%) stadach. Materiał wirusowy ze 117 stad AstV-dodatnich Doktorantka poddała dalszej analizie mającej na celu identyfikację typu AstV (TAstV-1, TAstV-2, ANV i CAstY), stosując szereg reakcji RT-PCR (konwencjonalne i w czasie rzeczywistym) oraz sekwencjonowanie. Uzyskane wyniki wskazały, że w krajowych stadach indyków dominuje zakażenie typem TAstV-2, którego przewalencja w zależności od stosowanego sposobu detekcji wynosiła 61,5% - 82,9%. Astrowirus indycki typu 1 zidentyfikowano w zależności od sposobu dochodzenia w 22 (18,8%) lub 33 (28,2%) stadach. Stosując tylko metody PCR do wykrywania/identyfikacji AstV, w żadnym indyckim stadzie nie wykryto wirusa zakaźnego zapalenia nerek (ANV). Jednak zastosowany drugi sposób detekcji, PCR i sekwencjonowanie jego produktu, umożliwił identyfikację ANV w jednym

stadzie indyczym, co stanowiło 0,9% wszystkich stad astro-dodatnich.

Ocenę występowania astrowirusów w populacji kur Autorka dokonała w oparciu o badania molekularne 113 stad. Obecność astrowirusów wykazano w 10 (8,8%) stadach, spośród których w próbkach z ośmiu stad określono typ AstV stosując metodę sekwencjonowania produktu PCR. Pięć z nich należało do CAstV, dwa do TAstV-1, natomiast jeden AstV okazał się wirusem zapalenia nerek. Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza filogenetyczna w oparciu o znajdujący się w obrębie ORF2 gen wirusowego kapsydu wykazała, że wszystkie badane polskie astrowirusy zidentyfikowane u indyków, przynależą do gatunku Avastrovirus 3. Z kolei astrowirusy wykryte w stadach kur przynależą do grupy B, która najprawdopodobniej będzie kanwą utworzenia nowego gatunku w obrębie rodzaju Avastrovirus. U indyków zidentyfikowano także infekcje mieszane typów TAstV-1 i TAstV-2. Wśród polskich astrowirusów wykazano dużą zmienność genetyczną, zarówno pod względem budowy RdRp jak i białka kapsydu, co potwierdza wcześniejsze spostrzeżenia wielu autorów z różnych krajów świata. Porównanie sekwencji nukleotydowej fragmentu genu polimerazy wirusa pomiędzy polskimi szczepami TAstV-1 wykazało homologię na poziomie 86,6% - 97,9%, zaś wśród polskich szczepów TAstV-2 homologię rzędu 88,5% - 100%. Zidentyfikowane dwa krajowe szczepy ANV w porównaniu nukleotydów fragmentu genu RdRp wykazały niską homologię (73,3%). Z kolei homologia polskich astrowirusów kurzych w analizie nukleotydowej fragmentu genu polimerazy była w zakresie 82,5% -96,2%.

W celu oszacowania wpływu zakażenia astrowirusami na status zdrowotny ptaków, analizie statystycznej poddano 293 stada indyków, spośród których w 206 (70,3%) notowano zaburzenia ze strony układu pokarmowego (PEC/PEMS), a w 66 (22,5%) nie stwierdzano objawów chorobowych. Zakażenia astrowirusami stwierdzono w 105 (51%) stadach wykazujących symptomy PEC/PEMS i w 30 (45,5%) stadach zdrowych, co wskazuje na brak korelacji pomiędzy występowaniem astrowirusów a kondycją zdrowotną w zakażonych stadach indyków. Z pozostałych 21 (7,2%) stad poddanych analizie, o nieznanym statusie zdrowotnym, w 8 (38,1%) stadach wykryto obecność AstV.

Wykazano natomiast dużą zależność pomiędzy występowaniem zakażeń astrowirusami a wiekiem indyków. Największy odsetek (68,4%) ptaków zakażonych AstV obejmował ptaki w początkowym okresie tuczu (grupa wiekowa od 1 dnia do 4 tygodnia życia), natomiast w pozostałych grupach wiekowych, w przedziałach: 5-12 tydzień życia i powyżej 12 tygodnia życia odsetek ten był wyraźnie niższy, odpowiednio: 28,6% i 33,3%. Najstarsze indyki, u których stwierdzono zakażenie TAstV były w wieku 18 tygodni.

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. W kilku punktach podkreśla oryginalność podjętych przez siebie tematów. Generalnie można stwierdzić, że poza drobnymi usterkami Doktorantka sprawnie konfrontuje własne wyniki badań, wykazując się sporą wiedzą na temat dotychczas wykonanych prac innych badaczy.

Rozdział „Wnioski” – ten bardzo istotny element pracy doktorskiej, jest bardzo często krytykowany przez recenzentów, w tym przypadku jest podobnie bowiem moim zdaniem liczba wniosków jest zbyt duża (8) co nie wydaje się być uzasadnione. Jak sądzę wnioski 1 i 3 winny zostać połączone podobnie wnioski 2, 4 i 5. Wniosek 6 a powinien być połączony z wnioskiem siódmym. Wniosek 8 winien być uzupełniony o opis korelacji między występowaniem astrowirusów a statusem zdrowotnym zakażonych kur.

Uzyskane wyniki badań oraz ich analiza upoważniły Autorkę do wyciągnięcia, 8 wniosków powiązanych z celami, jakie doktorantka postawiła sobie do rozwiązania rozpoczynając badania. Wniosek pierwszy informuje czytelnika, że *„Wdrożona metoda konwencjonalna RT-PCR wg. Tang i wsp. pozwalała wykrywać wszystkie astrowirusy, mimo ich dużego zróżnicowania genetycznego [116].”*. Wniosek ten potwierdza dane wielu innych autorów, bowiem już ponad 12 lat ten protokół diagnostyczny jest z sukcesami stosowany. Wniosek drugi stwierdza, że *„Występowanie zakażeń astrowirusami było znacząco większe w stadach indyków (48,8%) niż w stadach kur (8,8%)”*. Jak podkreśla Autorka podobną prawidłowość stwierdzili również i inni badacze (w tym Domańska-Blicharz i wsp.), bowiem dane literaturowe podają, że odsetek astrowirusów indyckich waha się od 40 do 80 % w stadach chorych ptaków, natomiast w stadach ptaków zdrowych rozprzestrzenienie TAsV jest mniejsze niż 50 %. Dalej we wniosku trzecim Autorka podsumowuje, że *„Metody RT-PCR (konwencjonalne i w czasie rzeczywistym) do różnicowania na typy astrowirusów (TAsV-1, TAsV-2, ANV i CAsV) nie wykrywały wszystkich typów polskich TAsV, jednak z drugiej strony umożliwiały wykrycie zakażeń mieszanych”*. Jest istotną wartością pracy doktorskiej Pani mgr Anny Jacukowicz, iż wykazała, że w stadach indyków dominowały zakażenia astrowirusami indyckimi typu TAsV-2, rzadziej stwierdzano typ TAsV-1 i po raz pierwszy w kraju wykryto zakażenie wirusem zapalenia nerek (ANV). W stadach kur poza astrowirusem kurzym (CAsV) i wirusem zapalenia nerek zidentyfikowano typ TAsV-1, co jest drugim przypadkiem stwierdzonym w świecie (wniosek 4 i 5). Wyniki wykonanych analiz filogenetycznych nad krajowymi AstV podsumowuje wniosek 6. Autorka konstatuje, że wykryte u indyków wirusy należą do gatunku *Avastrovirus 3*, mimo ich dużego zróżnicowania genetycznego, szczególnie wśród typu TAsV-2, zaś zarazki wykryte u kur znalazły się w grupie wirusów, które nie zostały

do końca udowodnioną hipotezą, że wykazane u części stad indyków astro-dodatnich infekcje mieszane (TAsV-1 i TAsV-2) mogą być przyczyną rekombinacji pomiędzy szczepami/typami AstV. Wyniki zaprezentowane przez Doktorantkę stanowią bardzo ciekawy punkt wyjścia do dalszych badań w tym zakresie. Dla klinicysty sformułowany przez Doktorantkę wniosek 8, iż nie wykazano korelacji pomiędzy występowaniem astrowirusów a statusem zdrowotnym zakażonych indyków potwierdza powszechnie przyjmowane stanowisko, że udział tych patogenów w wywoływaniu enteropatii zakaźnych o kur i indyków jest mało istotny, a stwierdzane zespoły chorobowe związane z tymi patogenami są konsekwencją innych zakażeń lub innych czynników w tym niezakaźnych. Wykazane przez Doktorantkę występowanie dużej zależności między wiekiem indycząt a problemami klinicznymi jest potwierdzeniem danych piśmiennictwa. W badaniach Autorki wykazano bowiem najwyższy odsetek zakażeń u ptaków do 4 tygodnia życia. Ponieważ celem pracy nie była ocena skutków zakażeń AstV w badanych stadach indyków i kur, a takie badania byłyby bardzo potrzebne i interesujące, obserwacje Pani Magister nie odpowiadają na pytanie, jakie straty przynoszą zakażenia astrowirusowe.

Po krytycznej analizie opracowania, z nadzieją, że uwagi i sugestie pomogą Autorce w poprawieniu dysertacji przy jej publikacji, stwierdzam, iż Pani mgr Anna Jacukowicz wykazała w pracy doktorskiej dobre przygotowanie merytoryczne do 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 Jacukowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

KIEROWNIK ZAKŁADU  
/ Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk /

