

Prof. dr hab. Alina Wieliczko
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Pikuły pt.: **„Zastosowanie metod biologii molekularnej do wykrywania i charakterystyki szczepów wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza”** wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Zenona Minty oraz dr hab. Krzysztofa Śmietanki, prof. nadzw.

1. Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest oprawionym wydrukiem komputerowym formatu A4 złożonym z 142 stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich i zawiera 10 uporządkowanych rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz ryciny. Podkreślić należy bogaty materiał dokumentacyjny wyników badań, na który składają się: tabele (22) i ryciny zamieszczone w tekście odpowiednich rozdziałów (ryc. 1-35) oraz na końcu pracy (ryc. 36-38). Przegląd piśmiennictwa obejmuje 225 starannie dobranych pozycji literaturowych, autorów krajowych i zagranicznych. Ponadto, cenny jest zamieszczony na wstępie pracy wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy. Praca napisana jest bardzo starannie, zwięzłym i zrozumiałym językiem.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Wirus zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza (IBDV, rodzina *Birnaviridae*, rodzaj *Avibirnavirus*) jest czynnikiem etiologicznym wywołującym u młodych kurcząt chorobę wysoce zakaźną, o zróżnicowanym przebiegu klinicznym - zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza (choroba Gumboro, IBD). Występujące od lat 50. ubiegłego wieku zakażenia IBDV, głównie w stadach kur kierunku mięsnego są istotną przyczyną strat ponoszonych w

produkcji drobiarskiej. Zakażenie w stadzie może skutkować wysoką śmiertelnością ptaków, powoduje również silną i długotrwałą immunosupresję po przechorowaniu kurcząt.

Bardzo staranny przegląd piśmiennictwa dokonany przez Doktorantkę w zakresie występowania IBD na świecie, właściwości antygenowych wirusa czy patogenyzy, a także stałe monitorowanie występowania zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza w Polsce, prowadzone przez zespół profesora Zenona Minty potwierdza, że od pierwszych przypadków choroby Gumboro zanotowano co najmniej kilka epidemii choroby na świecie, powodowanych przez szczepy wirusa o różnej zjadliwości, w tym wysoce zjadliwe - vvIBDV. Ponadto, potwierdzone przypadki zakażeń wirusem zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza u indyków czy obecność wirusa IBD w populacji ptaków dzikich pogarszają sytuację epidemiologiczną w tym zakresie. Również budowa genomu wirusa IBD sprzyja podatności na zmiany genetyczne, które mogą wpływać na zjadliwość i immunogenność wirusa. Dwuniciowe RNA, złożone z dwóch segmentów (A i B) może np. skutkować wystąpieniem zjawiska reasortacji pomiędzy różnymi szczepami, prowadzącego do powstawania nowych wariantów wirusa, posiadających nowe cechy, np. w zakresie zjadliwości.

Uwzględniając obecną sytuację epidemiologiczną zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza oraz stałe zagrożenie pojawianiem się nowych ognisk choroby, o ostrym przebiegu, nawet w stadach kurcząt szczepionych, istnieje potrzeba nie tylko precyzyjnej diagnostyki zakażeń w celu wykrywania wirusa IBD ale również dokładnej charakterystyki molekularnej pozwalającej na różnicowanie szczepów terenowych. Wiedza ta jest niezbędna w aspekcie szeroko stosowanych profilaktycznych szczepień przeciwko IBD. W tym aspekcie doceniam podjęte przez Doktorantkę badania mające na celu doskonalenie metod biologii molekularnej do wykrywania i charakterystyki szczepów wirusa IBD. Doktorantka postawiła sobie 3 zasadnicze cele, pierwszy z nich to:

- opracowanie i optymalizację metody RT-PCR oraz real-time RT-PCR do wykrywania materiału genetycznego IBVDV w tkankach kurcząt zakażonych naturalnie i eksperymentalnie oraz zarodków kurzych SPF zakażonych różnymi szczepami wirusa;

- drugi to charakterystyka zmienności genetycznej krajowych szczepów wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza wyizolowanych z przypadków terenowych na przestrzeni ostatnich 35 lat na podstawie sekwencjonowania, ocena występowania rekombinantów oraz analiza filogenetyczna z porównaniem sekwencji wirusów IBVDV dostępnymi w bazie danych GenBank;

- trzeci: określenie zjadliwości *in vivo* potencjalnych rekombinantów wirusa IBD. Cele te mgr Anna Pikuła w pełni zrealizowała.

W rozdziale materiał i metody Autorka precyzyjnie opisuje wszystkie metody, tak wirusologiczne (izolacja wirusa na zarodkach kurzych SPF, izolacja wirusa w hodowli komórek fibroblastów zarodka kurzego, określanie zjadliwości rekombinantów IBDV na 5 tyg. kurczętach SPF), jak i molekularne (metoda konwencjonalna RT-PCR oraz real time RT-PCR do wykrywania materiału genetycznego wirusa IBD w tkankach). Dla poprawności przeprowadzanych reakcji opracowane metody zostały zoptymalizowane oraz zwalidowane a następnie wykorzystane do charakterystyki 52 szczepów wirusa IBD pochodzących z przypadków choroby Gumboro w Polsce w latach 1978-2015. To ważna i bardzo poprawnie wykonana część badań, ściśle powiązana z drugim, istotnym zadaniem, jakim była charakterystyka zmienności genetycznej krajowych izolatów wirusa IBD. To właśnie zmienność genetyczna wirusów, w konsekwencji pojawianie się w środowisku ludzi i zwierząt nowych szczepów/wariantów/rekombinatów budzi największe zainteresowanie pracowników nauki i epidemiologów. Zawsze tam gdzie stosowane są szczepienia ochronne oparte na szczepach żywych, atenuowanych zdolność biologiczna wirusów do mutacji jest zdecydowanie wyższa. W badaniach zmienności genetycznej wirusa IBD Doktorantka stosowała reakcje RT-PCR z użyciem wielu starterów specyficznych dla sekwencji segmentu A oraz segmentu B genomu wirusa. Baza GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) z użyciem programu BLAST posłużyła Doktorantce do porównań uzyskanych sekwencji i analizy filogenetycznej, zaś do analizy występowania rekombinacji w badanej populacji szczepów IBDV Autorka zastosowała metody statystyczne.

Podkreślam precyzyjne i przejrzyste przedstawienie wszystkich metod badawczych, które zostały dobrze przemyślane, wykonane rzetelnie i są wystarczające do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych. Ponadto, dla czytelności opisów część informacji (np. wykaz szczepów, szczepy z bazy danych GenBanku czy użyte primery) zamieszczono w tabelach, co czyni pracę bardzo czytelną.

Na podkreślenie zasługuje uporządkowane i czytelne przedstawienie wyników badań, wzbogacone starannie opracowanymi tabelami i rycinami. Te ostatnie to również cenne zdjęcia obrazu histopatologicznego tkanek kurcząt zakażonych szczepami wirusa IBD o różnej patogenności oraz zmian anatomo-patologicznych u zakażonych kurcząt SPF.

Rozdział omówienie wyników i dyskusja jest napisany poprawnie. Doktorantka konfrontuje wyniki swoich badań z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. W

umiejętny sposób interpretuje otrzymane wyniki i uzupełnia je własnymi komentarzami, co nabiera wartości ze względu na notowany w kraju w ostatnich dwóch latach wzrost zakażeń kurcząt szczepami wysoce zjadliwymi wirusa IBD a także przełamania odporności poszczepiennej. Szczególnie interesująco jest prowadzona dyskusja na temat zmienności genetycznej w obrębie krajowych izolatów IBDV oraz wykrytego i scharakteryzowanego *in vivo* reasortanta wirusa IBD. Dyskusja świadczy o dużej znajomości tematu i możliwości krytycznej oceny oraz umiejętności argumentowania i prawidłowego posługiwania się cytowaniami.

Na zakończenie pracy Autorka formułuje 3 wnioski, których treść jest udokumentowana uzyskanymi wynikami. Wniosek 2 i 3 zostały mocno rozbudowane, co jednak znajduje uzasadnienie w obliczu uzyskanych ciekawych, wartych podkreślenia wyników będących efektem badań filogenetycznych krajowych szczepów IBDV oraz badań prowadzonych w warunkach *in vivo* polskiego reasortanta IBDV i szczepów atypowych vvIBDV (rekombinantów).

Do istotnych osiągnięć Doktorantki i ważnych rezultatów wynikających z wykonanych badań zaliczam:

- efektywną adaptację metody real-time RT-PCR, czułego i szybkiego narzędzia do wykrywania genomu IBDV oraz potwierdzenia zakażenia w stadach szczepionych preparatami nowej generacji oraz opracowanie własnej metody RT-PCR, która w połączeniu z sekwencjonowaniem pozwoliła na identyfikację patotypu wirusa IBD. Te metody molekularne, służące do różnicowania zidentyfikowanego szczepu IBD powinny być szerzej wykorzystywane w diagnostyce choroby Gumboro;
- wzbogacenie tworzony przez lata w Zakładzie Chorób Drobiu PIWet-PIB w Puławach kolekcji szczepów IBDV, izolowanych z przypadków terenowych zakażeń kurcząt, o nowe dane w zakresie ich molekularnej charakterystyki, w tym szczególnie:
 - wykazanie dużej zmienności genetycznej i przynależność do licznych podgrup z tendencją do zmienności w obrębie podgrup;
 - wykazanie znacznej odrębności na poziomie genetycznym polskich „wczesnych” szczepów IBDV (izolowanych na przełomie lat 70. i 80. XX wieku) od klasycznych i wysoce zjadliwych;
 - wykazanie stosunkowo dużej heterogenności w obrębie grupy wirusów wysoce zjadliwych, potwierdzającej dynamiczny charakter trwającej od 25 lat epidemii vvIBDV;

- wykazanie obecności rekombinacji, co w odniesieniu do genu VP1 pozwoliło na wyodrębnienie nowej, nieznanej dotychczas grupy wirusów IBDV „atypowych”, łączących w sobie cechy wirusów klasycznych i wysoce zjadliwych;
- wykazanie obecności 2 szczepów wysoce zjadliwych posiadających wstawkę w obrębie segmentu B wprowadzoną do genomu w wyniku rekombinacji homologicznej ze szczepem cIBDV;
- pierwsze w Europie potwierdzenie obecności reasortanta IBDV, z elementami genomu pochodzącymi od wirusów szczepionkowych (segment B) i wysoce zjadliwych (segment A), co potwierdza możliwość powstawania w warunkach terenowych „chimer” wirusowych, o potencjalnie nowych właściwościach biologicznych
- określenie, w badaniach *in vivo* zjadliwości wykrytego reasortanta oraz atypowych rekombinantów IBDV.

Istotę każdej recenzji stanowią uwagi krytyczne, dające Autorowi możliwość skorygowania niedociągnięć przed publikacją rozprawy w czasopiśmie.

Uwag krytycznych nie wnoszę do recenzowanej pracy, natomiast poniżej wspomnę tylko 3 z liczniejszych literówek czy błędnych zapisów dotyczących publikacji, które zauważyłam czytając z niniejszą pracę, np.:

- str. 7 (wstęp) jest: Chattle i wsp. – zaś poz. 26 piśmiennictwa” Chettle i wsp.”;
- str. 10: jest Owoade i wsp.- a powinno być: Owoade AA i Durojaiye OA (to tylko 2 autorów);
- str. 16 Kasanga i wsp. 2012 – zaś poz. 96 piśmiennictwa: Kasanga i wsp. 2013

3. Konkluzja

Dysertacja Doktorantki jest pierwszą, w pełni samodzielną pracą przedstawiającą obszerne i dobrze udokumentowane badania dotyczące opracowania i udoskonalenia, a następnie zastosowania czułych i specyficznych metod biologii molekularnej do wykrywania i charakterystyki szczepów wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza. Obserwacje mgr Anny Pikuły dają nowe spojrzenie na mechanizmy zmienności genetycznej wirusa IBD i wpływu obecności molekularnych determinantów na zjadliwość IBDV.

W mojej opinii praca zawiera elementy nowatorskie, została wykonana metodycznie poprawnie, na dużym materiale szczepów muzealnych IBDV oraz izolatach pozyskanych w ostatnich latach, wszystkie metody badawcze wykonano w profesjonalnych laboratoriach wyposażonych w nowoczesną aparaturę. Uzyskane wyniki mają dużą wartość naukową a także znaczenie praktyczne w ochronie zdrowia ptaków. Opracowanie i analiza tak dużej liczby wyników, ich czytelne przedstawienie świadczy o znajomości pracy laboratoryjnej i bardzo dobrym przygotowaniu Autorki do pracy naukowej.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Anny Pikuły pt.: **„Zastosowanie metod biologii molekularnej do wykrywania i charakterystyki szczepów wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza”** spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14. 03. 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wymagane dla rozpraw doktorskich. Wnoszę do Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie mgr Anny Pikuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, z uwagi na wartości naukowe i aplikacyjne pracy proponuję jej wyróżnienie.

Wrocław, 20.10. 2016 r.


prof. dr hab. Alina Wieliczko