

Warszawa, 2016.02.07

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

**lek. wet. Moniki Olszewskiej-Tomczyk pod tytułem**  
**„OCENA WRAŻLIWOŚCI RÓŻNYCH GATUNKÓW DROBIU NA**  
**ZAKAŻENIE WARIANTEM GOŁĘBIM WIRUSA CHOROBY NEWCASTLE”**

Oceny dokonano na zlecenie Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zgodnie z jej uchwałą z dnia 21 11 2016 roku, na podstawie materiałów przekazanych przez Pana prof. dr hab. Dariusza Bednarka przewodniczącego Komisji Doktorskiej (Nr pisma BRN-410/10/16).

### Wstęp

Historia paramyksowirozy gołębi to historia sporej części życia zawodowego recenzenta (*Szeleszczuk P.: Trzydzieści lat immunoprofilaktyki chorób gołębi w Polsce. Życie Wet. 90, 603-609, 2015*) stąd z dużym zainteresowaniem pochyliłem się nad rozprawą doktorską lek. wet. Moniki Olszewskiej-Tomczyk, która to praca formalnie nie dotyczy gołębi, ale wariantu gołębiego wirusa rzekomego pomoru drobiu, to jednak podaje wiele informacji przydatnych dla kolumbopatologa. Wirusy APMV-1 występujące u gołębi różnią się antygenowo i genetycznie od szczepów izolowanych od innych gatunków drobiu i zostały zakwalifikowane do grupy tzw. „wariantów gołębih APMV-1” oznaczanych skrótem „PPMV-1”. Choć wirusy PPMV-1 są zwykle specyficzne gatunkowo, to stwierdza się również przypadki zachorowań lub izolacji tego wirusa od ptaków innych niż gołębie. Patolodzy gołębi od lat używają na określenie zakażenia wariantem gołębim wirusa rzekomego pomoru drobiu terminu „paramyksowiroza”. Wcześniej używano też w krajowym piśmiennictwie określenia „paramyksowirozowa choroba gołębi”. Jest oczywiste, że określenie „paramyksowiroza gołębi” wprowadzone w połowie lat osiemdziesiątych przez Anglików, ma na celu uniknięcie skojarzeń z rzekomym pomorem drobiu, chorobą od dziesiątek lat urzędowo zwalczaną i niosącą za sobą restrykcje formalne. Do czasu opisanie transmisji PPMV-1 na kury za pomocą

skażonego ziarna w dokach Dover nie oceniano właściwie roli tego zarazka, jako potencjalnego zagrożenia dla drobiu, stąd to rozróżnienie wydawało się zasadne! W bardzo dydaktycznym opracowaniu Śmietanki i Minty (*Śmietanka K., Minta Z. Paramyksowiroza gołębi czy rzekomy pomór u gołębi? Polskie Drobiarstwo, Suplement Zdrowie, 2010, str. 24 -27*) znaleźć można opis właściwej terminologii i zasady postępowania w przypadku stwierdzenia rzekomego pomoru drobiu u gołębi.

W ocenie klinicznej epidemiologia zakażeń PPMV-1 w Polsce miała kilka wyraźnie różniących się okresów. Największe zniwo zebrała ostra postać kliniczna tej infekcji z dominującymi objawami ze strony układu nerwowego, która dziesiątkowała stada gołębi do czasu wprowadzenia na szeroką skalę szczepień profilaktycznych (czyli od roku 1984 do roku 1999). Stopniowo choroba zmieniała swój charakter z neuropatycznego na nefropatyczny. Przez wiele lat, do mniej więcej 2010 roku choroba nie stanowiła problemu klinicznego u prawidłowo zaszczepionych gołębi. Od kilku lat pojawiają się w Polsce przypadki choroby w stadach szczepionych, które zdają się wskazywać na introdukcję bardziej patogennych szczepów PPMV-1 (Szeleszczuk i wsp., 2016) lub pojawienie się szczepów atypowych (Śmietanka i Minta, 2011).

Z uwagi na dość znaczną rozbieżność pomiędzy powszechnością występowania PPMV-1 u gołębi przy stosunkowo niskim odsetku izolacji tego wariantu od innych gatunków ptactwa domowego, uzasadnione wydaje się postawienie pytania o faktyczną rolę wariantów PPMV-1 w epidemiologii u ptaków innych niż gołębie. Szczęśliwie od czasu wygaszenia ostatniego ogniska choroby Newcastle (Newcastle Disease - ND), czyli od 1974 roku Polska jest krajem wolnym od rzekomego pomoru drobiu. Zatem wyraźnie widać, że mimo wciąż istotnego w patologii gatunku problemu, jakim jest infekcja wariantem PPMV-1, gołębie nie odgrywają praktycznej roli w transmisji wirusa do populacji drobiu w naszym kraju.

Historycznie wrażliwość gołębi na zakażenie wirusem rzekomego pomoru drobiu poznano od momentu pojawienia się tej choroby w Europie. W przeszłości w diagnostyce gołębi używano do różnicowania dwóch ważnych pomorowych chorób kur – klasycznego (*Pestis gallinarum*) i rzekomego pomoru (*Pseudopestis gallinarum*). Gołębie były odporne na infekcję wirusem grypy i wrażliwe na zakażenie paramyksowirusem rzekomego pomoru. Zawsze też, przy każdej panzoozji ND u kur opisywano również przypadki zakażeń u gołębi.

Pojawienie się aktualnie trwającej panzootii PPMV-1 było największą katastrofą zdrowotną w znanej historii kolumbopatologii. Szacuje się, że choroba zmniejszyła populację najcenniejszych gołębi hodowlanych w Europie w okresie 1981 - 1985 o połowę. Wprowadzenie szczepień przeciwko paramyksowirozie stopniowo ograniczyło straty, jednak

wciąż choroba stanowi istotny problem zwłaszcza dla młodych gołębi. Przypomnieć należy, że obowiązek szczepienia gołębi pocztowych biorących udział w lotach przeciwko paramyksowirozie wynika wprost z uchwały Zarządu Głównego Polskiego Związku Hodowców Gołębi Poczтовых obowiązującej od 2012 roku.

Generalna, zasadniczo pozytywna uwaga, jaka nasuwa się po lekturze recenzowanej pracy doktorskiej Pani lek. wet. Moniki Olszewskiej-Tomczyk jest taka iż, doktorantka wykazała się niespotykanie rozległym wysoce wyspecjalizowanym warsztatem badawczym.

Jest oczywiste, iż osobiście, wybór tematu pracy doktorskiej uważam, za cenny i potrzebny zwłaszcza w aspekcie aktualnej sytuacji epidemiologicznej w populacji gołębi w kraju. Niewątpliwie podjęcie tak szeroko zakrojonych badań nad rzekomym pomorem drobiu, było możliwe dzięki wieloletnim pracom realizowanym od początku swojego istnienia, czyli od roku 1945, przez Zakład Chorób Drobiu, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, który był bezpośrednim następcą utworzonego w r. 1942 Pododdziału Chorób Drobiu (Geflügelgesundheitsdienst) zorganizowanego na wzór niemiecki na polecenie okupanta w czasie II wojny światowej, właśnie do zwalczania rzekomego pomoru drobiu. Mieścił się on w Wydziale Weterynarii Instytutu Naukowego Gospodarstwa Wiejskiego w Puławach i był kierowany przez przyszłego doc. dr Antoniego Teklińskiego, wówczas lekarza weterynarii (*Borzemska W.B. (Red.) Historia aviopatologii polskiej w latach 1942 -2001. Wyd. SGGW, Warszawa, 2002*).

Bez wątpienia zakażenie wariantem gołębiego wirusa rzekomego pomoru drobiu jest jednym z potencjalnych problemów zdrowotnych, dla intensywnej produkcji drobiarskiej i jednym z niezwykle istotnych problemów dla hodowli gołębi, stąd ważność podjętych przez Panią Doktor badań.

### **Ocena pracy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny praca doktorska „Ocena wrażliwości różnych gatunków drobiu na zakażenie wariantem gołębiem wirusa choroby Newcastle” 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 130 stronach uwzględniających 23 tabele, 21 rycin (w tym 7 kolorowych fotografii klinicznych i opisujących zmiany mikroskopowe) oraz podzielona jest na następujące rozdziały: wstęp, cel, materiał i metody, przebieg doświadczeń 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, mimo bardzo licznych usterek redakcyjnych, pozytywne i można stwierdzić, że recenzowana praca doktorska Pani lek. wet. Moniki Olszewskiej-Tomczyk 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 eksperymentalnym na ptakach i analizie uzyskanych wyników badań histopatologicznych. 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 nieścisłości i niezręczności językowych, które zaznaczono w tekście. Jako przykład można podać zdanie „jedno z największych zagrożeń dla hodowli ptactwa domowego”, które brzmi archaiczne, moim zdaniem winno ono brzmieć „jedno z największych zagrożeń dla chowu drobiu”. Niewłaściwe jest określenie „Jednodniowych kurcząt SPF”. Jednodniowe mogą być tylko pisklęta kurze SPF. Ponadto bardzo liczne literówki zaznaczono w tekście pracy.

Cytowane w pracy doktorskiej, wydawałoby się bardzo obszerne, piśmiennictwo zamykające się liczbą 169 publikacji jest w istocie wyborem wyselekcjonowanych pozycji literaturowych poświęconych PPMV-1. Dobór piśmiennictwa wskazuje na dojrzałość naukową i umiejętność wyboru bardzo bogatej w zakresie rzekomego pomoru drobiu literatury źródłowej. Podkreślić należy, że Autorka równie starannie wyselekcjonowała pozycje piśmiennictwa krajowego wybierając 18 najbardziej reprezentatywnych prac. W tej liczbie wszystkie najważniejsze prace z tego zakresu wykonane pod kierunkiem Profesora Krzysztofa Śmietanki w latach 2006 -2014. Nie uniknęła jednak pomyłek, wielokrotnie powołując się w tekście pracy na publikacje nieujęte w spisie piśmiennictwa. Wydaje się, że praktyczniej byłoby wyłączyć z zestawu cytowanego piśmiennictwa akty prawne (pozycje: 24,108,109,110,129). Autorka podaje, że „*ND u drobiu podlega obowiązkowi zgłaszania i zwalczania w krajach OIE (OIE 2013)*”, (str. 12, wiersz 7) zaś w bibliografii jest ta pozycja opisana, pod numerem 110 jako „OIE”. Podanie numeru w tekście ułatwiłoby odszukanie tego cytatu.

Z obowiązku recenzenta, omawiając listę publikacji odnotuję, że Autorka z trudnych do zrozumienia przyczyn, nie zdecydowała się na jednolity styl cytowania poszczególnych pozycji piśmiennictwa. W większości z nich niezbędne są korekty redakcyjne. Poprawienia wymaga

również cytowanie rozdziału z podręcznika „Choroby drobiu” pod redakcją Profesora Michała Mazurkiewicza (pozycja 97 w zestawieniu), winno mieć ono formę przyjętą dla cytowań rozdziałów w monografiach. Oczywiście pomyłką redakcyjną wydaje się być z kolei znajdujący się w pozycji 134 cytat z podręcznika „Avian immunology”.

Opiniowaną pracę doktorską rozpoczyna obszerny wstęp, obejmujący 22 strony, wprowadzający czytelnika w problematykę związaną z przebiegiem zakażenia wariantem gołębiem wirusa choroby Newcastle. Doktorantka w 17 podrozdziałach omawia w syntetycznej formie całość problematyki poczynając od historii choroby poprzez jej epidemiologię i zwalczanie. Po krótkim wprowadzeniu terminologicznym Pani Doktor przedstawia historię występowania wariantu gołębiego wirusa rzekomego pomoru drobiu w populacji gołębi na świecie i w Polsce. Jak pisze, cytując dr Denisa Alexandra (2011) „*należy odnotować, że liczba ognisk zgłaszanych w poszczególnych krajach nie oddaje w pełni rzeczywistej sytuacji epidemiologicznej zakażeń wirusem PPMV-1 w populacji gołębi, ponieważ rozpoznanie stawiane jest wyłącznie na podstawie przebiegu klinicznego*”. Przy tej okazji należy też odnotować, że przy wykonywaniu zestawień dotyczących chorób gołębi w naszym kraju, po roku 2005, w opisach pojawia się określenie „*niezdiagnozowane zaburzenia ze strony układu nerwowego*”, które częściej występowały w okresie maja - października. Co oczywiście jest krypto opisem paramyksowirozy. W podrozdziale 1.3. Autorka podaje nieliczne opisy naturalnych zakażeń PPMV-1 u drobiu. Ostatni z tych przypadków opisano w roku 2006 w Estonii. Czytelnikowi niezajmującemu się na co dzień wirusologią w kilku podrozdziałach przypomina budowę APMV-1. Dla zrozumienia wykonanych przez Doktorantkę badań szczególnie przydatne są podrozdziały 1.8. (molekularne podstawy zjadliwości) oraz 1.9. (cykl replikacyjny). Podrozdział 1.10. – odpowiedź immunologiczna, jest bardzo lapidarny i obejmuje opis zjawisk odpornościowych w przebiegu ND u kur, bowiem brak jest tych informacji w odniesieniu do gołębi. Jako patolog dość dobrze oceniam napisany przez Panią Doktor fragment wstępu poświęcony obrazowi klinicznemu i zmianom sekcyjnym i histopatologicznym w przebiegu zakażeń PPMV-1. W dalszych podrozdziałach: wstępu, podrozdział 1.14 sumuje wiedzę Doktorantki o diagnostyce zakażeń PPMV-1 i podrozdział 1.15 mówiący o zapobieganiu ND u gołębi, 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 terapie, które pozwalałyby przyczynowo leczyć rzekomy pomór drobiu o gołębi. Jest to oczywiście największy problem i wyzwanie, jakie stoi przed kolumbopatologami, które to wyzwanie, mimo wielu prób i badań nie zostało pomyślnie rozwiązane. Dwa ostatnie podrozdziały są bardzo ciekawe bowiem

interpretacją przepisy dotyczące algorytmu postępowania w przypadku wykrycia wirusa PPMV-1. Należy podkreślić, że stwierdzenie klinicznej postaci ND u gołębi nie zawsze oznacza wstrzymanie eksportu drobiu, zatem nie powinno to być przeszkodą przed zgłaszaniem przypadków choroby u gołębi. Wiedzę na ten temat należy szeroko rozprzestrzeniać w środowisku hodowców gołębi i lekarzy weterynarii, bowiem nie ulega wątpliwości, że konieczna jest rejestracja każdego przypadku zakażenia gołębi PPMV-1.

W mojej ocenie wstęp jest zwięzłą 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 ambitnym zamierzeniem Jej pracy jest: „ustalenie roli zakażeń gołębi *paramyksowirusa ptaków serotypu 1 w patologii drobiu*”. Ponieważ tak ogólne sformułowanie jest bardzo pojemne treściowo Doktorantka sformułowała pięć szczegółowych zadań których wykonanie spełni wcześniejszą deklarację czyli ustalenie roli PPMV-1 w patologii drobiu. Zadania te to:

- Określenie wpływu 6 krotnego pasażowania przez organizm kur na zmiany w genomie oraz zjadliwości PPMV-1,
- Kliniczna ocena efektu zakażenia PPMV-1 na organizm kur, indyków, gęsi, przepiórek i gołębi,
- Ocena poziomu i długości trwania siewstwa oraz dystrybucji narządowej wirusa PPMV-1,
- Ocena zmian histopatologicznych w zakażonych tkankach,
- Określenie wpływu infekcji PPMV-1 na parametry odpowiedzi nieswoistej u kur i gołębi.

Trzeba zdecydowanie podkreślić, że każdy z obszarów, które Doktorantka badała wymagał przeprowadzenia pracochłonnych eksperymentów i wyspecjalizowanego warsztatu badawczego na najwyższym poziomie, który w kraju jest dostępny jedynie w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach!

Ponieważ recenzowana praca jest wyjątkowo wielowątkowa, opis badań wymagał podania bardzo wielu protokołów, stąd zasadne było wydzielenie w rozdziale 3 dysertacji, opisującym materiał i metody zastosowane przez Doktorantkę, trzech odrębnych podrozdziałów. Opis metod zastosowanych przy realizacji zadania badawczego mającego na celu określenie zmian zachodzących w genomie oraz patogenności wirusa PPMV-1 w wyniku seryjnych pasażów przez organizm kur SPF Autorka przedstawiła w podrozdziale 3.1. Do badań modelowych użyto szczepu 332/05, który został wyizolowany w roku 2005 od chorych gołębi z Wielkopolski i charakteryzował się ICPI na poziomie 1,05 (według badań z 2006 roku) i następującą

sekwencją - <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup> - w miejscu podziału glikoproteiny F0. Doktorantka opisując przynależność szczepu 332/05/ do genogrupy 4b (typowych gołębic szczepów wariantowych) na podstawie analizy filogenetycznej wykonanej przez Śmietankę w 2007 roku, niestety w cytowanym spisie publikacji praca ta nie jest uwzględniona. Nie jest jednak wykluczone, że Autorka miała na myśli pracę: „*Phylogenetic studies of Polish APMV-1 strains*”, *Joint 13th Annual Meetings of the National Laboratories for AI and ND of European Union Member States, Stralsund, Germany, 23-25 May, 2007*”. W puli szczepów zbadanych przez Śmietankę i wsp.(139) znajdował się izolat PPMV-1/PL/AR6, który wydawał się być zdecydowanie bardziej patogeny (indeks ICPI wynoszący 1.27) i posiadał identyczną budowę „cleavage site”. Zakładać należy, że to właśnie analiza genów P, L potwierdziła wybór izolatu 332/05 a nie PPMV-1/PL/AR6 do wykonanych badań. Następnie przedstawiony jest szczegółowy opis pasażowania PPMV-1 na kurczętach SPF oraz metody badań genetycznych – konwencjonalnego testu reakcji polimeryzacji łańcuchowej z odwrotną transkrypcją oraz sekwencjonowanie tradycyjne i nowej generacji. W podrozdziale 3.2. Autorka podaje zasady przeprowadzania oceny przebiegu klinicznego zakażeń PPMV-1 (izolatem niepasażowanym i po pasażach) u wybranych gatunków drobiu z uwzględnieniem zmian anatomopatologicznych i histopatologicznych oraz intensywności siewstwa i rozmieszczenia wirusa w tkankach. W tym celu prowadzono codzienną obserwację kliniczną, a w 2, 4, 7, 10 i 14 dniu po zakażeniu od wszystkich ptaków pobierano wymazy z jamy dziobowo-gardłowej oraz kloaki. Ponadto od dwóch ptaków z każdej grupy zakażonej (padłych, chorych lub zdrowych i poddanych eutanazji, w zależności od gatunku i przebiegu zakażenia) pobierano narządy: mózg, płuca, nerki, wątrobę, śledzionę i dwunastnicę do badań real time RT-PCR i histopatologicznych. Zakażenie ptaków wirusem uzyskanym w następstwie pasażu na kurczętach zostało wykonane w dokładnie ten sam sposób. Dalej Doktorantka podaje bardzo szczegółowy opis wykonywanych badań molekularnych. Podanie opisu metod badań genetycznych w formie tabel ułatwia zapoznanie się ze szczegółami prowadzonych reakcji. Z zadowoleniem 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.

Z powodu braku komercyjnie dostępnych gołębi, indyków, gęsi i przepiórek o statusie wolnym od swoistych patogenów Autorka musiała pokonać kilka pułapek metodologicznych. Dostępne są krajowe wytyczne (Dolka B., Szeleszczuk P.: *Opracowanie parametrów do oceny zdrowia gołębi pocztowych i ozdobnych przeznaczonych do wykorzystania w badaniach eksperymentalnych. Mat. XIV Kongresu PTNW, Wrocław, 13-15 09,2012, str. 407*) podające wymagania, jakie powinny być spełnione w tym zakresie. Jak wynika z opisu i dokumentacji

fotograficznej użyte w tym eksperymencie ptaki to gołębie ozdobne, bowiem utrzymanie nieszczepionych przeciwko paramyksowirozie gołębi pocztowych jest nierealne. Wyjaśnienia wymaga też czy test ELISA (Idexx ND Ab, USA) jest przydatny do badania surowic gołębi?

Podrozdział 3.3. opisuje zupełnie odmienny zakres badań od wcześniej prowadzonych i obejmuje ocenę wybranych parametrów odpowiedzi nieswoistej w trakcie infekcji PPMV-1 u kurcząt i gołębi. Autorka przeprowadziła oznaczenie transkrypcyjnej ekspresji cytokin prozapalnych (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) oraz czynnika hamującego syntezę cytokin (IL-10). Oddziaływanie wirusa PPMV-1 ocenione na podstawie ekspresji cytokin na poziomie mRNA, wskazują na aktywację wrodzonych komponentów odpowiedzi immunologicznej zarówno u gołębi i kur. W tym eksperymencie użyto rocznych gołębi pocztowych. Należy podkreślić, że opisany panel przeprowadzonych badań diagnostycznych u tych ptaków mających wykluczyć zakażenia subkliniczne najważniejszymi patogenami gołębi wykonano według metodologii opisanej przez Stenzla i wsp. (2012) – brak jest jednak tej publikacji w zestawie piśmiennictwa – nie obejmuje on jednak oceny stopnia zakażenia ptaków chlamydiami. Infekcje tymi patogenami są powszechne i wykluczenie ich obecności przy badaniach nad opornością jest konieczne.

Należy podkreślić, że na przeprowadzenie wszystkich badań na zwierzętach Autorka uzyskała zgodę lokalnej komisji etycznej.

Rozdział „Wyniki” jest najobszerniejszym fragmentem ocenianej pracy (32 strony) i bardzo zróżnicowanym pod względem formy, ale poprawnie prezentującym dokonania Doktorantki. Zgrupowanie wyników w trzech podrozdziałach ułatwia śledzenie uzyskanych danych. Pierwsze dwa podrozdziały przedstawiają informacje o zmianach w genomie oraz patogenności wirusa PPMV1 w wyniku seryjnych pasażów przez organizm kur SPF. W pierwszym etapie pracy określono zmiany zachodzące w genomie oraz patogenności wirusa PPMV-1 w wyniku seryjnych pasażów przez organizm kur SPF. Autorka przeprowadziła sześć pasażów uzyskując wzrost patogenności wyrażony wzrostem indeksu domózgowej zjadliwości (ICPI) dla jednodniowych piskląt kurzych SPF. Wartość indeksu ICPI wyniosła dla wirusa niepasażowanego (izolat 332/05) 1,27, a dla pasażowanego 1,4. Na podstawie wyników otrzymanych metodą sekwencjonowania następnej generacji przeprowadzono analizę wariantów wirusa przed i po pasażach. Stwierdzono mutacje prowadzące do zmiany aminokwasu w 11 miejscach genomu wirusa pasażowanego. Nagromadzone zmiany nukleotydowe zwłaszcza w obrębie cząsteczki kompleksu replikacyjnego mogły wpłynąć na wzrost patogenności w badaniu *in vivo*. Jest oryginalnym osiągnięciem Pani Dr Olszewskiej - Tomczyk sporządzenie mapy genowej izolatu 332/05/0 i 332/05/6, brak było dotychczas takich



danych w krajowym piśmiennictwie. W przeprowadzonych badaniach porównawczych struktury materiału genetycznego izolatu wyjściowego i wirusa po przeprowadzeniu sześciu pasażów przez organizm kur stwierdzono 39 zmian nukleotydowych o charakterze mutacji punktowych obecnych nie tylko w sekwencji kodującej wirusowe białka, ale i w części niekodującej genomu. Niewątpliwie Doktorantka zgromadziła dużą ilość oryginalnych informacji, rzucających nowe światło na mechanizm wzrastania patogenności PPMV-1 podczas pasażowania przez organizm wrażliwych kur. Przeniesienie wyników tych badań na warunki terenowe, gdzie większość ptaków posiada swoiste przeciwciała, może być jednak trudne. W kolejnym etapie zakażono eksperymentalnie kury, indyki, przepiórki, gęsi i gołębie wirusem PPMV-1 niepasażowanym i pasażowanym. Prowadzono codzienną obserwację kliniczną, a w 2, 4, 7, 10 i 14 dniu po zakażeniu (d.p.i) od wszystkich ptaków pobierano wymazy z jamy dziobowo-gardłowej oraz kloaki. Ponadto od dwóch ptaków z każdej grupy zakażonej (padłych, chorych lub zdrowych i poddanych eutanazji, w zależności od gatunku i przebiegu zakażenia) pobierano narządy: mózg, płuca, nerki, wątrobę, śledzionę i dwunastnicę do badań real time RT-PCR i histopatologicznych. Przeprowadzone badania potwierdzają, że naturalnym gospodarzem dla wirusów PPMV-1 są gołębie, gdyż tylko u tego gatunku stwierdzono występowanie objawów klinicznych i śmiertelności, podczas gdy u pozostałych badanych ptaków przebieg był bezobjawowy, bez względu na to czy wirus użyty w doświadczeniu był wcześniej pasażowany, czy użyty w formie natywnej. W odniesieniu do poziomu replikacji i siewstwa mierzonego metodą real time RT-PCR wykazano różnice, które były dość istotne. Dotyczy to w głównej mierze indyków, u których wyższe wartości stwierdzono w odniesieniu do wirusa pasażowanego. Podobne wyniki wykazano w przypadku przepiórek i gęsi, gdzie efektem zakażenia wirusem niepasażowanym odnotowano niewielką liczbę replikacji, podczas gdy w odniesieniu do wirusa pasażowanego materiał genetyczny PPMV-1 był wykrywalny od 4-14 d.p.i.

Jak wynika z danych sumarycznych zestawionych w tabeli 18, tylko gołębie wykazywały objawy kliniczne po infekcji wirusem wyjściowym, jak i pasażowanym. Wśród objawów klinicznych Pani Doktor obserwowała „*objawy nerwowe w postaci drżeń skrzydeł i zaburzeń koordynacji ruchowej oraz lekkiej wodnistej biegunki*”. Jest raczej pewne, że w tym przypadku wystąpił wielomocz (*poliuria*) (w przebiegu paramyksowirozy nie stwierdza się bowiem znaczących zmian w jelitach).

W tym miejscu pracy pojawia się bardzo interesująca informacja o wynikach badań nad poziomem i długością siewstwa u poszczególnych gatunków ptaków zakażeniu wirusem 332/05/0 i 332/05/6 oraz rozmieszczenie wirusa w narządach. Jest ciekawe, że nie wykazano

siewstwa w próbkach pochodzących od kurcząt kontaktowych umieszczonych w klatce z ptakami zakażonymi wirusem 332/05/6. Jak wiele różnorodnych obserwacji przeprowadziła doktorantka może potwierdzać stojący na wysokim poziomie rozdział poświęcony zmianom histopatologicznym. Zakres wykonanych badań i szczegółowość profesjonalnego opisu zasługują na uznanie. Przeprowadzona przez doktorantkę mikroskopowa analiza zmian patomorfologicznych w zakażonych tkankach nie wykazała różnic w zależności od formy wirusa użytego w doświadczeniu. Wykazano zwiększony tropizm użytego szczepu PPMV-1 do układu nerwowego, oddechowego oraz moczowego u gołębi oraz pneumotropizm i nefrotropizm do organizmu kur i indyków. Jest również ciekawe, że zmiany sekcyjne u gołębi, które obejmowały zmianę konsystencji tkanki płucnej na miejscowo włóknistą z niewielkimi ogniskami zwłóknienia oraz obecność złogów włókniaka na powierzchni tkanki płucnej oraz w trzustce ogniska pasmowatych przekrwień były przez recenzenta obserwowane u młodych gołębi padłych z powodu paramyksowirozy. Zwłaszcza typowe i niekiedy zdecydowanie bardziej nasilone były zmiany w trzustce.

Zupełnie inny obszar wiedzy obejmuje podrozdział 4.3. sumujący wyniki analiz ekspresji cytokin na poziomie transkrypcyjnym w wybranych narządach kurcząt i gołębi po zakażeniu PPMV-1. Autorka wykazała odmienny profil ekspresji wszystkich badanych cytokin w poszczególnych narządach zakażonych gołębi względem grupy kontrolnej oraz kurcząt w tym samym układzie doświadczalnym, który może wyjaśnić zakres i charakter zmian patologicznych stwierdzanych w badaniu mikroskopowym. Jest to bardzo nowatorska i w części oryginalna część dysertacji.

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 (choć nie powinny się one zdarzyć) usterkami (brak w zestawieniu cytowanych prac) Doktorantka sprawnie konfrontuje własne wyniki badań wykazując się sporą wiedzą na temat dotychczas wykonanych prac. Można odnieść wrażenie, że podobne prace były realizowane w tym samym czasie co badania doktorantki co dodatkowo wskazuje na ich aktualność.

Rozdział „Wnioski” – ten bardzo istotny element pracy doktorskiej, jest bardzo często krytykowany przez recenzentów, choć w przypadku wniosków wyciągniętych przez Panią lek. wet. Monikę Olszewską -Tomczyk można stwierdzić, że są one klasycznie akademickie i zasadniczo poprawne! Uzyskane wyniki badań oraz ich analiza upoważniły Autorkę do wyciągnięcia, aż sześciu wniosków powiązanych z celami, jakie doktorantka postawiła sobie

do rozwiązania rozpoczynając badania.

Wniosek pierwszy informuje czytelnika, że *„Pasażowanie szczepu PPMV-1 prowadzi do zwiększonej zjadliwości wirusa, wyrażonej wzrostem indeksu domózgowej zjadliwości dla jednodniowych kurzych piskląt SPF”*. Wniosek ten potwierdza dane innych autorów, bowiem już ponad 30 lat temu stwierdzono tę prawidłowość. Molekularny mechanizm nabywania zjadliwości wirusów PPMV-1 dla drobiu grzebiącego na skutek kilkukrotnego pasażu został opisany przed kilku laty jako pojawienie się mutacji punktowych w obrębie genów odpowiedzialnych za kodowanie białek biorących udział w replikacji, ale w badaniach Doktorantki uzyskał mocne potwierdzenie.

Wniosek drugi stwierdza, że *„Na podstawie analizy form wariantowych wirusa („quasispecies”) po pasażach stwierdzono zmiany nukleotydowe w obrębie cząsteczki rybonukleokapsydu (RNP), które mogą być odpowiedzialne za podwyższoną wirulencję*. Jak podkreśla sama Autorka dalszego wyjaśnienia wymaga sprawdzenie czy i w jakim stopniu stwierdzone zmiany wpływają na stwierdzony wzrost zjadliwości. Jest istotną wartością pracy doktorskiej Pani Dr Moniki Olszewskiej-Tomczyk, że próbowała odpowiedzieć na to pytanie w serii bardzo pracochłonnych i warsztatowo trudnych doświadczeń *in vivo*, jak i w pogłębionych badaniach molekularnych. Wniosek ten opisuje ważne osiągnięcie Doktorantki bowiem w dotychczasowych badaniach nie podejmowano eksperymentalnego zakażenia gołębi szczepami PPMV-1 w formie natywnej i o zwiększonej wirulencji po pasażach przez organizm kur.

Wniosek podsumowujący badania w zakresie eksperymentalnego zakażenia kur, indyków, przepiórek, gęsi i gołębi wirusem PPMV-1 niepasażowanym i pasażowanym (wniosek trzeci) stwierdza, że : *„Biorąc pod uwagę charakter występujących objawów klinicznych oraz zmian anatomopatologicznych w przebiegu eksperymentalnego zakażenia szczepem PPMV-1/332/05 u kur, indyków, gęsi i przepiórek można stwierdzić dużą oporność wrodzoną na zakażenie PPMV-1 tych gatunków ptaków”*. To stwierdzenie koresponduje z wynikami badań innych autorów które potwierdzają, że ryzyko wywołania objawów klinicznych i upadków po zakażeniu drogami zbliżonymi do naturalnych (donosowo/dospojówkowo) PPMV-1 ptaków starszych niż trzy tygodniowe jest niewielkie.

Ciekawy i w pełni oryginalny jest wniosek czwarty w którym Autorka stwierdza, że: *”W eksperymentalnym zakażeniu indyków, przepiórek i gęsi wirusem uzyskanym po pasażach na kurach wykazano zwiększenie efektywności replikacji patogenu, co wskazuje na wzrost potencjału adaptacji.”* Na podstawie wyników przeprowadzonych w tym zakresie badań w oparciu o następujące kryteria: objawy kliniczne (manifestacja kliniczna?) czas trwania i

stopień siewstwa z jamy dziobowo-gardłowej i kloaki, rozmieszczenie i ilość wirusa w różnych narządach oraz przekazywanie zakażeń do ptaków kontaktowych wyrażające efektywność transmisji. Autorka podzieliła badane gatunki ptaków na trzy grupy:

I. Gołębie – silnie wyrażone objawy kliniczne, śmiertelność, wysoki stopień replikacji wirusa w narządach, transmisja wirusa do ptaków (gołębi) kontaktowych;

II. Kury i indyki – brak objawów klinicznych i śmiertelności, niewielkiego stopnia replikacja wirusa w narządach i transmisja wirusa do ptaków kontaktowych

III. Przepiórki i gęsi - brak objawów klinicznych i śmiertelności, jednak wykazana replikacja wirusa w tkankach oraz brak transmisji wirusa do ptaków kontaktowych.

Jest to jeden z najbardziej cennych wniosków (dobrze udokumentowanych) wynikających z przeprowadzonych eksperymentów.

Dwa ostatnie wnioski wynikają z badań nad mechanizmami oporności u zakażonych PPMV-1 gołębi i kur. Autorka stwierdza, że *„Oddziaływanie wirusa PPMV-1 ocenione na podstawie ekspresji cytokin na poziomie mRNA, wskazuje na aktywację nieswoistych komponentów odpowiedzi immunologicznej u gołębi i kur (wniosek 5) oraz, że (wniosek 6) „Zwiększona aktywność makrofagowa w poszczególnych narządach, wykazana wzrostem ekspresji transkrypcyjnej cytokin oraz badaniem histopatologicznym, może prowadzić do zwiększenia wrażliwości na wtórne infekcje wirusowe oraz efektywność prowadzonych szczepień.”*

Badania obejmujące ten dział immunologii zakażeń PPMV-1 u ptaków mają bardzo ważne znaczenie i tylko kilka prac było im poświęcone. Podobne badania prowadzili równolegle Dan Xiang i wsp. (2015) wskazując na potencjalne możliwości terapeutyczne, stosowania moderatorów odpowiedzi nieswoistej. Badania w tym zakresie stwarzają duże potencjalne możliwości terapii zakażeń wirusowych, nie tylko w medycynie, ale i weterynarii. Wyniki prac eksperymentalnych zaprezentowane przez Doktorantkę stanowią bardzo ciekawy punkt wyjścia do dalszych badań w tym zakresie.

Po bardzo krytycznej analizie opracowania, z nadzieją, że uwagi i sugestie pomogą Autorce w poprawieniu dysertacji przy jej publikacji, stwierdzam, iż Pani lek. wet. Monika Olszewska-Tomczyk 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 lek. wet. Moniki Olszewskiej-Tomczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

KIEROWNIK KATEDRY

/ Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk /