

Wrocław, 6 grudnia 2016 r.

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

### Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Anny Jacukowicz pt. „*Ocena występowania i charakterystyka molekularna astrowirusów w populacji drobiu grzebiącego w Polsce*” wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Zenona Minty oraz dr hab. Katarzyny Domańskiej-Blicharz, prof. nadzw.

Recenzję wykonano realizując uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętą w dniu 30 listopada 2011 r., na podstawie maszynopisu pracy przesłanego przez przewodniczącego Komisji Doktorskiej, prof. dr hab. Dariusza Bednarka.

Intensywna produkcja drobiu, szczególnie kurecząt rzeźnych i indyków niesie ze sobą ryzyko występowania problemów zdrowotnych związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem wielu narządów, często skutkujących pojawianiem się zespołów chorobowych. W ostatnich latach notujemy wzrost zaburzeń funkcjonowania przewodu pokarmowego u ptaków. Obserwujemy brak integralności jelit, mówimy o enteropatiach, które są obecnie uznane za jedną z istotniejszych przyczyn strat ekonomicznych w przemyśle drobiarskim. Mogą one być powodowane przez wiele czynników, zarówno tła niezakaźnego jak też zakaźnego. Poznanie tych ostatnich, szczególnie tła wirusowego, w tym zakażeń astrowirusowych było możliwe dzięki wdrożeniu do weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej metod biologii molekularnej. Duże zasługi w zakresie doskonalenia tych metod i wprowadzaniu ich do weterynaryjnej diagnostyki posiada zespół Pana Profesora Zenona Minty. Widzę również istotny wkład Doktorantki, mgr Anny Jacukowicz, której badania nad astrowirusami ptaków, wykonane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej są nowatorskie i ważne w nauce i praktyce weterynaryjnej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska poświęcona występowaniu w populacji drobiu grzebiącego astrowirusów oraz charakterystyce molekularnej krajowych izolatów to pierwsze i jedyne tak obszerne, poparte rzetelnymi badaniami opracowanie. Gratuluję

*prof. zw. dr hab. Alina Wieliczko- Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Jacukowicz pt.: „Ocena występowania i charakterystyka molekularna astrowirusów w populacji drobiu grzebiącego w Polsce”*

doktorantce i opiekunom naukowym podjęcia tak ważnego tematu, który pomimo sygnalizowanych problemów przez terenowych lekarzy weterynarii długo pozostawał poza obszarem zainteresowań (czy też poza możliwościami diagnostycznymi) wielu ośrodków naukowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod względem redakcyjnym wykonana jest starannie i obejmuje 100 stron. Praca ma budowę klasyczną, składa się z opracowania właściwego obejmującego: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję i wnioski, a następnie streszczenia w języku polskim i angielskim. Bibliografia zawiera 129 pozycji dobrze dobranego i wykorzystanego piśmiennictwa angielsko – i polskojęzycznego. Wyniki zilustrowano 21 rycinami oraz 20 tabelami.

Wstęp pracy został zredagowany rzetelnie i dowodzi o dobrym przygotowaniu doktorantki do samodzielnej pracy naukowej oraz o Jej pełnym rozeznaniu w wybranym temacie badawczym. W tym rozdziale Autorka przedstawiła aktualne informacje związane z tematem pracy, w tym najnowszą taksonomię astrowirusów. Wstęp przybliży też czytelnikowi charakterystykę zakażeń wywołanych przez astrowirusy a także możliwości diagnostyczne, zwalczanie i zapobieganie. Dotychczasowa wiedza dostępna w krajowym piśmiennictwie na temat astrowirusów jest niepełna i fragmentaryczna, stąd rzetelnie opracowany wstęp, oparty na przeglądzie piśmiennictwa i wynikach dotychczasowych badań prowadzonych na świecie stanowi dobrą motywację i podstawę podjęcia decyzji do realizacji własnych badań.

**Zasadniczym celem badań**, których wyniki są prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej było:

1. Opracowanie metod wykrywania i różnicowania szczepów astrowirusów oraz charakterystyka molekularna krajowych izolatów astrowirusów;
2. Ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania zakażeń astrowirusami w krajowej populacji drobiu grzebiącego oraz określenie roli tych zakażeń w wywoływaniu stanów patologicznych jelit u drobiu.

Autorka przemyślała i dobrze zaplanowała badania i doświadczenia, które realizowała w następujących etapach:

- pierwszy dotyczył wdrożenia molekularnych metod wykrywania i różnicowania astrowirusów na poszczególne typy: TAstV-1, TAstV-2, CAstV, ANV;
- w drugim realizowano badania związane z oceną sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania astrowirusów u kur i indyków w kraju.
- kolejny etap to określenie taksonomii zidentyfikowanych krajowych izolatów AstV w oparciu o fragmenty ORF1b (wcześniejsza klasyfikacja *Astroviridae*) oraz ORF2 (obowiązująca klasyfikacja *Astroviridae*);

- ostatni etap dotyczył analizy filogenetycznej polskich izolatów AstV w oparciu o fragment genu wirusowej polimerazy (RdRp) fragmentu genu kapsydu.

Aby zrealizować cel Autorka wykorzystwała materiał (próbki pobierane w terenie/na fermach drobiu w oparciu o przygotowany kwestionariusz/ oraz wiele metod badawczych, opisany szczegółowo i przejrzysto na 16 stronach maszynopisu w rozdziale „Materiał i metody”. Zostały one dobrze przemyślane, były adekwatne do założonego planu badań, wykonane rzetelnie zgodnie z najlepszą sztuką laboratoryjną, z użyciem dobrego sprzętu aparaturowego i są wystarczające do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych. Należy podkreślić dużą staranność włożoną w pozyskanie materiału terenowego do badań epidemiologicznych. Był to materiał bogaty również liczbowo (na przestrzeni 6 lat przebadano 293 stada indyków oraz 114 stada kur w okresie 3 lat, stada kur i indyków zlokalizowane były na terenie całego kraju). Fakt podjęcia się przez doktorantkę opracowania i wdrożenia molekularnych metod służących do wykrywania i różnicowania na poszczególne typy astrowirusów, przy braku możliwości skorzystania z „komercyjnej” kontroli pozytywnej (przynajmniej na początku), czy konieczności dokładnej optymalizacji i walidowania warunków reakcji RT-PCR i RT-PCR w czasie rzeczywistym (rRT-PCR) świadczą, że Autorka dobrze opanowała zaawansowane techniki biologii molekularnej. Na podkreślenie zasługuje również uporządkowane i czytelne przedstawienie przebiegu realizowanych zadań badawczych. Uznaję, że metody badawcze zastosowane przy realizacji rozprawy doktorskiej zostały dobrze dobrane i posłużyły do precyzyjnego wykonania postawionych celów badawczych.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stosując m. innymi: test  $\chi^2$ , test istotności dla różnicy dwu frakcji oraz współczynnik Cohena kappa ( $\kappa$ ). Metody statystyczne wybrane przez autorkę są właściwe i wystarczające do opracowania i przedstawienia uzyskanych wyników.

Wyniki zostały przedstawione w formie pisemnej oraz graficznej. Ten rozdział opracowany na 32 stronach maszynopisu, wzbogacony został 18 rycinami i 11 tabelami wkomponowanymi w tekst, co poprawia czytelność i ułatwia interpretację. Analiza uzyskanych wyników jest szczegółowa i uwzględnia wszystkie etapy badań oraz realizowane zadania.

Do istotnych osiągnięć Doktorantki przedstawionych w wynikach, mających znaczenie aplikacyjne i praktyczne a wynikających z wykonanych badań zaliczam:

- wdrożenie czułej i specyficznej metody konwencjonalnej RT-PCR wg. Tang i wsp. do wykrywania wszystkich astrowirusów, mimo ich dużego zróżnicowania genetycznego;
- dokonanie oceny sytuacji epidemiologicznej w zakresie zakażenia astrowirusami krajowej populacji indyków i kur. W tym zakresie wykazała znacząco większe występowanie zakażeń w stadach indyków (48,8%) niż w stadach kur (8,8%). Ponadto wykorzystując metody RT-PCR (konwencjonalne i w czasie rzeczywistym) wykazała, że w stadach indyków dominowały zakażenia astrowirusami indyczymi typu TAstV-2 (65%), rzadziej zaś typ TAstV-1 (18,8%). Wykazała też zależność wiekową zakażeń diagnozowanych w stadach indyków;
- pierwsze w kraju wykrycie zakażenia indyków wirusem zapalenia nerek (ANV);
- wykazanie występowania w stadach kur poza astrowirusem kurzym (CAstV) i wirusem zapalenia nerek (ANV) także astrowirusa indyczego - typ TAstV-1. Jest to drugi przypadek stwierdzony w świecie.

Kolejne osiągnięcia autorki dotyczą charakterystyki molekularnej terenowych szczepów astrowirusów dokonanej w oparciu o analizę filogenetyczną fragmentu genu wirusowej polimerazy (RdRp) oraz analizy filogenetycznej fragmentu genu kapsydu. W tym zakresie mgr Anna Jacukowicz wykazała, że:

- astrowirusy wykryte u indyków należą do gatunku *Avastrovirus 3*, mimo ich dużego zróżnicowania genetycznego, szczególnie wśród typu TAstV-2, z kolei izolaty od kur znalazły się w grupie wirusów, które nie zostały uwzględnione w dotychczasowej klasyfikacji astrowirusów.

W rozdziale Dyskusja (13 stron) Autorka dokonała analizy uzyskanych wyników w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów dowodząc zarówno dobrej znajomości badanej problematyki, jak i umiejętności weryfikacji wyników własnych badań z wynikami prezentowanymi w piśmiennictwie światowym. W mojej ocenie zadanie to nie było łatwe, bowiem zakażenia astrowirusami u drobiu to temat nowy, tak dla awipatologów jak też biotechnologów czy mikrobiologów. W ostatnich latach zmieniała się nie tylko klasyfikacja astrowirusów ale też epidemiologia zakażeń. Obserwowane w stadach drobiu zakażenia miały (i mają) różny przebieg kliniczny, astrowirusy stwierdzane były nie tylko w stadach problematycznych (np. z eteropatiami) ale też w stadach „klinicznie zdrowych”, zaś metody molekularne wykorzystane do charakterystyki dopiero weryfikowano i doskonalono. Te

wszystkie aspekty uwzględnione w dyskusji świadczą o znajomości tematu i dojrzałości naukowej Autorki.

Na zakończenie Autorka przedstawia 8 w pełni uprawnionych wniosków dowodzących osiągnięcia zaplanowanego celu badań.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na pewne nieścisłości w pracy, które wymagają poprawy. I tak:

#### Spis treści

– str. 4: wątpliwość recenzenta budzi prawidłowość zapisu poz. IX jako „Figury str. 91”), podczas gdy str. 91 to załącznik 1 i jest to tabela przedstawiająca szczepy referencyjne użyte do analizy filogenetycznej.

#### Wstęp

- we wstępie są dwie ryciny (nr 1 oraz nr 2) – nie ma informacji czyjego są autorstwa;  
- str. 16: akapit. 1.4.3 – patogeniza zakażeń AstV jest: „wykazało obecność patogenu w górnym odcinku jelita cienkiego”- jelito cienkie u ptaków to: dwunastnica, jelito czcze i biodrowe. Lepiej użyć prawidłowej nazwy anatomicznej;

- str. 21: Tang i wsp. skonstruowali dwa testy – brak podanej pozycji piśmiennictwa (a w wykazie piśmiennictwa mamy Tang i wsp. – 2x, a więc która z nich jest cytowana?);

str. 22 jest "Chicken hepatocellular carcinoma cell line", powinno być "Chicken hepatocellular carcinoma cell line";

str. 22 oraz inne strony: jest "Salmonella spp., Campylobacter spp.- „spp” nie piszemy kursywą  
Cel pracy

Zdaniem recenzenta akapit pierwszy jest zbędny, stanowi powtórzenie ze wstępu. Cel pracy powinien rozpoczynać się od zdania: „w celu poznania sytuacji.... I dalej bez zmian” . Krótki, ale merytoryczny.

#### Materiał i metody

Nie mam uwag merytorycznych.

#### Wyniki

Czasami brak doprecyzowania opisu wyników (kryteria wyboru prób do kolejnych etapów badań) , np. na stronie 42 autorka pisze „Spośród 293 stad indyków poddanych badaniu w okresie 6 lat (tj. 2008-2013), obecność materiału genetycznego astrowirusa stwierdzono w 143 stadach, co stanowiło 48,8% badanych próbek”, zaś na stronie 47 czytamy:” próbki z lat 2008-2012, w których zidentyfikowano AstV przebadano w kolejnych trzech reakcjach mających na celu określenie przynależności do typu .....” . Autorka nie podała informacji, dlaczego nie wybrała do tej identyfikacji izolatów z 2013 roku (jak wynika z tab. 1 było ich aż 26 z 44 stad), stąd na str. 48 czytamy: „Spośród 249 przebadanych stad indycznych z lat 2008-2012, w 117 (47,0%) stwierdzono obecność genomu astrowirusa (tab. 14). Próbki z tych stad poddano kolejnym badaniom mającym na celu określenie przynależności wykrytego wirusa do typu TAsV-1/TAsV-2/ANV. TAsV-1 zidentyfikowano w .....” . Nie znalazłam informacji dlaczego do określenia typu zidentyfikowanego AstV metodami PCR wybrano tylko próbki z lat 2008-2012 (w tych wynikach nie uwzględniono 44 ferm badanych w 2013 r. (tutaj też było 26 ferm pozytywnych). ???). Dla czytelności omawianych wyników warto taką informację podać, tym bardziej, że te wszystkie próbki z 117 stad dodatnich poddano następnie typowaniu przez sekwencjonowanie (wyniki tab. 16);

- na str. 55 Autorka podaje już kryterium wyboru szczepów do analizy filogenetycznej fragmentu genu wirusowej polimerazy (RdRp),

Dyskusja:

- str. 74: jest „pogłowie drobiu kurzego” – to mało precyzyjne: kurcząt rzeźnych ?, kur niosek, razem??;

- str. 77 jest „grupowały pod względem...”- grupowały się”

– str. 78 jest „wśród polskich astrowirusach”; i dalej brak piśmiennictwa do cytowanej Chorwacji (poz. 17 dotyczy tylko Sri Lanki);

- warto również w dyskusji (str. 84) zacytować pracę: Awe OO Kang KI, Ibrahim M, Ali A, Elaish M, Saif YM, Lee CW. Age-Related Susceptibility of Turkeys to Enteric Viruses. Avian Dis. 2015 Jun;59(2):207-12.

Wnioski

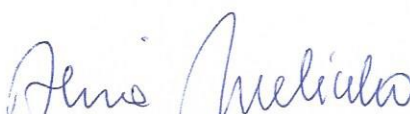
Proponuję wniosek nr 8 zapisać jako nr 3: jest on związany z wnioskiem nr 2, dotyczy epidemiologii zakażeń.

Przedstawione w recenzji powyższe uwagi w niczym nie umniejszają zasadniczej wartości pracy.

Podsumowując, recenzowana dysertacja doktorska mgr Anny Jacukowicz stanowi oryginalne opracowanie, bardzo wartościowe pod względem poznawczym jak i praktycznym. Dysertacja jest pierwszą pracą przedstawiającą obszerne i dobrze udokumentowane badania dotyczące epidemiologii i charakterystyki molekularnej krajowych astrowirusów wyizolowanych od indyków i kur, przez co wpisuje się w trend światowych badań molekularnych nad zakażeniami wirusowymi u drobiu. Zawiera elementy nowatorskie, została wykonana metodycznie poprawnie a uzyskane wyniki mogą mieć duże znaczenie praktyczne w ochronie zdrowia ptaków. Na uwagę zasługuje ogrom włożonej pracy w realizację wszystkich badań oraz duża wiedza i umiejętności posługiwania się nią.

Recenzowana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, w związku z tym przedkładam Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Anny Jacukowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy stawiam wniosek o jej wyróżnienie.

  
Prof. zw. dr hab. Alina Wieliczko