

Gdańsk, 26 października 2018

Dr hab. Magdalena Remisiewicz
Stacja Badania Wędrówek Ptaków
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
e-mail: magdalena.remisiewicz@biol.ug.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Styś-Fijoł

pt." Ptaki dzikie jako źródło wybranych zakażeń wirusowych dla drobiu"

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została przygotowana przez mgr Natalię Natalii Styś-Fijoł w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, pod kierunkiem dr hab. Wojciecha Kozdrunia, prof. nadzwyczajnego, przy współpracy z promotorem pomocniczym dr Wojciechem Rożkiem.

Ocena formalna pracy

Rozprawa stanowi zwartą pracę w języku polskim, o objętości 160 stron, składająca się łącznie z 9 rozdziałów, w klasycznym układzie pracy naukowej. Po spisie treści, przed Wstępem, autorka zamieściła wykaz skrótów stosowanych w pracy, co znacznie ułatwiło dalsze zrozumienie treści. Na końcu rozprawy znajduje się jednostronicowe podsumowanie w języku polskim (rozdział 7), kolejny to streszczenie w języku angielskim (rozdział 8). Praca zawiera 47 kolorowych rycin oraz 25 tabel, oraz obszerny spis literatury (rozdział 9) zawierający 174 pozycje. Wśród cytowanych prac znalazł się szeroki przekrój literatury dotyczącej tematyki rozprawy, od publikacji z lat 1970-tych po te najbardziej aktualne z lat 2017-2018. Praca jest napisana poprawnym i ciekawym językiem, dobrze się czyta, jest też starannie zredagowana, a cytowania tabel, rycin i pozycji literatury są poprawne.

Ocena merytoryczna pracy

We Wstępie, liczącym 27 stron, autorka przedstawia spektrum reowirusów ptasich (ARV), cirkowirusów, a szczególnie cirkowirusa gęsi (GoCV), oraz polyomawirusów powodujących choroby drobiu hodowlanego, ich budowę, mechanizmy działania oraz wywoływane przez nie choroby, a także obecny, jak się okazuje, ograniczony stan wiedzy na temat ich występowania u dzikich ptaków. Na podkreślenie zasługuje jasny, przystępny i ciekawy sposób przedstawienia tych informacji.

Podjęta przez autorkę tematyka badań ma ważny aspekt praktyczny, ze względu na choroby drobiu powodowane przez reowirusy, które powodują znaczne straty w hodowlach. Tak podjęte badania mają ważne znaczenie ekonomiczne, tym bardziej że, jak autorka stwierdza we Wstępie, w Polsce produkcja mięsa z drobiu w ostatnich latach wzrosła bardziej niż w innych krajach Unii Europejskiej. Ponieważ drób hodowlany, szczególnie wodny (kaczki, gęsi) może być narażony na zakażenia wirusami od ptaków dzikich, autorka zdecydowała się na określenie sytuacji w Polsce pod względem zakażeń wybranymi grupami wirusów u wolno żyjących ptaków. Zagadnienie to do tej pory było słabo przedstawiane w literaturze. Wychodząc z tych przesłanek, uważam wybór tematu pracy doktorskiej za trafny i celowy, zarówno z naukowego, jak i z praktycznego punktu widzenia. Dla opracowania tego ważnego tematu autorka postawiła sobie za główny cel pracy poznanie sytuacji w Polsce pod względem oceny występowania u dzikich ptaków zakażeń reowirusami ptasimi (ARV), cirkowirusami gęsi (GoCV), oraz polyomawirusem gęsi (GHPV), stwierdzanymi u drobiu w Polsce i za granicą. Dla osiągnięcia tego głównego celu, autorka podjęła się wykonania kolejnych celów szczegółowych, w tym wdrożenia istniejących metod laboratoryjnych używanych do wykrywania materiału genetycznego reowirusów u drobiu, do analizy materiału od ptaków dzikich, oraz porównawczej analizy filogenetycznej szczepów wirusów uzyskanych od ptaków dzikich i tych wykrytych u drobiu w Polsce i w innych krajach.

Materiał i Metody zostały przedstawione na 17 stronach, dobrze ilustrowanych tabelami i wykresami. Dobór materiału od dzikich ptaków oceniam bardzo dobrze, biorąc pod uwagę ograniczenia związane z trudnością pozyskania martwych osobników wolno żyjących ptaków. Te ograniczenia zawężają możliwość uzyskania materiału tylko do tych gatunków ptaków które są reprezentowane w badaniach dzikich ptaków i akurat zdarzyły się przypadki ich śmiertelności. Stąd zrozumiałe ograniczenie materiału dla części gatunków do jednego lub kilku osobników, oraz brak reprezentacji niektórych grup systematycznych dzikich ptaków, z których nie było możliwe uzyskanie martwych osobników do analizy. Jednak należy podkreślić, że autorka i jej promotorzy nawiązali zebrali materiał korzystając z pomocy różnych instytucji i osób indywidualnych, którzy przy okazji badania lub rehabilitacji dzikich ptaków mogli dostarczyć prób pochodzących od szerokiego spektrum grup systematycznych i ekologicznych, od ptaków drapieżnych, przez ptaki wodne i wodno-błotne, po drobne ptaki wróblowe. Na uwagę zasługuje fakt, że autorka przeanalizowała nie tylko próby od gatunków wodnych, u których na podstawie literatury można było się spodziewać badanych wirusów, ale też od ptaków lądowych, o których infekcjach niewiele wiadomo. Miło mi stwierdzić że znaczna część materiału pochodziła z reprezentowanej przeze mnie Stacji Badania Wędrówek Ptaków Uniwersytetu Gdańskiego, i cieszę się że nasze badania wędrownych ptaków zyskały dodatkowy aspekt w postaci badań wirusologicznych i epidemiologicznych. Zastosowane metody laboratoryjne są jasno i czytelnie przedstawione, z podaniem wszystkich szczegółów mieszanin reakcyjnych, warunków reakcji, sekwencji starterów itp. Nowatorska jest metoda amplifikacji krzyżowej do wykrywania cirkowirusa gęsi (GoCV) u dzikich ptaków, do której autorka zaprojektowała startery i parametry reakcji. Czytelne przedstawienie zastosowanych metod pozwoli na późniejsze powtórzenie tych samych metod przez innych autorów.

Rozdział Wyniki, składający się z 56 stron, został przez autorkę podzielony na 3 części, z których pierwsza przedstawia charakterystykę reowirusów ptasich (ARV), druga – circowirusa gęsiego (GoCV), a trzecia – polyomawirusa gęsiego (GHPV), w próbach od dziko żyjących ptaków. Taki podział wyników zwiększył czytelność pracy. O tym jak ważny jest podjęty przez autorkę problem badawczy świadczy fakt, że stwierdziła ona zakażenie reowirusami u 40%, circowirusami gęsi u 26%, a polyomawirusem gęsi u 24% badanych osobników dzikich ptaków. Autorka także potwierdziła możliwość zakażenia krzyżowego drobiu wirusami ARV od ptaków dzikich testując je na zarodkach kurzych SPF i oceniając ich patogenność. W większości przypadków takie zakażenie było możliwe i wirusy były patogenne dla zarodków kurzych, co potwierdza że wirusy te mogą być przenoszone między ptakami dzikimi a drobiem. Ciekawe podsumowanie uzyskanych w każdej z trzech części wyników stanowią drzewa filogenetyczne, przedstawiające pokrewieństwa sekwencji nukleotydowych analizowanych fragmentów DNA, oraz sekwencji aminokwasowych, u wirusów stwierdzonych u drobiu w Polsce i w innych krajach, oraz stwierdzonych przez autorkę u dziko żyjących ptaków w Polsce. Wyniki wskazują, że w populacji dzikich ptaków występuje znaczne zróżnicowanie pojawiających się szczepów z wszystkich omawianych grup wirusów. Pokrewieństwa przedstawione w postaci drzew filogenetycznych pozwalają na wnioskowanie dotyczące możliwej transmisji tych wirusów pomiędzy różnymi gatunkami ptaków dzikich a drobiem. Nowy i ważny dla nauki wynik to stwierdzenie zakażeń circowirusami gęsi (GoCV) i polyomawirusem gęsi (GHPV), dotychczas stwierdzanymi tylko u drobiu, u różnych gatunków dzikich ptaków.

Ponieważ obszerne wyniki były przedstawione w tych trzech podrozdziałach, w kolejnym rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja”, przedstawionym na 24 stronach, autorka podsumowała najważniejsze wyniki i po kolei przedyskutowała ich kolejne aspekty na tle dostępnej literatury tematu. Taki zabieg formalny znacznie ułatwił odbiór dyskusji. W tym rozdziale autorka wskazuje m.in. na znaczną różnorodność sekwencji badanych wirusów, oraz możliwość wymieszania szczepów od dwóch różnych gatunków, w tym od gatunku dzikiego i drobiu. Wyjaśnia także, że przy dużej obserwowanej zmienności wirusów, mogą się pojawiać zakażenia nowymi wariantami wirusów, jak to się zdarzyło np. we Francji, co utrudnia produkcję skutecznych szczepionek. W wielu częściach dyskusji autorka podkreśla możliwość transmisji wirusów z ptaków dzikich na drób, głównie poprzez korzystanie z tych samych zbiorników wodnych. Chciałabym tu zwrócić uwagę, że oczywiście istnieje możliwość transmisji w drugą stronę – od drobiu na ptaki dzikie, które dalej mogą przenosić nabyte wirusy do innych hodowli. Autorka zasugerowała taki mechanizm transmisji, jednak nie jest to jasno przedstawione w tekście. W dyskusji jako najczęstsze środowisko dla transmisji wirusów między ptakami dzikimi a hodowlanymi autorka wskazuje na korzystanie przez obie grupy ptaków z tych samych zbiorników wodnych. Jednak występowanie circowirusów i polyomawirusów gęsi stwierdziła także u drobnych ptaków wróblowych, które nie są ptakami wodnymi, jak np. bogatka, kapturka, zięba, jer, skowronek. Wirusy ze wszystkich trzech grup występują też u takich ptaków jak kawki i gołębnie miejskie, które też nie są ptakami wodnymi. W jaki sposób i w jakich miejscach może zachodzić transmisja wirusów między tymi ptakami a drobiem? W pracy pojawiają się pewne sugestie, jednak ciekawe byłoby bardziej szczegółowe wyjaśnienie potencjalnych dróg zakażeń od dzikich ptaków niezwiązanych ze środowiskami wodnymi. Autorka podkreśla

także że największa różnorodność wirusów, i oraz szczepy wirusów ARV z największą liczbą mutacji punktowych wystąpiły u bociana białego, gatunku ściśle związanego z siedzibami ludzkimi. Jest to co prawda gatunek korzystający ze zbiorników wodnych, ale też i licznie gniazdujący na wiejskich domach. Jakże to może mieć znaczenie epidemiologiczne? Poza tymi drobnymi aspektami, które można by nieco rozszerzyć (mam nadzieję że autorka je przestawi w czasie obrony pracy), dyskusja jest wnikliwa, ciekawa, dobrze napisana i zawiera odniesienia do licznych, w tym najnowszych źródeł literaturowych. Autorka wskazuje, że dalsze prace nad szczepionkami na bazie szczepów wirusów od dzikich ptaków mogłyby poprawić skuteczność szczepionek dla drobiu, co jest wskazaniem praktycznego zastosowania jej badań.

Uwagi redakcyjne

Z obowiązku recenzenta, chciałabym wskazać drobne potknięcia redakcyjne, które można będzie poprawić przy przygotowaniu pracy do druku jako publikacje. Te niedociągnięcia są jednak drobne i nie utrudniły odbioru pracy. I tak:

str. 52, koniec rozdziału 3.4.1. – brak kropki po Ryc. 3 kończącej ostatnie zdanie rozdziału,

Ryc. 3, str. 53 – ciemnozielony kolor użyty do zaznaczenia sekwencji startera 5a jest tak ciemny, że nie pozwala odczytać tej sekwencji, jasny kolor byłby bardziej praktyczny.

Tab. 11, str. 53 – podanie w tabeli liczby przebadanych osobników z danego gatunku (dostępnej w Tab. 1) obok liczby ptaków z tego gatunku u których uzyskano wynik pozytywny, ułatwiłaby interpretację tej tabeli, bez potrzeby zaglądania do Tab. 1. Dla gatunków dla których zebrano większe liczby osobników np. powyżej 10, ułatwiłoby to ocenę jaka częste jest zarażenie w populacji. U drozda stwierdzono wynik pozytywny u dwóch osobników, chociaż z Tab. 1 wynika że próbki zebrano tylko od jednego osobnika tego gatunku. To drobna pomyłka, mogła powstać przez pomylenie liczby próbek z drozda i kosa (2 osobniki), sąsiedniego gatunku w Tab. 1.

str. 61, pierwsze zdanie drugiego paragrafu: zamiast „ocena specyficzność” powinno być „ocena specyficzności”

Tab. 18, str. 91 – uwaga jak do Tab. 11

Tab. 21, str. 105 – uwaga jak do Tab. 11 i Tab. 18

Podsumowując, główny cel pracy, oraz kolejne cele szczegółowe zakrojone na wstępie zostały w pełni osiągnięte w pracy, która została bardzo dobrze przeprowadzona i przedstawiona. Praca p. mgr Natalii Styś-Fijoł w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora. Wniosuję o dopuszczenie autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wniosuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej p. mgr Natalii Styś-Fijoł. Praca zasługuje na wyróżnienie ze względu na nowatorstwo i praktyczne znaczenie podjętych przez autorkę badań. Nowatorstwo pracy polega na zbadaniu przez autorkę występowania wirusów ptasich u szerokiego spektrum grup systematycznych i ekologicznych wolno żyjących ptaków w Polsce, co wcześniej nie było poznane. Ponieważ ptaki dzikie mogą

być rezerwuarami i przenosicielami wirusów na ptaki hodowlane, a kontakt obu grup może nastąpić w różnych okolicznościach, autorka podjęła się oceny epidemiologicznej występowania zakażeń u możliwie szerokiej grupy dzikich ptaków. Podjęcie takich badań jest bardzo ważne, ze względu na słaby stan dostępnej wiedzy o występowaniu wirusów drobiu u dzikich ptaków, i praktyczne znaczenie tej wiedzy dla zapobiegania chorobom drobiu. Warta podkreślenia jest też ogromna pracowitość i staranność wykonanych przez autorkę badań. Zostały one jasno i klarownie przedstawione w doskonale i ciekawie napisanej pracy. Dlatego wysoko oceniam całość rozprawy i proponuję jej wyróżnienie.



KIEROWNIK
Stacji Badania Wirusów Ptaków
dr hab. Magdalena Remisiewicz

Dr hab. Magdalena Remisiewicz

Gdańsk, 26.10.2018