

Warszawa, 2018.11.07

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

mgr Edyty Świętoń pod tytułem

„OCENA ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ ORAZ PATOGENNOŚCI WIRUSA GRYPY PTAKÓW PODTYPU H9N2 U WYBRANYCH GATUNKÓW DROBIU”

Oceny dokonano na zlecenie Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, zgodnie z jej uchwałą z dnia 20.06.2018 roku, na podstawie materiałów przekazanych przez Pana prof. dr hab. Dariusza Bednarka przewodniczącego Komisji Doktorskiej.

Wstęp

W subiektywnej ocenie autora recenzji w Polsce od dnia 08.08.2005 w powszechnej świadomości społecznej pojawiła się „ptasia grypa”, stanowiąc przez ostanie kilkanaście lat problem medialny, socjologiczny, ekonomiczny, epidemiologiczny, epizootyczny i w końcu problem dla patologów drobiu. Po bardzo intensywnym, ale na szczęście krótkim okresie wrzawy w środkach społecznego przekazu, prowadzącym do wielu irracjonalnych zachowań i kontrowersyjnych opinii, zainteresowanie mediów tym tematem szczęśliwie zmniejszyło się. Dziś problem w mediach pojawia się wraz z przypadkami nowych zachorowań u drobiu, a „ptasia grypa” nie wpływa na zachowania obywateli, konsumentów.

Jak dotychczas, w ciągu ostatnich 23 lat w Polsce odnotowano 5 epizodów zachorowań na grypę ptaków. Były to: *epizod I* – 1995, indyki – LPAI H7N7; *epizod II* – 2006, ptaki dzikie – HPAI H5N1; *epizod III* – 2007, drób – HPAI H5N1; *epizod IV* – 2013, drób – LPAI H9N2 i ostatni epizod z przełomu lat 2016-2017 (pierwszy przypadek – ptaki dzikie – H5N8, 2 listopada 2016 i pierwsze ognisko – drób – H5N8 – 2 grudnia 2016) (*Śmietanka K., Minta Z.: Avian influenza in Poland. Acta Biochim Pol. 2014, 61, 453-457*).

Pierwszy epizod był spowodowany przez wirus podtypu H7N7 o niskiej zjadliwości (LPAIV) i wystąpił krajowych stadach indyków, zwłaszcza na Warmii i Mazurach w roku 1995 (Minta Z., Bugajak P., Daniel A., Tomczyk G., Koncicki A.: *Stan epidemiologiczny chorób wirusowych drobiu grzebiącego w Polsce. Materiały Konferencji Naukowej „Aktualny stan epidemiologiczny i immunoprofilaktyki chorób drobiu”*, Puławy, 21-22.09.1995, 37). Była to gwałtownie rozprzestrzeniająca się epizootia obejmująca wiele stad o zróżnicowanym przebiegu i stratach (kilka, kilkanaście procent). Zastosowano autoszczepionki.

Na wiosnę 2006 roku, wykryto 64 przypadki H5N1 wirusa, głównie u łabędzi niemych, w większości u ptaków przetrzymywanych w wolierze w Toruniu (Minta Z., Śmietanka K., Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Wijaszka T.: *Wysoco zjadliwa grypa ptaków H5N1 u dzikich ptaków w Polsce – analiza pierwszych przypadków. Medycyna Weter. 2007, 63, 1349-1352.*

W grudniu 2007 roku, dziewięć ognisk wysoce zjadliwej grypy ptaków H5N1 wykryto u drobiu oraz jedno u dzikich ptaków trzymanyh w niewoli. Ogniska w 2006 i 2007 roku były spowodowane przez genetycznie podobne, ale wyraźnie odróżniające się od siebie wirusy kladu 2.2 (Śmietanka K., Minta Z., Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Wijaszka T., Związek J., Batorczak Z., Bartoszewicz L *Highly pathogenic avian influenza H5N1 cases in Poland in 2007. Medycyna Weter. 2009, 65, 115-118*). W aspekcie ekonomicznym oficjalny bilans (na dzień 11.02.2008) wystąpienia „ptasiej grypy” w Polsce, obejmujący tylko koszty poniesione na odszkodowania, uśpienie ptaków, utylizację i dezynfekcję wyniósł ponad 12,2 mln zł. Zostało zlikwidowanych łącznie ok. 939 tys. sztuk drobiu oraz ponad 3,9 mln sztuk jaj. Ogniska choroby znajdowały się w województwach: mazowieckim (w powiatach płońskim i żuromińskim) oraz warmińsko-mazurskim (w powiatach lidzbarskim, elbląskim i ostródzkim). Z kolei według wiceprezesa Krajowej Rady Izb Rolniczych, Władysława Piaseckiego, w wyniku „ptasiej grypy” cena drobiu w styczniu spadła o ok. 1 zł/kg, co oznacza, że producenci drobiu stracili ok. 100-120 mln zł. Podobnej wysokości straty poniosły także zakłady drobiarskie. Przytoczone dane wskazują, że znaczenie gospodarcze każdego ogniska HPAI jest bardzo duże.

Wiosną 2013 roku w zachodniej części Polski u indyków rzeźnych stwierdzono ogniska grypy ptaków H9N2 o niskiej patogenności. Chore ptaki wykazywały zmniejszone spożycie paszy i wody, objawy ze strony układu oddechowego i różne (ale zwykle niskie) wskaźniki śmiertelności (Śmietanka K., Minta Z., Świętoń E., Olszewska M., Józwiak M., Domańska-Blicharz K., Wyrostek K., Tomczyk G., Pikula A.: *Avian influenza H9N2 subtype in Poland--characterization of the isolates and evidence of concomitant infections. Avian Pathol. 2014, 43,*

427-436). Znaczenie tego epizodu pod względem epizootycznym i ekonomicznym nie było duże, bowiem odnotowano jedynie 4 ogniska w roku 2013 i dwa w roku następnym, ale zebrany materiał był na tyle interesujący, że naukowcy z Zakładu Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zdecydowali się na bardzo szczegółowe określenie molekularnych markerów odpowiedzialnych za adaptację i patogenność tych szczepów dla drobiu. Tego trudnego zadania podjęła się Pani mgr Edyta Świętoń w ramach ocenianej pracy doktorskiej.

Ostatni, jak dotychczas najbardziej dotkliwy, epizod miał miejsce w latach 2016-2017. W czasie jego trwania stwierdzono 38 ognisk u drobiu fermowego (17 u indyków, 9 w stadach gęsi, 7 u kaczek i 5 u kur) (Śmietanka K., Niemczuk K., Świętoń E., Niemczuk P.: *Wysoco zjadliwa grypa ptaków podtypu H5 w Europie i Polsce w latach 2016 i 2017 – aktualna sytuacja, zwalczanie i ocena ryzyka. Życie Weterynaryjne, 2017,92,481-485*). Wirus H5Nx krąży w europejskiej populacji ptaków dzikich i wywołuje ogniska u drobiu i ptaków utrzymywanych, wydaje się jednak, że w porównaniu z rokiem 2016 zagrożenie dla europejskiego sektora drobiarskiego jest szczęśliwie mniejsze. Z bardzo wielu powodów badania nad influencją ptaków są zawsze bardzo celowe i zawsze bardzo potrzebne. Z dużym uznaniem należy odnotować, że krajowe osiągnięcia w tym zakresie nie odbiegają od badań prowadzonych w wiodących krajach unijnych, co ma szczególnie istotne znaczenie dla lidera w produkcji drobiarskiej w EU, jakim od kilku lat jest Polska. Generalnie mogę stwierdzić, że podjęte przez doktorantkę badania uważam za ciekawe, potrzebne i oryginalne.

Generalna, bardzo pozytywna uwaga, jaka nasuwa się po lekturze recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr Edyty Świętoń jest taka, iż Jej badania tworzą krajową kladystykę wirusa influenzy ptaków na najwyższym europejskim poziomie. Osobiście, wybór tego tematu uważam za bardzo cenny i niezwykle potrzebny, zwłaszcza w aspekcie sytuacji epizootycznej w kraju. Niewątpliwie podjęcie tak szeroko zakrojonych badań w tym zakresie było możliwe dzięki wieloletnim pracom realizowanym od końca lat dziewięćdziesiątych przez Zakład Chorób Drobiu, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego zapoczątkowanym przez prof. dr hab. Zenona Mintę (bardzo ważna Konferencja Naukowa pt. "Influenza ptaków", Puławy, 20.10.2000) z wieloma sukcesami kontynuowana przez promotora ocenianej rozprawy, dr hab. Krzysztofa Śmietankę, prof. nadzw. PIWet.-PIB. Bez wątpienia influenza ptaków jest jednym z istotnych problemów zdrowotnych bez próby opanowania, którego intensywna produkcja drobiarska nie mogłaby się rozwijać, stąd ważność podjętych przez Panią Magister badań.

Ocena pracy doktorskiej

Przedstawiona do oceny praca doktorska „Ocena zmienności genetycznej oraz patogenności wirusa grypy ptaków podtypu H9N2 u wybranych gatunków drobiu” została wykonana w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Śmietanki, prof. nadzw. PIWet-PIB. Odnotować należy, że o wysoki poziom merytoryczny rozprawy dbała także dr Joanna Krukowska-Sajewicz, promotor pomocniczy.

Dysertacja posiada układ typowy dla opracowań na stopień naukowy i zawarta jest na 150 stronach uwzględniających 30 tabel, 26 rycin (w tym jedną kolorową rycinę przedstawiającą charakterystyczne objawy kliniczne u eksperymentalnie zakażonych indycząt) i podzielona jest na następujące rozdziały: wstęp, cel, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, streszczenie, summary, piśmiennictwo oraz załączniki (4 bardzo szczegółowe tabele). Szata edytorska ocenianej rozprawy jest staranna i estetyczna. Ogólne wrażenie z lektury dysertacji jest bardzo pozytywne i można z pełnym przekonaniem stwierdzić, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Edyty Świętoń napisana jest poprawnym językiem, spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane opracowaniom na stopień naukowy doktora. Nie mam żadnych zastrzeżeń do strony redakcyjnej opracowania. Bardzo bogate i prawidłowo używane w tekście rozprawy nazewnictwo fachowe świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Dotyczy to szczególnie części poświęconej badaniom molekularnym i biostatystycznej analizie uzyskanych wyników. Na korzyść Doktorantki przemawia także to, że stara się przybliżyć zrozumienie wykonywanych badań opisując krótko i przystępnie zasady stosowanych metodyk.

Cytowane w pracy doktorskiej, wydawałoby się bardzo obszerne, piśmiennictwo zamykające się liczbą 220 publikacji jest w istocie wyborem bardzo starannie wyselekcjonowanych pozycji literaturowych poświęconych AI. Autorka cytuje też wszystkie istotne prace z tego zakresu wykonane przez krajowych autorów w tym przypadku z Zakładu Chorób Drobiu PIWet.-PIB. Jest ona również współautorem kilku z nich. W spisie są oczywiście ujęte prace, które ukazały się ostatnio (2018) w wysoko impaktowanych czasopismach, które przekonywująco potwierdzają wysoką jakość warsztatu badawczego Doktorantki. Dobór piśmiennictwa wskazuje na pełną dojrzałość naukową i umiejętność wyboru bardzo bogatej w tym zakresie literatury źródłowej.

Wydaje się, że praktyczniej byłoby wyłączyć z zestawu cytowanego piśmiennictwa akty prawne (pozycje: 110, 111, 118, 119, 124, 125, 126).

Opiniowaną pracę doktorską rozpoczyna obszerny wstęp, obejmujący 24 strony,

wprowadzający czytelnika w najistotniejsze, zdaniem Doktorantki, zagadnienia związane z influencją ptaków. Podkreśla ona, że bez wątpienia, grypa ptaków stanowi aktualnie jeden z największych problemów w intensywnej produkcji drobiarskiej na świecie. Nie można również nie doceniać zagrożeń, jakie potencjalnie niesie ta jednostka chorobowa dla zdrowia człowieka (w latach 2003 – 2018 stwierdzono 860 zachorowań ludzi wywołanych przez H5N1 z tego 454 zakończyło się zgonem – dane WHO: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/ .

W rozdziale 1.1 czytelnikowi nie zajmującemu się na co dzień wirusologią autorka przypomina najważniejsze dane na temat budowy wirusa typu A, zaś w rozdziale 1.2 wybrane dane z biologii tego patogenu. Dla zrozumienia wykonanych przez doktorantkę badań, szczególnie przydatny jest podrozdział 1.3 opisujący różnorodność i zmienność wirusa grypy typu A. Z kolei w rozdziale 1.4, w lakonicznej formie, autorka przypomina klinikę i charakter zmian anatomopatologicznych w przebiegu zakażenia wirusem influenzy ptaków. Za interesujący w aspekcie wykonanych badań należy uznać fragment 1.4.3 wstępu prezentujący czynniki zjadliwości, adaptacji i potencjału zoonotycznego AIV, który to podrozdział krótko omawia znaczenie hemaglutyniny, neuraminidazy, białka NS1, kompleksu polimerazy oraz białka kanału jonowego M2, odpowiedzialnych za patogenność tego zarazka. Ważne jest umieszczenie informacji o punktach uchwytu leku przeciwwirusowych, hamujących aktywność neuraminidazy oraz mechanizmy nabywania oporności na tego rodzaju terapię. W dalszej części wstępu, po omówieniu epidemiologii grypy ptaków, autorka szczegółowo opisuje zakażenia wywołane podtypem H9N2. Pierwszym w historii prototypowym izolatem tego podtypu był szczep influenzy A/turkey/Wisconsin/1966 (Homme i wsp., 1970). Obok występowania wirusów tego podtypu w Ameryce Północnej od końca lat 80-tych zarazek izolowano w Azji. W kolejnych latach wirus przemieścił się w kierunku Bliskiego Wschodu oraz Afryki i jest obecnie najczęściej izolowanym podtypem wirusa AI u drobiu na tych obszarach. W Europie do 2012 roku ogniska LPAI H9N2 zdarzały się bardzo rzadko. W Polsce wiosną 2013 roku zdiagnozowano 4 ogniska tego podtypu. Kolejne dwa ogniska stwierdzono w 2014 roku. Wszystkie one dotyczyły indyków rzeźnych w Zachodniej Polsce. Charakterystyka szczepów H9N2 pochodzących z tych ognisk jest przedmiotem pracy doktorskiej mgr Edyty Świętoń. W rozdziale 1.6 autorka wskazuje na znaczenie zakażeń wirusem grypy ptaków u ludzi. Podkreślając że wirusy podtypu H9N2 również stanowią potencjalnie ważny czynnik zoonotyczny. W kolejnym podrozdziale wstępu autorka opisuje bardzo zwięźle diagnostykę zakażeń wirusem influenzy ptaków. Część ogólną wstępu kończy podrozdział 1.8 sumujący wiedzę Doktorantki o zasadach zwalczania grypy ptaków. Trudno

nie zgodzić się ze stanowiskiem zawartym w tej części wstępu, że nie istnieją obecnie inne metody, poza bioasekuracją, które w praktyce mogą wpłynąć na ograniczenie strat powodowanych przez wirus influenzy. Zasadniczo szczepienia profilaktyczne w krajach EU są bowiem prawnie zabronione.

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

Cele badań (rozdział 2) są krótko sprecyzowane w 6 zadaniach, jakie postawiła sobie do wykonania doktorantka. Autorka ambitnie stwierdza, że „podjęte badania mają na celu nie tylko ocenę patogenności wirusa dla różnych gatunków, czyli wpływu wirusa na gospodarza, ale również ocenę wpływu gospodarza na wirusa, poprzez analizę zmian w genomie na poziomie populacji wirusowej”. Jak wspomniano wcześniej, cele pracy zrealizowano w następujących zadaniach badawczych:

- 1. Określenie pochodzenia i powiązań filogenetycznych szczepów wirusa grypy ptaków podtypu H9N2 wywodzących się od drobiu w Europie.*
- 2. Określenie markerów zjadliwości, adaptacji i potencjału zoonotycznego szczepów AIV H9N2.*
- 3. Ocena patogenności krajowego izolatu AIV H9N2 dla indyków, przepiórek i kaczek.*
- 4. Ocena potencjału zoonotycznego izolatów AIV H9N2 na modelu mysim.*
- 5. Ocena zmienności genetycznej wirusa w przebiegu zakażenia u indyków, przepiórek i kaczek.*
- 6. Ocena zmian w genomie wirusa w wyniku pasaży przez organizm kur SPF.*

Rozdział 3 dysertacji opisuje z kolei materiał i metody zastosowane przez doktorantkę.

Jak również wspomniano wcześniej, w badaniach wykonanych przez Panią magister wykorzystano trzy krajowe izolaty wirusa AI podtypu H9N2, które wyosobniono z wymazów z tchawicy bądź z narządów wewnętrznych ptaków pochodzących z zakażonych stad indyków. Pobrany materiał posłużył do izolacji zarazka na zarodkach kurzych. Wartość wykonanych badań podnosi fakt, że obok izolatów krajowych w analizie filogenetycznej i molekularnej wykorzystano również 27 izolatów AIV H9N2 pochodzących z ognisk u indyków w Niemczech z lat 2012-2014. Łączna pula analizowanych izolatów wynosiła zatem 30. Jest ważne, że Autorka opisuje szczegółowo kliniczny przebieg zakażenia izolatami krajowymi. Wskazując, że wirus spowodował wyraźne objawy kliniczne, głównie ze strony układu oddechowego oraz, w przypadku izolatu A/turkey/Poland/09/2014 (H9N2), objawy ze strony układu nerwowego. Brak jest natomiast danych na temat kliniki jaka towarzyszyła zakażeniom izolatami niemieckimi.

Opis metod zastosowanych przy realizacji pracy doktorskiej rozpoczyna podrozdział 3.1.2 podający protokół izolacji RNA wirusowego z płynu owodniowo-omocznioowego oraz reakcji RT-PCR (rozdział 3.1.3). Dalej autorka podaje szczegółowy opis wykonanych badań molekularnych charakteryzując protokół sekwencjonowania otrzymanych produktów PCR. Podanie opisów metod wykonanych badań genetycznych w formie tabel ułatwia zapoznanie się ze szczegółami prowadzonych reakcji. Najbardziej interesującym elementem badań wykonanych przez autorkę jest analiza filogenetyczna i molekularna wszystkich segmentów genomu wirusa zarówno polskich jak i niemieckich szczepów AIV H9N2 (szczegółowo opisanych w podrozdziale 3.1.5). Podrozdział 3.2 opisuje metody oceny patogenności AIV H9N2 dla przepiórek, indyków i kaczek. Ze względów formalnych należy zaznaczyć, że na wykonanie doświadczeń autorka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej dla Doświadczeń na Zwierzętach (uchwała nr 88/2515). Każda grupa doświadczalna poszczególnych gatunków (indyków, przepiórek i kaczek) składała się z 13 młodych ptaków (w wieku 2-3 tyg.). W grupie znajdowały się ptaki zakażone izolatem A/ty/PL/14/13(H9N2), do których dołączano trzy niezakażone ptaki kontrolne tego samego gatunku (2 w przypadku przepiórek), stanowiące kontrolę transmisji zakażenia. Utworzono również kontrolę negatywną. Ptaki obserwowano klinicznie przez dwa tygodnie pobierając cyklicznie wymazy z jamy dziobowo-gardłowej i kloaki od wszystkich osobników z obydwu podgrup – zakażonej i dołączonej do kontroli transmisji infekcji. W ostatnim dniu doświadczenia pobrano krew do badań serologicznych w teście HI z homologicznym antygenem. W pobranych wymazach określano ilość wirusowego RNA w sposób opisany wcześniej (rozdział 3.1.2). Bez wątpienia najbardziej wartościową częścią pracy jest szczegółowe opisanie genetycznej zmienności wirusa w przebiegu zakażenia u indyków, przepiórek i kaczek. Uzyskane od ptaków w drugim i czwartym dniu po zakażeniu materiał genetyczny poddano głębokiemu sekwencjonowaniu, a po przygotowaniu bibliotek DNA, posiłkując się technikami stosowanymi przy tego rodzaju analizach dokonano szczegółowej analizy bioinformatycznej. By jeszcze dokładniej zbadać wpływ pasażowania AIV H9N2 przez organizm kur wykonano osobne doświadczenie, w którym podczas 10 pasaży oceniono wpływ tego zabiegu na mutacje w genomie wirusa. Dla analizy porównawczej potencjału zoonotycznego izolatów AIV H9N2, obok oceny patogenności izolatu dla ptaków wykonano doświadczenie mające ocenić patogenność szczepów dla 6-8 tyg. myszy doświadczalnych. Ocenę siewstwa ilości wirusowego RNA w narządach układu oddechowego oraz serokonwersji wykonano podobnie, jak w przypadku eksperymentalnego zakażenia ptaków. Zakres badań wykonanych przez mgr Edytę Świętoń jest bardzo szeroki. Obok klasycznych badań molekularnych dużą zasługą autorki jest

wykonanie dobrze zaplanowanych badań *in vivo*, co jest również Jej oryginalnym osiągnięciem. Tak obszerny zakres badań potwierdza dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki.

Rozdział czwarty, opisujący uzyskane wyniki badań, jest najobszerniejszym fragmentem ocenianej pracy (40 stron), bardzo zróżnicowanym pod względem formy, ale doskonale prezentującym dokonania Doktorantki. Zgrupowanie wyników w ośmiu podrozdziałach ułatwia śledzenie uzyskanych danych. Podrozdział 4.1 grupuje uzyskane dane o strukturze filogenetycznej i molekularnej badanych terenowych szczepów H9N2. Jest ciekawe że w drzewach filogenetycznych dla genów HA i NA polskie szczepy oraz izolaty z Niemiec tworzyły wyraźną oddzielną grupę. Na tej samej gałęzi lokowały się również szczepy od indyków z Wielkiej Brytanii. Zaobserwowano także pewne powiązania z wirusami pochodzącymi od drobiu jak i od ssaków. Jak podaje autorka, geny PB1 i PA wykazywały dosyć duże podobieństwo do izolatów H10N7 wyosobnionych od fok. Autorka w kilku interesujących zestawieniach (ryc. 5-12) podaje drzewo filogenetyczne dla różnych genów izolowanych wirusów H9N2. Podrozdział 4.1.6 podaje analizę molekularną markerów zjadliwości, adaptacji i potencjału zoonotycznego badanych wirusów H9N2, podjętą w celu zidentyfikowania mutacji, które mogły wpłynąć na zdolność wirusów do utrzymywania się populacji drobiu. W podrozdziale 4.2-4.3 autorka podaje szczegółowe informacje na temat wyników badań nad przebiegiem zakażenia, siewstwem i transmisją zarazka do ptaków kontaktowych oraz odpowiedzi immunologiczną u poszczególnych gatunków tj. indyków, przepiórek, kaczek. Jedynym objawem klinicznym stwierdzonym tylko u indyków była osowiałość (ryc. 16). Jeden indyk padł w 9. dniu po zakażeniu, a na sekcji stwierdzono przekrwienie dwunastnicy oraz wzdęcie jelit ślepych. Zarówno przepiórki, jak i kaczki nie wykazywały żadnych objawów klinicznych po infekcji. Jak można się było spodziewać, w badaniach serologicznych autorka potwierdziła że najbardziej wrażliwe na zakażenie były indyki natomiast u przepiórek specyficzne przeciwciała HI stwierdzono u 7 na 10 zakażonych ptaków, zaś u kaczek u 5/10, a miana przeciwciał nie przekraczały 5 log₂ (tab. 21). Ciekawe były także wyniki badań nad siewstwem wirusa, które najdłużej trwało u indyków, a najkrócej u przepiórek. W dalszych częściach tego rozdziału autorka omawia wyniki opisujące zmienność wirusa w przebiegu zakażenia indyków, przepiórek i kaczek, wskazując, że największą liczbę polimorficznych pozycji zidentyfikowano w genie HA u wszystkich badanych gatunków. Analiza złożoności populacji wirusa poszczególnych próbkach wykazała że największą różnorodność zarówno u indyków jak i przepiórek zidentyfikowano dla genu HA, odzwierciedlając tym samym różnice w liczbie populacji mieszanych (ryc. 21). Wśród innych interesujących danych uzyskanych przez Panią mgr. Edytą Świątoń, zwraca uwagę

analiza udziału wariantów oraz liczby mutacji synonimicznych i niesynonimicznych w wymazach z jamy dziobowo-gardłowej od przepiórek i indyków. W tym przypadku u indyków stwierdzono więcej wariantów o wysokim udziale, skutkujących zmianami w sekwencji konsensusowej. Potwierdzeniem różnic we wrażliwości poszczególnych gatunków ptaków użytych w doświadczeniu była selekcja wariantów populacji wirusa użytego do zakażenia. Z pośród 22 wariantów obecnych w wariacie użytych do zakażenia 21 stwierdzono u przepiórek, 20 u indyków natomiast 10 u kaczek. W odróżnieniu od przepiórek, niezależnie od inokulum, u indyków mutacje stwierdzano w genie PB2, PB1, PA oraz NA. W podrozdziale 4.7 autorka opisuje wyniki uzyskane podczas pasażowania AIV H9N2 przez organizm kur SPF. Jest ciekawe, że oceniając dystans genetyczny dla par kolejnych pasażów największe przesunięcie stwierdziła autorka pomiędzy 2. a 3. pasażem. Omówienie wyników kończy podrozdział 4.8 w którym autorka potwierdza że myszy są stosunkowo odporne na zakażenie wirusem H9N2, bowiem obecność materiału genetycznego wykrywano w układzie oddechowym tylko przez 10 dni. Natomiast badanie wykonane w 14 dniu nie potwierdzało obecności RNA wirusa. Nie stwierdzono siewstwa wirusa ani serokonwersji, poza jednym wynikiem dodatnim dla jednej myszy z grupy zakażonej izolatem A/T/PL/O8/14.

Rozdział piąty „Omówienie wyników i dyskusja” to próba oceny własnych badań autorki na tle literatury światowej. Mimo, że ze względu na nowatorski charakter podjętych badań nad zmiennością genetyczną wirusa grypy ptaków w układach eksperymentalnych u drobiu nie był tak szeroko badany, to autorka na 20 stronach stara się odnieść uzyskane wyniki badań własnych do rezultatów innych badaczy. Należy podkreślić, że omówienie wyników wskazuje na dogłębne zrozumienie przez doktorantkę złożonych problemów biologii molekularnej zakażeń wirusem AIV H9N2. Badania Pani mgr Edyty Świętoń potwierdziły powszechnie przyjmowaną tezę, że przyczyną wprowadzenia wirusa LPAI H9N2 do kraju był handel wewnątrzspółnotowy. Prowadząc analizę pochodzenia polskich izolatów wirusa H9N2, autorka dochodzi do wniosku że przodek krajowych izolatów został wprowadzany do populacji drobiu Niemczech w 2012 i pochodził od ptaków dzikich. Stwierdzając, że tak długie utrzymywanie się wirusa pochodzącego od ptaków dzikich w populacji drobiu było możliwe dzięki nabyciu przez ten patogen cech adaptacyjnych, z których najbardziej istotna była delecja w rejonie łądyżki NA, którą stwierdzono we wszystkich krajowych izolatach oraz w większości izolatów niemieckich. Cechy tej nie posiadały izolaty H9N2 z 2012 roku. Dalsze badania nad sekwencją genomu wirusa trzech krajowych izolatów H9N2 wykazały, iż pomimo bliskiego pokrewieństwa pomiędzy tymi wirusami, stwierdzono znaczące różnice

w sekwencjach aminokwasowych w obrębie segmentu PB1, co zdaje się wskazywać na dynamiczną ewolucję wirusa w terenie.

Wykonane zostały przez autorkę badania nad markerami adaptacji wskazane na potrzebę krajowych izolatów wirusa H9N2 dla różnych gatunków drobiu. Trudno nie zgodzić się z opinią autorki, że tego typu badania mają ważne znaczenie epidemiologiczne, gdyż ułatwiają określenie gatunków wrażliwych i potencjalnie bezobjawowych rezerwuarów. Uzasadniając bardzo logicznie wybór gatunków do zakażenia, autorka szczególnie podkreśla, iż niezwykle ciekawym obiektem modelowym jest przepiórka japońska – gatunek, u którego często zachodzi wydajna replikacja wirusa przy jednoczesnym braku objawów klinicznych. Wybór tak przemyślanych modeli badawczych pozwolił na wyciągnięcie wielu interesujących wniosków na temat patogenności wirusa AI H9N2 dla drobiu. Za niezwykle interesujące fragment wykonanych badań należy uznać analizę kształtowania się zmienności populacji wirusa w przebiegu zakażenia. Bowiem charakterystyka spektrum mutacji, jakie pojawiają się w genomie wirusa w trakcie namnażania się u gospodarza, jest podstawą dla zrozumienia ewolucji tego zarazka, adaptacji i patogenez. Dzięki stworzonemu modelowi badawczemu i zastosowaniu analizy wielu parametrów badania autorki pozwalają na daleko idące porównania wpływu wirusa na gospodarza (patogenności) oraz wpływu gospodarza na wirusa (czyli ocenę zmian w genomie wirusa). Jest bardzo interesujące, że w świetle wykonanych badań największą różnorodność populacji wirusa stwierdzono u przepiórek. Z kolei u indyków stwierdzono większą zmienność na poziomie fenotypu jak również większą zmienność międzyosobniczą na początku infekcji. Wyniki badań autorki sugerują, że obserwowane różnice pomiędzy poszczególnymi gatunkami są efektem odmiennej presji selekcyjnej działającej na populacje wirusa u indyków, przepiórek i kaczek, jak również w układzie oddechowym i przewodzie pokarmowym, nie zależą one jednak od intensywności replikacji wirusa. Wykonane badania zdają się wskazywać że układ oddechowy może odgrywać większą rolę w generowaniu i utrzymaniu różnorodności wirusa niż przewód pokarmowy. W podsumowaniu omówienia wyników i dyskusji autorka stwierdza, że wyniki zrealizowane w ramach badań stanowią znaczący wkład w dziedzinę epidemiologii wirusa grypy ptaków. Jest oczywiste, że badania te są bardzo istotne dla wyjaśnienia mechanizmów rządzących ewolucją i adaptacją AIV.

Rozdział „Wnioski” – ten bardzo istotny element pracy doktorskiej – jest bardzo często krytykowany przez recenzentów, choć w przypadku wniosków wyciągniętych przez Panią mgr Świętoń, trzeba wyraźnie stwierdzić, że są one klasycznie akademickie i poprawne! Uzyskane wyniki badań oraz ich analiza upoważniły Autorkę do wyciągnięcia aż 8 obszernych

wniosków opisowych, ściśle jednak powiązanych z celami jakie doktorantka postawiła sobie do rozwiązania rozpoczynając badania.

Wniosek pierwszy informuje czytelnika, że „*analiza filogenetyczna, w oparciu o sekwencje całego genomu szczepów AIV H9N2 wywołujących zakażenia u drobiu w Europie w ostatnich latach (szczególnie w Niemczech w latach 2013-2015) wyklucza ich związek z endemią H9N2 w Azji i Afryce i wskazuje na euroazjatycką populację ptaków dzikich jako pierwotne źródło wirusa.*”. Wniosek ten potwierdza, że bez właściwego warsztatu badawczego umożliwiającego szczegółowe badania molekularne, śledzenie ewolucji i transmisji wirusów AI jest niemożliwe. Wniosek drugi, który jest dobrze udokumentowany w badaniach autorki ma ważne znacznie wyjaśniające przebieg zakażeń AIV H9N2 w Polsce, bowiem wykrycie znacznych różnic w genomie izolatów terenowych z dwóch kolejnych lat, w tym mutacji związanych z adaptacją i zjadliwością, świadczy o dynamicznej ewolucji wirusa w terenie. Wniosek wysnuty przez doktorantkę na podstawie badań z zastosowaniem pasaży AIV H9N2 przez organizm kur SPF potwierdza, że w genomie wirusa pojawiły się i/lub uległy selekcji mutacje identyczne do zaobserwowanych w szczepach terenowych (w tym w miejscu cięcia białka HA), co świadczy o ich potencjalnym znaczeniu adaptacyjnym (wniosek 3).

W wniosku czwartym autorka badań stwierdza, że „*Wyniki badań przeprowadzonych na myszach świadczą o niskim potencjale zoonotycznym analizowanych szczepów terenowych AIV H9N2, mimo obecności w jednym z nich mutacji odpowiedzialnej za wzrost wydajności replikacji wirusa w komórkach ssaków. jednak porównanie patogenności dwóch izolatów (z mutacją i bez niej) dla myszy wykazało niską patogenność obu szczepów i brak istotnych różnic, co świadczy o niskim potencjale zoonotycznym badanych wirusów AI H9N2.*”

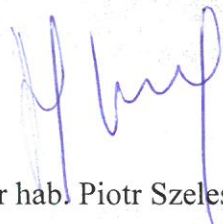
Kolejne cztery wnioski podsumowują wyniki badań nad zakażeniami *in vivo* indyków, przepiórek i kaczek. We wniosku piątym doktorantka stwierdza, że badany szczep AIV H9N2 charakteryzuje się zróżnicowaną, ale generalnie niską zjadliwością dla indyków, przepiórek i kaczek, przy czym analiza porównawcza przebiegu klinicznego oraz poziomu i czasu trwania siewstwa wskazuje na najwyższą wrażliwość na zakażenie u indyków, a najniższą u kaczek. Bardzo ciekawy jest wniosek szósty wskazujący na różnice w patomechanizmie infekcji pomiędzy gatunkami użytymi w doświadczeniu. Obserwowany u przepiórek i indyków wyższy poziom siewstwa z dróg oddechowych niż z kloaki świadczy o większym tropizmie wirusa do układu oddechowego u tych gatunków. Wysoki poziom siewstwa, przy jednoczesnym braku objawów klinicznych lub ich niskiej intensywności, wskazuje na potencjalną rolę przepiórek i indyków jako „cichego rezerwuaru” wirusa. Dodatkowo duża heterogenność genetyczna AIV H9N2 stwierdzona u przepiórek może tłumaczyć rolę tego gatunku jako „ogniwa pośredniego”

w generowaniu wariantów wirusa o potencjale adaptacyjnym dla różnych gatunków drobiu, jak i dla ssaków. Duża różnorodność wirusa w wymazach z jamy dziobowo-gardłowej, zwłaszcza u przepiórek i indyków, oraz bardzo niska w wymazach z kloaki od indyków i kaczek, świadczy o silnej presji selekcyjnej działającej na populację wirusową w układzie pokarmowym. Ostatni wniosek wskazujący, że większa homogenność populacji AIV H9N2 w wymazach z kloaki niż jamy dziobowo-gardłowej świadczy o silniejszej presji selekcyjnej w układzie pokarmowym niż oddechowym i może być jedną z przyczyn wolniejszego tempa ewolucji wirusów grypy ptaków przy fekalno-oralnej drodze transmisji, a szybszego przy transmisji kropelkowej. Powoduje to, że szybsza ewolucja wirusa AI u ma miejsce u drobiu grzebiącego, u którego wirus namnaża się przede wszystkim w układzie oddechowym, a transmisja zachodzi głównie drogą kropelkową, może wynikać z dużej heterogenności generowanej w układzie oddechowym. Natomiast u dzikich ptaków wodnych, u których transmisja odbywa się głównie drogą fekalno-oralną, niska różnorodność wydalanego wirusa może być przyczyną wolniejszej ewolucji AIV. Badania wykonane w ramach pracy wykazały, że analiza zmienności wirusa w przebiegu zakażenia u różnych gatunków może przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów rządzących ewolucją i adaptacją wirusów AI, otwierając pole do dalszych badań.

Po krytycznej analizie opracowania, z nadzieją, że bardzo nieliczne uwagi i sugestie pomogą Autorce w poprawieniu dysertacji przy jej publikacji, stwierdzam, iż Pani mgr Edyta Świętoń 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 mgr Edyty Świętoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk