

Wrocław 05.10.2018

Dr hab. Andrzej Gawęł, prof. nadzw.  
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków  
i Zwierząt Egzotycznych  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Edyty Świętoń „Ocena zmienności genetycznej oraz patogenności wirusa grypy ptaków podtypu H9N2 u wybranych gatunków drobiu” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Śmietanki prof. nadzw. oraz dr Joanny Sajewicz-Krukowskiej.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 20.08.2018 roku, zgodne z uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętej w dniu 15.04.2015r.

Grypa ptaków (Avian Influenza - AI) jest wirusową chorobą stanowiącą jeden z najistotniejszych problemów w produkcji drobiu. Ponadto ze względu na potencjał zoonotyczny poświęca się jej szczególną uwagę. Choroba u ptaków występuje w efekcie zakażenia wirusami grypy typu A, występującymi w licznych odmianach antygenowych i charakteryzujących się dużą zmiennością genetyczną i fenotypową.

Podział na podtypy uwzględnia budowę antygenową dwóch białek powierzchniowych, odgrywających główną rolę w patogenezie: hemaglutyniny (H) i neuraminidazy (N). Do

chwili obecnej stwierdzono występowanie 16 podtypów H (H1 – H16) i 9 podtypów N (N1-N9), które mogą tworzyć różne kombinacje.

Wysoco zjadliwa grypa ptaków (Highly Pathogenic Avian Influenza - HPAI), wywoływana przez podtypy H5 i H7 jest monitorowana i zwalczana z urzędu, stąd w literaturze światowej znajdujemy wiele prac dotyczących charakterystyki tych izolatów.

Zakażenia drobiu wirusami podtypów innych niż H5/H7 nie podlegają obowiązkowi zgłaszania ani zwalczania, dlatego dane na temat występowania niskopatogennej grypy ptaków (Low Pathogenic Avian Influenza – LPAI) oraz charakterystyki izolatów są skąpe.

Podjęcie przez mgr Edytę Świętoń badań dotyczących charakterystyki izolatów wirusów grypy innych niż szczepy o wysokiej patogenności jest niezwykle istotne ze względów poznawczych i aplikacyjnych. Magister Edyta Świętoń podjęła wieloetapowe badania, mające na celu między innymi analizę filogenetyczną szczepów wirusa grypy ptaków podtypu H9N2 wywodzących się od drobiu z Europy, charakterystykę izolatów - określenia markerów zjadliwości, adaptacji i potencjału zoonotycznego oraz ocenę patogenności krajowego izolatu dla indyków, przepiórek i kaczek wraz z oceną zmienności genetycznej w przebiegu zakażenia. Ponadto Doktorantka oceniała potencjał zoonotyczny na modelu mvsim i zmiany w genomie wirusa poprzez wielokrotne pasaże wirusa przez kury SPF.

Manuskrypt ocenianej rozprawy ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich i liczy 150 stron wydruku komputerowego. Obszerną dokumentację dysertacji stanowi 30 tabel i 25 rycin umiejętnie wkomponowanych w tekst rozprawy oraz 4 tabele dotyczące wariantów wirusa załączone do dysertacji.

„Wstęp” obejmujący 33 strony składa się z 8 podrozdziałów i zawiera informacje dotyczące budowy, cyklu replikacji i zmienności wirusa grypy typu A, patobiologii i epidemiologii, zakażeń wirusem grypy ptaków u ludzi, diagnostyki i zwalczania grypy ptaków. Wstęp pracy napisany jest przejrzysto i stanowi spójne opracowanie wprowadzające czytelnika w temat badań, dowodzi bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę omawianej tematyki oraz krajowego i zagranicznego piśmiennictwa z tego zakresu.

Celem pracy mgr Edyty Świętoń było:

- określenie pochodzenia i powiązań filogenetycznych szczepów wirusa grypy ptaków podtypu H9N2 wywodzących się od drobiu w Europie
- określenie markerów zjadliwości, adaptacji i potencjału zoonotycznego szczepów AIV H9N2
- ocena patogenności krajowego izolatu AIV H9N2 dla indyków, przepiórek i kaczek

- ocena potencjału zoonotycznego izolatów AIV H9N2 na modelu mysim
- ocena zmienności genetycznej wirusa w przebiegu zakażenia u indyków, przepiórek i kaczek
- ocena zmian w genomie wirusa w wyniku pasażu przez organizm kur SPF

Cele pracy zostały sformułowane jasno, precyzyjne a ich rozwiązanie będzie miało duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne.

Rozdział „Materiały i metody”, składa się z 5 podrozdziałów obejmujących tematy takie jak analiza filogenetyczna i molekularna izolatów wirusa H9N2, ocena patogenności wirusa dla indyków, przepiórek i kaczek, ocena mutacji w genomie wirusa w przebiegu eksperymentalnych pasażu przez organizm kur SPF czy ocena patogenności dla myszy.

W celu oceny zmienności genetycznej oraz patogenności wirusa grypy ptaków podtypu H9N2, Doktorantka użyła różnorodnych i nowoczesnych technik badawczych takich jak: RT-PCR, głębokie sekwencjonowanie oraz analiza bioinformatyczna, a także wykonała część eksperymentalną na zwierzętach, wykazując się znakomitym warsztatem badawczym.

Rozdział „Wyniki” jest najobszerniejszym rozdziałem, obejmującym 39 stron i podzielony jest na 8 podrozdziałów opisujących wyniki badań analizy filogenetycznej i molekularnej terenowych szczepów wirusa grypy H9N2, patogenność, porównanie poziomu siewstwa i zmienność genetyczną wirusa w przebiegu zakażenia u indyków, przepiórek i kaczek, pasażu wirusa przez organizm kur SPF i jego patogenność dla myszy.

Doktorantka bardzo wnikliwie przeprowadziła zaplanowane badania. Efektem analizy genetycznej w oparciu o sekwencje genomu izolatów było stwierdzenie, iż różnią się one od szczepów pochodzących z Azji i Afryki, a są zbliżone do szczepów europejskich, stąd to najprawdopodobniej populacja europejskich ptaków dzikich była źródłem zakażenia stad indyków w Polsce. Analiza molekularna wykazała zmiany w genomie badanych wirusów, a w genie jednego z izolatów wykryto mutację-marker zjadliwości dla ssaków. W badaniach na myszach nie stwierdzono jednak różnic w patogenności szczepu z mutacją w genie PA w stosunku do szczepu bez mutacji, co świadczy o niskim potencjale zoonotycznym badanych wirusów. Badania dotyczące oceny patogenności wykazały niską, lecz zróżnicowaną zjadliwość podtypu H9N2, która była najwyższa u indyków a najniższa u kaczek. Na podstawie badań Doktorantki oceniać można, iż po zakażeniu izolatem wirusa grypy ptaków podtypem H9N2 najdłuższe i najintensywniejsze siewstwo oraz objawy kliniczne i

śmiertelność w grupie doświadczalnej obserwowano u indyków. U ptaków grzebiących odnotowano wyraźny tropizm wirusa do układu oddechowego, natomiast u kaczek obserwowano wydalanie wirusa głównie z kałem. Badania potwierdziły także, iż ewolucja wirusów AI u drobiu grzebiącego jest szybsza niż u kaczek. Proces adaptacji wirusa grypy do nowego gatunku prowadzono na kurach SPF. Wykazano szereg mutacji, w tym w miejscu cięcia hemaglutyniny. Podczas 10 pasaży utrwaliło się 8 mutacji, z czego 4 były obecne jako warianty mniejszościowe, a pozostałe pojawiły się podczas pasażowania. Potwierdza to zdolność wirusów H9N2 do szybkich mutacji zachodzących podczas zakażenia kolejnych ptaków. W przypadku korzystnego charakteru, mutacja utrwała się.

Przedstawione na 21 stronach pracy doktorskiej „Omówienie i dyskusja” jest wnikliwą analizą uzyskanych wyników badań w odniesieniu do danych zawartych w dostępnym piśmiennictwie i świadczy o dużej wiedzy i znajomości literatury z przedstawionego tematu. Podkreślić należy aktualność dobranego piśmiennictwa, którego część pochodzi z bieżącego, 2018 roku. Mimo iż podtyp H9N2 występuje powszechnie w populacji drobiu, danych dotyczących analizy sekwencji wirusa i potencjalnych możliwości adaptacji do różnych gatunków ptaków i zwiększania zjadliwości jest nadal niewiele.

Zdaniem recenzenta, bardzo dobrym dopełnieniem dyskusji byłoby uwzględnienie pracy Wang i wsp. „Characterization of avian influenza H9N2 viruses isolated from ostriches (*Struthio camelus*)” opublikowanej w lutym 2018r. w Nature - Scientific Reports, gdyż opisane szczepy H9N2 wyizolowane od strusi w latach 2013-2014, w przeciwieństwie do izolatów polskich, posiadały zdolność wiązania do  $\alpha 2, 6$  glikanów, wykazując tym samym możliwość przyłączania do receptorów ludzkich.

Zakażenie myszy jednym ze szczepów wykazało spadek masy ciała i zmniejszenie aktywności myszy, co potwierdza potencjalne zagrożenie podtypem H9N2 dla ssaków. Przedstawione wyniki badań Wang i wsp. (2018) podkreślają słuszność i aktualność badań Doktorantki w aspekcie możliwości transmisji wirusa H9N2 z ptaków na ludzi. Zakładam, iż nieuwzględnienie w dyskusji wspomnianej powyżej pozycji wynika z faktu, iż ukazała się ona po napisaniu dysertacji, sugeruję więc uwzględnienie tej pracy w przypadku przygotowywania kolejnych publikacji.

Stwierdzam, iż zaprezentowane wnioski zostały wyciągnięte w sposób adekwatny do uzyskanych wyników badań.

Mimo braku odniesienia do wyników badań Wang i wsp., bogaty wykaz piśmiennictwa krajowego i zagranicznego liczący 220 pozycji świadczy o zdolności

Doktorantki do wyboru prac odpowiednich do analizy uzyskanych wyników i dyskusji w ramach tematyki, będącej przedmiotem badań. Zamieszczone w ostatniej części pracy syntetyczne streszczenie w języku polskim i angielskim oraz załączniki w postaci tabel są bardzo dobrym uzupełnieniem pracy.

W mojej ocenie rozprawa mgr Edyty Świętoń stanowi wartościowe opracowanie naukowe dotyczące aktualnego problemu badawczego, a zastosowanie różnorodnych metod badawczych świadczy o dogłębnej analizie podjętego tematu. Praca bez wątpienia zawiera elementy innowacyjne i odpowiada wymogom naukowym i formalnym stawianym rozprawom doktorskim. Biorąc pod uwagę istotność grypy ptaków zarówno w aspekcie produkcji drobiarskiej jak i zdrowia ludzi, pracę należy zaliczyć do prac o dużej wartości poznawczej.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednakże zwrócić uwagę na następujące niedociągnięcia:

- 1) Uważam, iż obszernie opisane czynniki zjadliwości (hemaglutynina, neuraminidaza, NS1, kompleks polimerazy, M2) powinny znaleźć się w podrozdziale 1.1 dotyczącym budowy wirusa, nie w podrozdziale 1.4. o patobiologii zakażeń wirusem grypy.
- 2) Sugeruję aby w podrozdziale 1.3 „Wstępu” umieścić krótki opis techniki głębokiego sekwencjonowania. Informacja, iż w technice głębokiego sekwencjonowania ta sama pozycja genomu jest sekwencjonowana kilkanaście tysięcy razy i dzięki temu możliwe jest wykrycie w próbce wariantów – w tym przypadku wirusa grypy znalazła się w pracy, natomiast nie we „Wstępie”, a w rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja”.
- 3) W podrozdziale 3.2 należałoby doprecyzować „przebadanie indyków według procedur ZCHD” w kierunku szeregu patogenów – czy ograniczono się do badań RT-PCR, czy wykonano również test ELISA jak w przypadku grypy?
- 4) Ile ptaków doświadczalnych zakupiono? skąd różnica w liczbie przepiórek „kontaktowych” w porównaniu z pozostałymi gatunkami?
- 5) Należałoby doprecyzować także opis zakażenia - czy ptaki, które zostały zakażone dospojówkowo i donosowo, otrzymały po 0,1ml izolatu do worka spojówkowego i do nosa, czy 0,1ml była to całkowita ilość, którą podano zwierzęciu (podobnego doprecyzowania wymaga opis zakażenia kur SPF w podrozdziale 3.4)
- 6) Jaki był sposób eutanazji indyków, przepiórek i kur?

- 7) Jakie były dalsze losy zakażonych kur SPF po pobraniu wymazów (3 dzień po zakażeniu)? Czy były utrzymywane i obserwowano przebieg zakażenia, czy ptaki uśmiercano?
- 8) W rozdziale 4.1 czytelniejsze byłoby oznaczanie na drzewach filogenetycznych izolatów polskich w ten sam sposób – w tym przypadku czerwonym kolorem jak na Ryc. 6. Na rycinach 7 i 8 są one pogrubione, gdy tymczasem na wcześniejszej rycinie pogrubieniem oznaczono izolaty niemieckie.
- 9) Czy w przypadku padłego w grupie doświadczalnej indyka wykonano dodatkowe badania mikrobiologiczne lub histopatologiczne celem wykluczenia innych przyczyn śmierci ptaka, aniżeli zakażenie wirusem grypy?
- 10) Dodatkowo w pracy, głównie w rozdziałach „Wstęp” i „Omówienie wyników i dyskusja” znalazło się kilka zdań wymagających przeredagowania – składnia wskazuje na bezpośrednie przełożenie z języka angielskiego ( str. 24, 25, 27, 28, 29, 98, 101, 110)
- 11) Ponadto stwierdzono kilka niefortunnych sformułowań np. „zarodki padłe”, zamiast „zamarłe zarodki” (str. 31) „prążki DNA” zamiast „produkty reakcji PCR”(str. 47), „przynosi korzyść dla wirusa” zamiast „jest korzystne” (str. 98).
- 12) Nazwa bakterii *E. coli* powinna być napisana kursywą (str. 102-104).
- 13) Dodatkowo pojawiły się nieliczne błędy literowe oraz niepełne dane bibliograficzne jednej z pozycji piśmiennictwa (pozycja 79).

Mimo wspomnianych drobnych niedociągnięć uważam, iż badania mgr Edyty Świętoń wnoszą istotny wkład zarówno w zakresie epidemiologii grypy ptaków, jak i ewolucji molekularnej oraz zmian adaptacyjnych wirusa. Są to jedne z pierwszych badań analizujących izolaty AIV H9N2 zarówno pod kątem filogenetycznym, adaptacyjnym jak i zoonotycznym. Poza oczywistym dużym aspektem poznawczym, należy podkreślić charakter aplikacyjny badań – ocena zjadliwości wirusów po pasażach może być pomocna w ustalaniu nowych wytycznych zabezpieczania stad drobiu przed zachorowaniem. Wyniki badań mgr Świętoń rzucają więc światło nie tylko na zagrożenia związane z zakażeniami wirusem grypy stad drobiu, ale również są źródłem informacji w aspekcie zdrowia publicznego.

Część wyników rozprawy doktorskiej, mgr Edyta Świętoń zawarła w pracy „Genetic characterization of H9N2 avian influenza viruses isolated from poultry in Poland during 2013/2014” opublikowanej w 2018 roku na łamach czasopisma *Virus Genes* (IF 1,5).

Doktorantka jest również współautorką kilku prac z zakresu grypy ptaków – zarówno dotyczących występowania zakażeń jak i analiz molekularnych.

Reasumując, aktualność poruszonego problemu badawczego, jego innowacyjność, nowoczesny i rzetelny warsztat badawczy, rzetelność przy opracowywaniu wyników badań oraz przeprowadzona z dużym znawstwem dyskusja i wyciągnięcie właściwych, adekwatnych do uzyskanych wyników wniosków, sprawiają iż zaprezentowana dysertacja należy do prac wyróżniających się.

Z wielką przyjemnością stwierdzam że prezentowana dysertacja pt.: „Ocena zmienności genetycznej oraz patogenności wirusa grypy ptaków podtypu H9N2 u wybranych gatunków drobiu” odpowiada wymogom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Przedkładam Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Edyty Świętoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Dr hab. Andrzej Gaweł prof. nadzw.

