

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr. Natalii Mazur-Panasiuk**

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Wpływ czynników środowiskowych na przeżywalność i szerzenie się wirusa afrykańskiego pomoru świń oraz analiza genomu szczepów wirusa

Afrykański pomór świń (ASF) jest chorobą o wysokiej śmiertelności zwierząt dochodzącej do 100%. Obecnie jest to ogromny problem dla przemysłu mięsa wieprzowego na całym świecie i powoduje ogromne skutki finansowe dla gospodarki wielu państw. Epidemia ASF rozpoczęła się w 2007 r. w Grecji i w ciągu kilku lat opanowała Europę i Azję. W Polsce pierwsze przypadki ASF zidentyfikowano w 2014 r., a obecnie choroba świń i dzików występuje w kilku województwach Polski. Zaawansowane badania nad zmiennością, przeżywalnością oraz genetycznym uwarunkowaniem aktywności wirusa ASF są prowadzone w Zakładzie Chorób Świń, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach i są przedmiotem przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr. Natalii Mazur-Panasiuk. Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem naukowym Pana promotora dr hab. Grzegorza Woźniakowskiego, profesora instytutu oraz dr. hab. Jacka Żmudzkiego, profesora instytutu. Tematyka rozprawy doktorskiej mgr. N. Mazur-Panasiuk dotyczy niezwykle ważnego problemu identyfikacji genetycznej wirusa afrykańskiego pomoru świń, jego zmienności i wrażliwości na czynniki środowiskowe oraz znaczenia gospodarczego zakażeń tym wirusem, co jest kontynuacją badań prowadzonych w Zakładzie Chorób Świń.

Dorobek naukowy mgr. Natalii Mazur-Panasiuk to trzy oryginalne, powiązane tematycznie prace badawcze opublikowane w latach 2019-2020 w liczących się czasopismach naukowych z Listy Filadelfijskiej: *Scientific Reports* IF=4.122, *Archives of Virology* IF=2.16 i *Veterinary Microbiology* IF=2,791. Na rozprawę doktorską składa się również praca przeglądowa opublikowana w *Journal of Veterinary Research* IF=0.829). We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co wskazuje na Jej

dominujący (75 – 85%) udział w wykonaniu doświadczeń laboratoryjnych, interpretacji otrzymanych wyników oraz opracowaniu i korekcie manuskryptów.

Sumaryczny IF publikacji wynosi 9,9 oraz 310 pkt. MNiSW.

W skład ocenianej rozprawy doktorskiej wchodzi obszerny **Wstęp** dotyczący historii zakażeń wirusem ASF na świecie, budowy strukturalnej i funkcjonalnej genomu ASFV oraz zmienności genetycznej wirusa ASF. We **Wstępie** przedstawiono także objawy kliniczne afrykańskiego pomoru świń, metody diagnostyki laboratoryjnej oraz oporność ASFV na czynniki fizyko-chemiczne. Poznanie sekwencji genomu DNA wirusa pozwoliło na identyfikację kilku markerów molekularnych wirusa krążącego w Eurazji. Zsekwencjonowano kilkadziesiąt genomów ASFV co umożliwiło wykazanie niskiej zmienności tych genomów rzędu 99.9%.

Chciałabym zaznaczyć, że **Wstęp** napisany jest bardzo dobrze i zawiera wiele ciekawych informacji dla czytelnika zarówno o samym wirusie ASF, jak też tych dotyczących szerokich badań nad znaczeniem epidemiologicznym zakażeń świń i dzików wirusem ASF na całym świecie.

W dalszej części rozprawy Doktorantka przedstawiła **Cel** i zakres badań, metodykę i wyniki badań opublikowane w kolejnych trzech pracach składających się na rozprawę. Rozprawę kończą najważniejsze **Wnioski** wynikające z badań eksperymentalnych, **Streszczenie**, także w języku angielskim, oraz **Piśmiennictwo**.

Głównym celem badań przedstawionych w pracy doktorskiej mgr. N. Mazur-Panasiuk było zbadanie wpływu czynników środowiskowych na przeżywalność ASFV w różnych tkankach zarażonych świń i dzików oraz charakterystyka genetyczna izolatów ASFV z użyciem techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Doktorantka przedstawiła poszczególne etapy badań opublikowane w kolejnych publikacjach takie jak: **(i)** izolacja krajowych szczepów ASFV z hodowli pierwotnych makrofagów płucnych zakażonych świń oraz ustalenie wrażliwości linii komórkowej unieśmiertelnionych makrofagów płucnych świń na zakażenie ASFV, **(ii)** sekwencjonowanie DNA krajowych izolatów, porównanie uzyskanych genomów z dostępnymi w bazie GenBank, ustalenie częstotliwości mutacji i wytypowanie markerów molekularnych użytecznych w diagnostyce genetycznej ASFV, **(iii)** analiza występowania insercji nukleotydowej w genomach izolatów ASFV z lat 2014-2018 i ustalenie ich przydatności w śledzeniu rozprzestrzeniania choroby ASF w Polsce, **(iv)** określenie tempa inaktywacji wirusa ASF w szczątkach padłych zwierząt w zależności od temperatury i użytej do analizy tkanki, **(v)** oszacowanie wpływu czynników środowiskowych takich jak temperatura i otoczenie padłych zwierząt na przeżywalność ASFV.

W kolejnych rozdziałach rozprawy przedstawiono, poza **Metodyką**, ciekawy rozdział, czyli **Przebieg badań**, w którym Doktorantka opisuje szczegółowo metody i sposób realizacji zaplanowanych etapów badań opisanych w poszczególnych trzech publikacjach. Uważam, że ten sposób opisanie eksperymentów będzie niezwykle użyteczny dla następnych doktorantów.

Wyniki badań opublikowane w odrębnych pracach naukowych:

Praca 1. Stwierdzono, że tylko linie komórkowe pierwotnych makrofagów PPAM, a nie ciągłe linie komórkowe makrofagów IPAM umożliwiają izolację wirusa z materiałów zakaźnych. Uzyskano 12 izolatów o wysokim mianie. DNA otrzymany z tych izolatów został zsekwencjonowany metodą NGS, a pełną sekwencję genomową uzyskano z 7 izolatów. Genom ASFV zawiera 187-190 otwartych ramek odczytu. Krajowe izolaty ASFV wykazywały wysokie podobieństwo (99,9%) do genomu referencyjnego wirusa z Gruzji i 3 genomów wirusów izolowanych z aktualnej epidemii w Eurazji. Opisano także szereg mutacji punktowych i co bardzo ważne zidentyfikowano nieznaną wcześniej insercję o długości 14 nukleotydów, tworzącą tandemowe powtórzenia w genie O174L.

Praca 2. Wykryta insercja w genie O174L została wykorzystana w badaniach epizootycznych krajowych izolatów z lat 2014-2018. Na 46 izolatów wirusa, w 12 wirusach zidentyfikowano tę insercję. W analizie przestrzennej wykazano występowanie tej insercji w wirusach z różnych ognisk występujących w niewielkiej odległości od siebie, w kilku powiatach. Analiza filogenetyczna sekwencji genu O174L pozwoliła na wyodrębnienie podobnych genetycznie grup izolatów ASFV.

Praca 3. W tej pracy przedstawiono wyniki badań nad wpływem temperatury i warunków otoczenia na tempo inaktywacji wirusa w tkankach pobranych od padłych zwierząt chorych na ASF. ASFV okazał się stabilnym wirusem w niskiej temperaturze, poniżej 0°C i wrażliwym na wyższe temperatury otoczenia. W temperaturze 23°C wirus był niewykrywalny. Przeżywalność wirusa zależała też od podłoża np. stwierdzono duży spadek stabilności wirusa w tkankach przechowywanych w glebie, wodzie i ściółce leśnej.

Praca 4. Jest to praca przeglądowa i dotyczy głównie przeżywalności i odporności ASFV w różnych warunkach środowiskowych oraz roli pośredniego kontaktu w rozprzestrzenianiu się choroby ASF u zwierząt.

W obszernej **Dyskusji**, Doktorantka zwraca uwagę na ważny problem zakaźności i tempa szerzenia się choroby ASF na świecie przy braku szczepionki. Duża zmienność genetyczna wirusa ASF wymaga stosowania nowych technik sekwencjonowania genomów, co pozwala na identyfikację nowych markerów molekularnych użytecznych w badaniach

epidemiologicznych. Sekwencjonowanie genomów ASF w różnych krajach pozwoliło na szeroką analizę filogenetyczną wirusów i ustalenie zależności ewolucyjnych pomiędzy izolatami z różnych części świata. Analiza filogenetyczna wirusów wskazała na pewną odrębność i pokrewieństwo genetyczne izolatów polskich i ukraińskich w stosunku do innych izolatów. Również w obrębie krajowych izolatów zaobserwowano dwa odrębne kierunki ewolucji molekularnej. Szczególnie ważna jest analiza zmienności genomów izolatów ASFV, która pozwala na śledzenie drogi szerzenia się zakażeń w Polsce. Użytecznym markerem w analizie epizootycznej zakażeń okazała się insercja w genie O174L opisana przez Doktorantkę i dr hab. G. Woźniakowskiego. Z analiz epizootycznych wynika także kluczowa rola człowieka w szerzeniu się zakażeń ASF.

Inną drogę transmisji zakażeń trzody chlewnej stanowią szczątki padłych dzików, a ich usuwanie ze środowiska znacznie obniża poziom transmisji ASF. Przedstawione w rozprawie eksperymenty *in vitro* wykazały, że tempo inaktywacji wirusa w rozkładających się tkankach padłych dzików jest szybkie i zwiększa się ze wzrostem temperatury. Te badania podważały dotychczasowe informacje o dużej oporności wirusów ASF na warunki środowiska. Należy podkreślić, że te badania, po raz pierwszy, pozwoliły na wyznaczenie matematycznego modelu inaktywacji ASFV podczas rozkładu tkanek, co jest ważne w ocenie ryzyka zakażeń. Obserwuje się, że zakażenia w stadach świń charakteryzują się sezonowością, co nadal wymaga naukowego wyjaśnienia.

W podsumowaniu, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr. Natalii Mazur-Panasiuk** prezentuje wysoki poziom naukowy, szeroką wiedzę Doktorantki i umiejętność ciekawego opisanie swoich osiągnięć i wiedzy. Przedstawiono bardzo interesujące wyniki uzyskane m.in. z zastosowaniem metod molekularnych, co pozwoliło na uzyskanie nowych informacji dotyczących zarówno choroby afrykańskiego pomoru świń, jak i samego wirusa AFSV. Przedstawione wyniki zostały w całości opublikowane.

Moje pytania do Doktorantki;

1. W przypadku ASFV zwraca uwagę wysoka specyficzność zakażeń – chorują tylko świnie i dziki. Czy są znane badania nad genetycznym uwarunkowaniem tej specyficzności (geny)?
2. Czy sezonowość zakażeń ASF występuje także w krajach gdzie różnica temperatur w ciągu roku nie jest duża, np. Afryka?
3. Jak jest z tempem szerzenia się zakażenia ASF? W Dyskusji (str. 33) jest napisane, że jest to „wolno-szerząca się choroba świń”. W dalszej części mówi się o szybko szerzącej się w Europie chorobie ASF.

W mojej ocenie, przedstawiona praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Zwracam się do Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z wnioskiem o dopuszczenie Pani **mgr. Natalii Mazur-Panasiuk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego i przyjęcie rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową, znaczenie poznawcze i praktyczne rozprawy, składam wniosek do Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Anna Skorupska