

Warszawa, 2020.05.27

Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk  
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej  
Zakład Chorób Ptaków, Zwierząt Egzotycznych i Ryb  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
02-786 Warszawa  
ul. Ciszewskiego 8

## RECENZJA

rozprawy Doktorskiej

**mgr Anny Lisowskiej pod tytułem**

### **„CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA I OCENA PATOGENNOŚCI SZCZEPÓW VAR2 WIRUSA ZAKAŻNEGO ZAPALENIA OSKRZELI KUR”**

Oceny dokonano na zlecenie Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zgodnie z jej uchwałą z dnia 27 04 2016 roku, na podstawie materiałów przekazanych przez Pana prof. dr. hab. Dariusza Bednarka przewodniczącego Komisji Doktorskiej (Nr pisma BRN-410/3/20).

#### **Wstęp**

Z perspektywy ponad 40 lat zajmowania się immunoprofilaktyką chorób drobiu mogę stwierdzić, że w ostatnich 10 latach najwięcej problemów w krajowej praktyce awiopatologicznej sprawia podjęcie racjonalnej decyzji o programie szczepień przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, zarówno w stadach brojlerów kurzych, jak i stadach długożyjących kur (stada rodzicielskie kur i nioski jaj konsumpcyjnych).

Wykazane w badaniach Zakładu Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, znaczne rozprzestrzenienie u kur w kraju, zakażeń wirusem zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV), skłoniło naukowców tej placówki do podjęcia prób nad uzyskaniem krajowych szczepionek przeciwko IBV. Doktorantka wspomina o tym we wstępie, ale z pewnością warto podkreślić, że było to przedmiotem licznych publikacji Zespołu i tematem pracy doktorskiej Pani Doktor Ewy Karpińskiej (*Karpińska E., Karczewski W.: Optymalne warunki namnażania szczepów H-120 i H-20 wirusa IB. Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław, 627, 1978; Karpińska E., Karczewski W.: Próby uzyskania i konserwacji surowicy diagnostycznej przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli kur do odczynu precypitacji w żelu agarowym. Medycyna Wet. 32, 27, 1976; Karpińska E., Zadura J., Roszkowski J.: Badania nad patogennością i immunogennością szczepu H-52 wirusa IB dla 3-tygodniowych kurcząt. Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław, 628, 1978*). W tych badaniach określono optymalne warunki

namnażania szczepów szczepionkowych (H-52 i H-120), przeprowadzono cykl badań nad ich nieszkodliwością i skutecznością, wreszcie opracowano metodę produkcji i kontroli żywych szczepionek Iboral I i Iboral II (Producent Biowet Puławy) oraz wytyczne do szczepień profilaktycznych przeciwko IB w kraju. Za opracowanie dokumentacji tych szczepionek Zespół Instytutu otrzymał 2 nagrody I Stopnia Ministerstwa Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej w roku 1984 i 1985. Niestety preparaty te opracowane w ramach produkcji antyimportowej, szybko zniknęły z rynku i nie są stosowane. W latach następnych, w zależności od narastającego zagrożenia, programy szczepień przeciwko IB ulegały ewolucji, choć jeszcze około 15 lat temu (co wydaje się z dzisiejszej perspektywy trudne do zrozumienia) liczba Zakładów Wylęgu Drobiu szczepiących pisklęta była stosunkowo niska. Jak wspomniano wcześniej, początkowo dla kurcząt dostępne były, szczepionki zawierające atenuowany szczep Massachusetts wirusa IB (H-120 i H-52). Następnie zarejestrowano wariant 793 B (szczep 4/91). Po stwierdzeniu w kraju wariantu chińskiego w 2006 roku (Domańska - Blicharz i wsp., 2006) na rynku pojawiła się szczepionka zawierająca ten wariant. W roku 2016 oferta żywych szczepionek wariantowych poszerzyła się o bliskowschodni wariant Var2 IBV, co już wtedy wydawało się specjalistom nie do końca słusznym rozwiązaniem (Lisowska A., Domańska-Blicharz K.: *Pierwsze w Polsce przypadki bliskowschodniego wariantu Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur. Zdrowie Supplement Polskie Drobniarstwo, 2016*).

W praktyce liczba możliwych połączeń poszczególnych preparatów stosowanych w immunoprofilaktyce IB jest niezwykle szeroka. Brak jest dokładnych badań nad procentowym udziałem poszczególnych programów szczepień, ale według obserwacji recenzenta, w praktyce jest ich co najmniej kilkanaście. Wprowadzenie określonego programu najczęściej opiera się na intuicji lekarza i sugestiach przedstawicieli firm szczepionkowych. Jak się wydaje standardem jest szczepienie piskląt brojlerowskich w ZWD (z reguły Mass, dość często 793B, niekiedy QX). Następnie stada są szczepione różnymi szczepionkami, z reguły zawierającymi szczepy wariantowe, często w wodzie do picia, choć droga inhalacyjna jest coraz częściej preferowana. Niestety poza bardzo nielicznymi wyjątkami w krajowej praktyce awiopatologicznej nie jest prowadzona ocena skuteczności programów immunoprofilaktyki IB w stadach kurcząt brojlerów. Jest natomiast, coraz szerzej oceniana częstość występowania wariantów tego zarazka w ramach molekularnych przeglądów epidemiologicznych prowadzonych przez Państwowy Instytut Weterynaryjny – PIB i koncerny farmaceutyczne w ramach serwisu dla klientów stosujących szczepionki danej firmy. Nie ma ujednoczonej metodologii badań, stąd wynikają różnice w prezentowanych przez ich wykonawców wynikach.

Bez wątpienia zakażenia wariantem Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli były i są bardzo ważnym problemem zdrowotnym, dla intensywnej produkcji drobiarskiej, stąd ważność podjętych przez Panią Magister badań.

### **Ocena pracy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny praca doktorska „Charakterystyka molekularna i ocena patogenności szczepów Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur” została wykonana w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Domańskiej Blicharz, prof. nadzw. Instytutu. Odnotować należy, że o poziom merytoryczny rozprawy dbała także dr Katarzyna Podgórska – promotor pomocniczy.

Dysertacja posiada układ typowy dla opracowań na stopień naukowy i zawarta jest na 119 stronach uwzględniających 14 tabel, 25 rycin (w tym kolorowe fotografie kliniczne i opisujących zmiany mikroskopowe) oraz podzielona jest na następujące rozdziały: wstęp, cel, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, streszczenie, summary oraz piśmiennictwo.

Szata edytorska ocenianej rozprawy jest staranna i estetyczna, zawiera ona dobrej jakości oryginalne fotografie zarówno makro jak i mikroskopowe. Ogólne wrażenie z lektury dysertacji jest, pozytywne i można stwierdzić, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Anny Lisowskiej napisana jest poprawnym językiem, spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane opracowaniom na stopień naukowy doktora. Bardzo bogate i prawidłowo używane w tekście opracowania nazewnictwo fachowe świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Dotyczy to szczególnie części poświęconej badaniom eksperymentalnym na ptakach i analizie uzyskanych wyników badań molekularnych. Na korzyść Doktorantki przemawia i 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 156 publikacji jest w istocie wyborem wyselekcjonowanych pozycji literaturowych poświęconych IBV. Dobór piśmiennictwa wskazuje na dojrzałość naukową i umiejętność wyboru bardzo bogatej w zakresie zakaźnego zapalenia oskrzeli literatury źródłowej. Podkreślić należy, że Autorka wyselekcjonowała pozycje piśmiennictwa krajowego wybierając 8 Jej zdaniem, najbardziej reprezentatywnych prac. W tej liczbie wszystkie najważniejsze prace z tego zakresu wykonane zostały przez Zespół pod kierunkiem Pani Profesor Domańskiej Blicharz w latach w latach 2006 -2019.

Opiniowaną pracę doktorską rozpoczyna wstęp, obejmujący 17 stron, wprowadzający czytelnika w problematykę związaną z przebiegiem zakażenia wirusem zakaźnego zapalenia oskrzeli. Doktorantka w 10 podrozdziałach omawia w syntetycznej formie całość problematyki poczynając od historii choroby poprzez jej epidemiologię i zwalczanie. W pierwszym podrozdziale wstępu Pani Magister przedstawia ogólne dane na temat historii tej jednostki. Jak pisze, cytując de Wita i wsp. (2011) „Aktualnie w literaturze światowej opisano ponad 50 antygenowych lub genetycznych wariantów IBV”. To ważne stwierdzenie w aspekcie badań planowanych do wykonania i problemów jakie sprawia ten „wirusowy kameleon”. Przez lata koronawirus zakaźnego zapalenia oskrzeli był referencyjnym wzorcem rodziny *Coronaviridae*, ale od kilkunastu miesięcy systematyka tych zarazków bardzo się zmieniła, co Autorka szczegółowo omówiła. Zamieszczony na rycinie 1 „zrzut z ekranu” obrazujący pozycję taksonomiczną IBV jest mało czytelny i z pewnością lepszym z rozwiązaniem byłoby umieszczenie tych informacji w tabeli. W podrozdziale 3, stosunkowo rozbudowanym, Doktorantka omawia budowę wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli, przytaczając encyklopedyczne dane na temat struktury genomu i białek wirusowych, oraz cyklu replikacyjnego. Autorka wyjaśnia na zakończenie tego podrozdziału jakie są mechanizmy dużej zmienności genetycznej wirusa. Zasadnicze znaczenie mają tu mutacje (substytucja insercja, delecja) w obrębie genu kodującego glikoproteinę S.

Za najbardziej ciekawy rozdział wstępu można uznać fragment w którym autorka przedstawia patogenezę zakażeń IBV (1.4.). W rozdziale tym Doktorantka bardzo szczegółowo omawia wrażliwość gatunkową (kury, bażanty, pawie) na zakażenie wirusem IB. Porusza również, między innymi, istotny w praktyce problem możliwości pionowego przekazywania infekcji. Ważnym wskazaniem praktycznym jest również podkreślenie, że miejscem utrzymywania się wirusa są nerki co może mieć znaczenie przy pobieraniu próbek do badań diagnostycznych. Autorka szczegółowo omówiła również mechanizmy odporności indukowane przez wirus IB. Szczególnie uwzględniając kinetykę cytokin i wpływ zakażeń wirusowych na kształtowanie się immunokompetentnych limfocytów T. Jak podkreśla Doktorantka istotną rolę w przebiegu zakażenia tym koronawirusem odgrywa odporność humoralna. Obecność specyficznych przeciwciał wykorzystuje się szeroko w praktycznej diagnostyce zakażeń IBV. W kolejnym rozdziale Doktorantka bardzo krótko opisuje objawy kliniczne (rozdział 1.6.), by następnie przejść do opisu zmian makroskopowych i mikroskopowych przebiegu zakażenia wirusem IB. W rozdziale 1.7. Pani Magister podaje zarys zwalczania i zapobiegania zakażeniom wywołanym przez ten groźny patogen. Jest bardzo słuszne Jej ogólne stwierdzenie, że szczepienia i bioasekuracja stanowią podstawowe narzędzia

kontroli zakażeń wirusem IB. Za istotne należy uznać podkreślenie, rzadziej podnoszonego wątku, iż stosowanie szczepień obok niezaprzeczalnych zalet sprzyja niestety szybszej ewolucji wirusa i dodatkowo utrudnia prawidłową diagnostykę tej choroby. Za ciekawy fragment tego rozdziału można uznać rzadziej przedstawiany w opracowaniach historyczny fakt, o którym recenzent wspominał we wstępie, że w roku 1985 wprowadzono pierwsze szczepionki krajowej produkcji (Iboral 1 i Iboral 2), które jednak nie odniosły sukcesu marketingowego. Zmieniająca się sytuacja w zakresie nowych szczepów wirusa wymuszała potrzebę rozszerzenia protekcji poprzez wprowadzanie preparatów zawierających pojawiające się warianty wirusa IB. W maju 2016 roku dopuszczono w Polsce szczepionkę zawierającą wirus IB typu Var2, co jak podniesiono wcześniej, było sprawą dyskusyjną i miało swoje pozytywne i negatywne następstwa. W rozdziale 1.8. Doktorantka krótko opisała metody stosowane w diagnostyce laboratoryjnej zakażeń wirusem IB, zwłaszcza aktualnie wprowadzone metody molekularne wykrywania materiału genetycznego wirusa, podkreślając, że do pełnego i prawidłowego rozpoznania choroby wymagane jest przeprowadzenie badań wirusologicznych oraz serologicznych. Kończąc ciekawy i akademicko poprawny wstęp autorka bardzo umiejętnie przedstawiła zawiłości aktualnej klasyfikacji wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli. Obserwowany w ostatnich latach lawinowy przyrost informacji na temat budowy genetycznej izolatów tego zarazka powoduje ogromny chaos nomenklaturowy. Jest oczywiste, że w tym zakresie konieczne są dalsze badania, które być może uporządkują naszą wiedzę w tym zakresie, choć nie nastąpi to z pewnością bardzo szybko. Wiedza ta jest najpilniej potrzebna zwłaszcza w odniesieniu do mającego najważniejsze znaczenie w praktycznej immunoprofilaktyce choroby określenia właściwości protektotypowych poszczególnych szczepów IBV. Kończąc wstęp Doktorantka przedstawia krótką historię pojawienia się i rozprzestrzenienia epizootyki wywołanej przez szczep Var2 wirusa IB na świecie i kraju. W Polsce wariant ten został po raz pierwszy opisany w roku 2017 a jego izolacja w krajowym laboratorium był niezaprzeczalnym osiągnięciem Pani magister Lisowskiej a bardzo potrzebna charakterystyka szczepu Var2 była przedmiotem podjętych przez Nią badań w ramach recenzowanej pracy doktorskiej.

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

Cel badań (rozdział 2) jest z kolei bardzo krótko i jasno sprecyzowany w czterech punktach. Autorka stwierdza, że Jej zamiarem podczas realizacji pracy jest: „*Ocena rozprzestrzeniania szczepów Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur w Polsce*”. W trzech pozostałych celach Doktorantka zamierza dokonać charakterystyki molekularnej

krajowych szczepów Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli wyizolowanych z przypadków terenowych na podstawie genu S1 oraz całego genomu, określić zjadliwość *in vitro* wybranego szczepu Var2 IBV oraz, co jest szczególnie ciekawe i ważne z praktycznego punktu widzenia, określić jego właściwości protektotypowe. Wszystkie cele są z pewnością warte, aby je zrealizować zarówno w aspekcie naukowym i co bardzo istotne również praktycznym w świetle problemów na jakie napotyka krajowa patologia drobiu w ograniczaniu strat spowodowanych przez zakażenia wirusem zakaźnego zapalenia oskrzeli.

Trzeba zdecydowanie podkreślić, że każdy z obszarów, które Doktorantka badała wymagał wyspecjalizowanego warsztatu badawczego na najwyższym poziomie, który w kraju jest dostępny jedynie w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach!

Ponieważ recenzowana praca jest wielowątkowa i obejmuje szeroki zakres warsztatowy od doświadczeń *in vivo*, poprzez badania *in vitro* i bioinformatykę, opis badań wymagał podania licznych protokołów, w związku z tym Doktorantka wyróżniła w kolejnych 7 częściach podrozdziału 3 dysertacji opisy materiałów i metod zastosowanych przez nią przy realizacji doktoratu. Do oceny sytuacji epidemiologicznej w zakresie rozprzestrzeniania wirusa IBV wykorzystowała ona materiał biologiczny nadesłany do badań usługowych w Zakładzie Chorób Drobiu PIWet-PIB w Puławach w okresie styczeń 2016 - październik 2019. Jak wynika z informacji podanej w punkcie 4.1 rozdziału materiał i metody, w tym czasie autorka zbadała 189 stad drobiu. W opisie materiału do badań, zdaniem recenzenta powinna być podana bardziej szczegółowa charakterystyka materiału użytego do wykonania analiz co oczywiście nie jest łatwe w warunkach gromadzenia materiału usługowego. Pobrane z dostarczonych próbek materiał biologiczny był przygotowany do badań według standardowej procedury i użyty do badań wirusologicznych - izolacji wirusa na zarodkach kurzych SPF. Z uzyskanych próbek pozyskiwano również RNA, które wykorzystano do wykrywania obecności materiału genetycznego wirusa IB. Autorka podaje szczegółowy opis wykorzystanej metody Real Time RT-PCR. Warto podkreślić, że zastosowano tutaj akredytowaną przez Polskie Centrum Akredytacji w Zakładzie Chorób Drobiu PIWet-PIB, zwalidowaną procedurę tej metody. W celu dokładnej charakterystyki szczepów Var2 IBV Autorka zaproponowała panel starterów amplifikujących fragmenty genu kodującego białka wirusowej wypustki S o wielkościach pomiędzy 650-700 nukleotydów. Podała również zastosowany skład mieszaniny reakcyjnej PCR. Uzyskany materiał genetyczny poddano sekwencjonowaniu w laboratorium firmy Genomed Warszawa. Pani Magister szczegółowo opisuje zastosowane w analizie uzyskanych wyników protokoły bioinformatyczne. W opracowywaniu uzyskanych wyników (zbudowanie

drzewa filogenetycznego i przypisanie przynależności izolatów do poszczególnych rodów/genotypów wirusa IB) użyto 199 szczepów należących do 32 rodów pogrupowanych w 6 genotypach (GI-GVI) oraz 6 unikalnych (nie zakwalifikowanych do żadnej genogrupy - według rekomendacji twórców nowej taksonomii tego zarazka) wariantów IBV. Uwzględniono również inne dostępne szczepy tak, że łącznie do analizy porównawczej wykorzystano 207 izolatów. Autorka podaje również zestawienie szczepów uwzględnionych w analizie zmienności regionu kodującego S1 genu białka S szczepów Var2 wirusa IB. Ta część metodologii badawczej wskazuje na dużą biegłość mgr Anny Lisowskiej w zakresie badań genetycznych wirusów drobiowych i potwierdza, bardzo wysoki i w pełni profesjonalny poziom diagnostyki molekularnej w Zakładzie Chorób Drobiu PIWet-PIB. Zdaniem recenzenta za bardzo cenną i niezwykle interesującą część rozprawy doktorskiej należy uznać podjętą przez Doktorantkę próbę określenia patogenności IBV Var2 w warunkach *in vivo*. W badaniach tych, na których przeprowadzenie autorka uzyskała stosowną zgodę lokalnej komisji etycznej, wykorzystując ptaki w dwóch grupach wiekowych (1-dniowe pisklęta kurze i 3-tygodniowe kurczęta) określiła zjadliwość polskiego szczepu IBV Var2 (GI-23). Warto podkreślić, że zastosowany izolat IBV pochodził z klinicznego przypadku zakaźnego zapalenia oskrzeli u 6-tygodniowych brojlerów. U zakażonych ptaków w okresie 3 tyg. pobierano wymazy jako materiał do dalszych szczegółowych badań. Autorka podaje, że wymazy pobierano z „jamy ustnej i kloaki”, choć w tym przypadku bardziej właściwym określeniem byłoby z „jamy dziobowo - gardłowej i kloaki”. Doktorantka podaje dalej bardzo szczegółowy opis badań immunohistochemicznych wykrywających antygen IBV.

Równie ciekawa a z praktycznego punktu widzenia najbardziej istotna, była wykonana przez Panią Magister próba określenia protekcji poszczepiennej po kontrolnym zakażeniu IBV Var2. Szczegółowy opis postępowania w badaniu tej protekcji i zastosowane programy profilaktyczne Autorka zwizualizowała na ryc.4. W badaniach porównawczych, co należy uznać za właściwe, zastosowano komercyjne szczepionki i schematy ich stosowania najczęściej używane w krajowej immunoprofilaktyce IB w stadach kurcząt brojlerów. Zaszczepione według różnych schematów ptaki podano challengowi polskim izolatem IBV Var2 Gamma CV/Ck/Poland/GO52/2016. W badaniach zastosowano powszechnie zalecany do oceny protektotypowej test ciliostazy, co umożliwia porównanie wyników badań Autorki z danymi piśmiennictwa.

Kolejny rozdział dysertacji omawiający uzyskane wyniki jest jej najobszerniejszym rozdziałem (42 str.), bardzo zróżnicowanym pod względem formy, w zależności od rodzaju wykonanych badań, jednak bardzo wiarygodnie i poprawnie przedstawia on dokonania

Doktorantki. Zgrupowanie wyników w 4 podrozdziałach ułatwia śledzenie uzyskanych danych. Bardzo ciekawy i oryginalny jest podrozdział 4.1. w których Pani Magister ocenia występowanie wirusa IB Var2 w polskiej populacji kurcząt brojlerów i niosek jaj konsumpcyjnych. Z pośród 189 stad drobiu obecność genomu IBV stwierdzono w ponad 84% stad, dominującym szczepem był wariant 793D, który stanowił ponad 48% wszystkich wykrytych izolatów. Na drugim miejscu plasowały się szczepy Var2, które zidentyfikowano w 28,3% stad. Oceniając częstość występowania wariantu Var2 w poszczególnych latach Autorka wykazała, że największą ich liczbę wykrywano w roku 2016 z postępującym spadkiem liczby izolatów w latach następnych. Bardzo ciekawe zestawienie zawiera tabela 7 przedstawiająca rodzaj użytkowania kur, wiek oraz miejsce pochodzenia stad.

W zdecydowanej większości ten typ wirusa IB izolowano z materiału pobranego ze stad kurcząt brojlerów, zwykle między 4 a 6 tyg. życia. Identyfikowała go również w stadach kur reprodukcyjnych zarówno w okresie odchowu jak i nieśności. Szczepy IBV Var2 występowały we wszystkich województwach, w których prowadzona jest intensywne produkcja drobiarska. Przedstawione wyniki należy uznać, za niezwykle istotne osiągnięcie Autorki. Jak wspomniano wcześniej są dostępne rezultaty epidemiologicznych badań molekularnych nad charakterystyką populacji wirusów IB prezentowane przez przedstawicieli firm farmaceutycznych działających w kraju, jednak rezultaty uzyskane przez doktorantkę są bardziej reprezentatywne. Co ciekawe przy podjętej próbach izolacji wirusa IBV Var2 na zarodkach kurzych SPF wynik dodatni uzyskano w przypadku 7 stad.

Charakterystyka molekularna krajowych szczepów IBV Var2 pozwoliła na stworzenie sekwencji polskich szczepów terenowych tego wariantu zarazka, które Pani Magister zarejestrowała w bazie danych GenBank, wzbogacając tym samym dorobek nauki światowej. Bardzo ważną częścią badań molekularnych wykonanych przed Doktorantką była analiza filogenetyczna regionu kodującego S1 łącznie 32 polskich szczepów IBV Var2. Jest ciekawe, że wszystkie te szczepy należały do grupy 1 liczącej w sumie 49 wirusów izolowanych w Rumunii, Turcji i Egipcie. Otrzymane na podstawie sekwencji nukleotydów sekwencje aminokwasowe polskich szczepów wskazują, że znajduje się w nich wiele zmienionych aminokwasów w porównaniu do szczepu szczepionkowego stosowanego w kraju (Tabic Var206). W dalszej części tego podrozdziału Autorka szczegółowo omawia wyniki analizy filogenetycznej całego genomu oraz analizę dotyczącą możliwości powstania polskiego szczepu IBV Var2 w wyniku rekombinacji. Stwierdzono, że rekombinacja miała wielokrotnie miejsce ale tylko jedno zdarzenie można było uznać za statystycznie istotne i w tym przypadku wstawka pochodziła z europejskich i chińskich szczepów wariantu QX.



Badania patogenności krajowego izolatu IBV Var2 potwierdziły jego zjadliwość i wystąpienie wyraźnych objawów klinicznych u ptaków obu grup wiekowych choć w grupie ptaków zakażonych, jako 3-tygodniowe, przebieg choroby miał zdecydowanie łagodniejszy charakter. Autorka szczegółowo opisała zmiany sekcyjne, dokumentując je ciekawymi choć niekiedy mało wyraźnymi fotografiami zmian anatomopatologicznych. Użyty do zakażenia wirus IB wpływał negatywnie na masę ciała zainfekowanych ptaków i powodował bardzo charakterystyczne zmiany histopatologiczne w badanych narządach wewnętrznych. Zmiany te były, zdecydowanie wyraźniejsze u ptaków zakażonych w 1 dniu życia. Autorka przedstawiła interesujący materiał fotograficzny obrazujący charakter zmian histopatologicznych (11 preparatów). Obecność antygeny w tkankach zakażonych kurcząt wykrywano głównie w komórkach nabłonka tchawicy, płucach i nerkach. Doktorantka zobrazowała wyniki uzyskane badaniu immunocytohistochemicznym na 6 mikrofotografiach.

Jak wskazano wcześniej wykonane przez doktorantkę badania protekcji krzyżowej po zastosowaniu różnych programów immunizacji były bardzo interesujące. Uzyskane wyniki winne być, jak najszerszej rozpropagowane wśród krajowych awiopatologów, jako obiektywny miernik efektywności najczęściej stosowanych w Polsce programów szczepień przeciwko IB w warunkach zagrożenia krajowym izolatem wariantu izraelskiego wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli. Za niezwykle ważną praktyczną informację można uznać fakt, że w badaniach Doktorantki nie stwierdzono w żadnej ze szczepionych grup objawów klinicznych. Protekcja indukowana przez podanie szczepionki Ma5 w 1 dniu życia oraz 1/96, dwa tyg. później wyniosła 70% natomiast kombinacja Ma5 oraz D388 w tych samych dniach życia, była mniej efektywna i protekcja wynosiła 60%. Podobną ochronę indukowała szczepionka 793D podana w pierwszym dniu życia. Z kolei sama szczepionka QX podana w pierwszym dniu życia indukowała protekcję na poziomie 50%. Najniższą ochronę (30% protekcję) uzyskano po podaniu w pierwszym dniu życia jedynie szczepionki zawierającej klasyczny (Mass) szczep Ma5.

Rozdział piąty „Omówienie wyników i dyskusja” to próba oceny własnych badań Autorki na tle światowego piśmiennictwa. Cytując dane literaturowe Pani Magister stara się odnieść uzyskane wyniki badań własnych do rezultatów innych autorów. W kilku miejscach wskazuje Ona na oryginalność podjętych przez siebie tematów i niewątpliwie Jej badania nie znajdują odpowiednika w krajowym piśmiennictwie.

Generalnie można stwierdzić, że Doktorantka wykazując się dużą wiedzą na temat dotychczasowego stanu badań nad wirusowym zapaleniem oskrzeli kur, sprawnie konfrontuje je z uzyskanymi wynikami własnymi. W kilku miejscach Pani Magister powołuje się na

informacje uzyskane dzięki osobistym kontaktom z międzynarodowymi specjalistami zajmującymi się IB, co potwierdza Jej dobrą znajomość aktualnych zagadnień związanych z badaniami nad tym patogenem i aktywną obecność w środowisku specjalistów z tego obszaru.

W rozdziale tym znalazł się dość obszerny fragment rozpoczynający się w od 15 wiersza od dołu na stronie 87 i kończący się na ostatnim wierszu strony 88, który moim zdaniem powinien być przeniesiony do rozdziału „Wstęp”, bowiem historia rozprzestrzeniania się wirusa IB w kraju nie była związana bezpośrednio z badaniami Doktorantki.

Realizując pierwszy cel pracy Autorka przedstawiła wyniki badań uzyskanych w okresie 3 lat i 10 miesięcy obserwacji, stwierdzając, że bardzo charakterystycznym zjawiskiem, który obserwuje się od 2017 roku jest wyraźnie widoczny spadek liczby próbek dostarczanych do Zakładu Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, co Jej zdaniem, wydaje być konsekwencją wdrożenia przez PIWet-PIB bezwzględnego obowiązku rejestracji ognisk IB (formalnie wymóg ten obowiązuje od 3 grudnia 2013 roku). Charakterystycznym i stale nasilającym się zjawiskiem jest także fakt wysyłania próbek z krajowych ferm drobiu do laboratoriów zagranicznych. Z punktu widzenia efektywności zwalczania zakażeń wirusem IB w kraju wydaje się, że rejestracja ognisk choroby jest podstawowym i niezbędnym warunkiem opracowania skutecznych programów zwalczania. Straty, jakie ponosi polskie drobiarstwo z powodu tej choroby nakazuje specjalistom, by takie badania wykonywać w kraju i zgłaszać potwierdzone ogniska zakaźnego zapalenia oskrzeli powiatowym lekarzom weterynarii. Nie jest to jednak wciąż bardzo powszechną praktyką.

W zdecydowanej większości (73,8%) zakażenie IBV Var2 w Polsce dotyczyło kurcząt brojlerów. Autorka w tym fragmencie rozdziału 5 dysertacji niepotrzebnie częściowo powtarza informacje opisane wcześniej w rozdziale „Wyniki”. Drugim celem pracy doktorskiej była charakterystyka molekularna krajowych szczepów Var2 na podstawie budowy genu S1 oraz całego genomu. Analiza filogenetyczna potwierdziła przynależność wszystkich badanych 32 szczepów do genotypu G1 w linii 23. Autorka powtarza również fragmenty informacji wcześniej podanych w rozdziale czwartym pracy. Analiza uzyskanych przez Doktorantkę danych wyraźnie potwierdza, że wirusy rodu G1 - 23 podlegają zmianom ewolucyjnym widocznym dla poszczególnych grup filogenetycznych. Intersujące jest zwłaszcza wysoka homologia regionu kodującego białko S polskich szczepów IBV i szczepów koronawirusów izolowanych od ptaków dzikich w Egipcie, co może wskazywać na potencjalne źródło transmisji zakażenia. Autorka podkreśla, że polskie szczepy wykazywały się bliskim podobieństwem z regionu kodującego S1 ze szczepem szczepionkowym Tabic Var206. Słusznie zauważa, że wprowadzenie tej szczepionki spowodowało prawdopodobnie korzyści

produkcyjne, jednak przyczyniło się do wprowadzenia dużego chaosu w zakresie diagnostyki. Podkreśla również, że budzi wątpliwości struktura szczepu szczepionkowego 2-06, co jest trudne do interpretacji i może być powodem pogłębiającym kłopoty diagnostyczne. Mgr Lisowska zaproponowała, aby cechą charakterystyczną odróżniającą szczepy terenowe od szczepionkowego Tabic Var206 była obecność seryny (S) w pozycji 122 rejonu hyperzmiennego (HVR2). To jest bardzo ważna i konkretna propozycja, którą należy uznać za istotne osiągnięcie wynikające z wykonanych badań. Jak Autorka wspominała wcześniej, wszystkie badane szczepy są rekombinantami. Fakt, że udało wyosobnić się w tylko 7 izolatów wirusa IBV Var2 na zarodkach kurzych SPF wynika z właściwości tego patogenu, który stosunkowo trudno się namnaża. Nie można jednak wykluczyć na taki rezultat negatywnego wpływu pobrania i transportu pobranych próbek.

Pani Magister odniosła się również do wyników zakażenia eksperymentalnego wskazując że ptaki starsze są mniej wrażliwe na zakażenie IBV Var2. Konfrontuje te rezultaty z wynikami badań innych autorów, którzy potwierdzili taką samą zależność Autorka wyjaśnia dlaczego w warunkach terenowych bardzo często obserwuje się ostrą postać choroby, której towarzyszy wysoka śmiertelność, u 4-6 tyg. kurcząt, tłumacząc, że przebieg kliniczny infekcji obok zjadliwości IBV zależy w znacznym stopniu od innych czynników w tym warunków zootechnicznych, a także obecności innych towarzyszących czynników zakaźnych (immunosupresja wirusowa).

Omawiając wyniki badań nad określeniem stopnia protekcji indukowanej przez różne programy szczepień Autorka przytacza również wyniki innych autorów, które wskazują na skuteczność immunoprofilaktyki IB wykorzystującej zjawisko odporności protektotypowej. Uzyskane przez Autorkę dane potwierdzają, że szczepionki dostępne przed wystąpieniem pierwszych przypadków IBV Var2 w Polsce indukowały równie wysoką protekcję co szczepionka homologiczna. Warto zacytować niezwykle istotną uwagę Pani Magister, że *„Większa uwagę i dbałość należy poświęcić samemu procesowi przygotowania szczepionki i jej aplikacji”*. Szczepionką należy w taki sposób aby jak największa liczna ptaków otrzymała wymaganą dawkę. Nieodpowiednia technika szczepienia może powodować obniżony poziom protekcji lub jej opóźnienie.

W odróżnieniu od celów pracy, który były lapidarnie sformułowane, rozdział „Wnioski” - ten bardzo istotny element pracy Doktorskiej, bardzo często krytykowany przez recenzentów, zawiera wnioski wyciągnięte przez Panią mgr Annę Lisowską, które są bardzo rozbudowane i stanowią w części powtórzenie uzyskanych wyników.

We wniosku pierwszym Pani Magister stwierdza, że szczepy Var2 wirusa IB stanowiły

ponad 28 % wszystkich zidentyfikowanych wirusów IB. Wniosek drugi informuje czytelnika, że wszystkie izolowane szczepy IBV miały wspólne pochodzenie, stosunkową niewielką zmienność sekwencji nukleotydowej regionu S1, potwierdzającą jednak dynamiczny charakter epidemii i ich postępującą ewolucję.

We wniosku 3 Autorka formułuje opinię że organizacja genomów polskich izolatów charakteryzowała się obecnością dodatkowych trzech genów białek pomocniczych, 4b-4c oraz 6b oraz dużą zmienność sekwencji nukleotydowej zwłaszcza w obrębie sekwencji genów N-4b oraz 6b. We wniosku 4 natomiast wskazuje, że wszystkie trzy szczepy Var2 posiadały wstawkę w obrębie genu 1 w wyniku rekombinacji homologicznej ze szczepem typu QX. W badaniach *in vitro* (punkt 5 wniosków) Autorka stwierdza, że badany szczep Var2 IBV był patogenny dla kurcząt SPF z wyraźnie zaznaczonym tropizmem do układu oddechowego i nerek oraz większą patogennością dla piskląt. Wyniki prac eksperymentalnych zaprezentowane przez Doktorantkę stanowią bardzo ciekawy punkt wyjścia do dalszych badań w tym zakresie.

Wniosek 6 wynika z badań nad określeniem protektotypii wybranego szczepu Var2. Jest istotną wartością pracy doktorskiej Pani Anny Lisowskiej, że próbowała odpowiedzieć na to pytanie w serii bardzo pracochłonnych i warsztatowo trudnych doświadczeń *in vivo*. Wniosek ten opisuje ważne osiągnięcie doktorantki, bowiem w dotychczasowych badaniach krajowych nie podejmowano eksperymentalnego zakażenia kurcząt objętych różnymi programami immunoprofilaktyki IB. Drugi punkt tego wniosku: „*Wprowadzenie do obrotu szczepionki homologicznej Var2 w Polsce nie było konieczne, gdyż zastosowanie odpowiedniego schematu szczepień daje podobną ochronę na zakażenie IBV Var2 zaś obecność w terenie dodatkowych szczepów tego samego typu zwiększa trudności w rutynowej diagnostyce zakaźnego zapalenia oskrzeli kur*”. Wydaje się być dość stanowczo sformułowanym, choć moim zdaniem nie pozbawionym racji, stwierdzeniem.

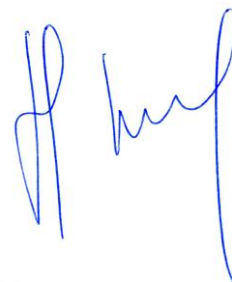
Po krytycznej analizie opracowania, z nadzieją, że uwagi i sugestie pomogą Autorce w poprawieniu dysertacji przy jej publikacji, stwierdzam, iż Pani mgr Anna Lisowska wykazała w pracy doktorskiej bardzo dobre przygotowanie merytoryczne do samodzielnego rozwiązywania postawionych celów badawczych.

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 Anny Lisowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Mając na względzie wartości poznawcze dysertacji i wysiłek włożony przez Doktorantkę w opanowanie tak szerokiego warsztatu badawczego wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.**

A handwritten signature in blue ink, consisting of two distinct parts. The first part is a stylized, vertical signature, and the second part is a more horizontal, cursive signature.