



UNIwersYTET  
PRZYRODNICZY  
WE WROCLAWIU

KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

Wrocław 14.04.2020r.

Prof. dr hab. Andrzej Gawęł  
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków  
i Zwierząt Egzotycznych  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Anny Lisowskiej „Charakterystyka molekularna i ocena patogenności szczepów wariantu Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Domańskiej-Blicharz, prof. instytutu i dr Katarzyny Podgórskiej

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 02.03.2020 roku, zgodne z uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętej w dniu 27.04.2016r.

Zakaźne zapalenie oskrzeli kur (Infectious bronchitis, IB) jest wysoce zakaźną chorobą wirusową o istotnym znaczeniu ekonomicznym. Wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV) jest koronawirusem należącym do rodzaju *Gammacoronavirus*, podrodzaju *Igacovirus* do którego należą ptasie koronawirusy. Ssacze koronawirusy należą natomiast do rodzajów *Alphacoronavirus* i *Betacoronavirus*. Ptasie koronawirusy są rozpowszechnione na całym świecie. Pierwszym poznany szczepem IBV był szczep Massachusetts, na bazie którego





stworzono pierwszą szczepionkę. Kilka lat później stwierdzono, iż wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli nie jest jednorodny i badania prowadzone do dnia dzisiejszego wykazały obecność ponad 50 antygenowych lub genetycznych wariantów IBV.

Na zakażenie IBV wrażliwe są kury i bażanty w każdym wieku niezależnie od płci. Przy naturalnym zakażeniu drogą oddechową okres wylęgania choroby wynosi około 36 godzin, a szerzenie się wśród wrażliwych ptaków trwa ok. 36-48 godzin. Wśród najczęściej notowanych objawów klinicznych obserwować można rzężenia, duszność, katar i problemy z układem oddechowym, a także gromadzenie wokół źródeł ciepła, apatię, a w przypadku kur nieśnych – spadek ilości znoszonych jaj.

W badaniu sekcyjnym, zależnie od powinowactwa wirusa do określonych narządów obserwować można liczne zmiany. U chorych kurcząt stwierdza się zmiany głównie w układzie oddechowym - rozpulchnioną błonę śluzową tchawicy z obecnością czopów o różnym charakterze - surowicznym, śluzowym lub serowatym. Przy zakażeniu typem 793B obserwuje się miopatię mięśni piersiowych, przy zakażeniu wariantem QX u ptaków w odchowcie - niedorozwój jajowodu, a przy zakażeniu szczepami nefropatogennymi – uszkodzenie nerek.

Jednym z wariantów, które przez lata opisywano jako lokalne, jest IBV Var2 zwany wariantem izraelskim, obecny w krajach Bliskiego Wschodu od ponad 20 lat. Szczepy wariantu izraelskiego są zdolne wywołać zmiany w układzie oddechowym i nerkach. Do niedawna Var2 nie występował w Polsce, ale od 2015 roku jest powszechnie notowany w kraju.

Magister Anna Lisowska podjęła wieloetapowe badania, mające na celu ocenę rozprzestrzenia szczepów Var2 w Polsce, charakterystykę molekularną krajowych szczepów Var2 na podstawie genu S1 oraz całego genomu, określenie zjadliwości *in vivo* wybranego szczepu Var2 IBV oraz określenie jego protektotypu.

Manuskrypt ocenianej rozprawy ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich i liczy 119 stron wydruku komputerowego. Obszerną dokumentację dysertacji stanowi 14 tabel i 25 rycin umiejętnie wkomponowanych w tekst rozprawy.

„Wstęp” obejmujący 16 stron składa się z 10 podrozdziałów i zawiera informacje dotyczące taksonomii wirusa IB, jego budowy, patogenezы zakażeń IBV, objawów klinicznych i zmian anatomo- i histopatologicznych, zwalczania i zapobiegania zakaźnemu zapaleniu oskrzeli



oraz informacje na temat diagnostyki laboratoryjnej i klasyfikacji szczepów IBV. Ostatni podrozdział wstępu omawia pokrótce występowanie Var2 IBV na świecie. 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 doktorskiej mgr Anny Lisowskiej były:

1. Ocena rozprzestrzenienia szczepów Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur w Polsce
2. Charakterystyka molekularna krajowych szczepów Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli wyizolowanych z przypadków terenowych na podstawie genu S1 oraz całego genomu
3. Określenie zjadliwości *in vivo* wybranego szczepu Var2 IBV
4. Określenie protektotypu wybranego szczepu Var2 IBV

Cele pracy zostały sformułowane jasno, precyzyjnie, a otrzymane wyniki poszerzają wiedzę na temat charakterystyki molekularnej i patogenności szczepu Var2 oraz dostarczają informacji na temat skuteczności szczepień protektotypowych.

Rozdział „Materiały i metody”, składa się z 7 podrozdziałów obejmujących tematy takie jak opis pobierania i przygotowania prób do badań, badania wirusologiczne i molekularne, ocenę patogenności wirusa Var2 w warunkach *in vivo* i protekcji przeciwko zakażeniom IBV Var2.

Techniki badawcze użyte przez Doktorantkę są różnorodne i nowoczesne - obejmowały izolację wirusa na zarodkach kurzych SPF, RT-PCR, nested PCR oraz analizę bioinformatyczną. Przeprowadzone zostały również doświadczenia na kurczętach SPF w celu określenia zjadliwości polskiego szczepu Var2 (gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016) oraz badania histologiczne i immunohistochemiczne pobranych od zakażonych ptaków tkanek.



Rozdział „Wyniki” jest najobszerniejszym rozdziałem, obejmującym 41 stron i jest podzielony na 5 podrozdziałów opisujących występowanie poszczególnych wariantów wirusa IB w latach 2016-2019. Szczepy Var2 były drugą najczęściej notowaną grupą wirusów IB (28,3%), przy czym najwięcej zakażeń tym wariantem notowano w 2016 roku.

Analiza genetyczna polskich izolatów IB Var2 na podstawie genu S1 wykazała, że należą one do jednej grupy filogenetycznej, ale obserwowana zmienność sekwencji (na poziomie 97%-100%) potwierdza ich ewolucję. Duża zmienność sekwencji polskich izolatów wykazana została w obszarze genów N (dla konserwatywnego białka nukleokapsydu) oraz 4b i 6b (dla białek niestrukturalnych). Przeprowadzona analiza rekombinacji dowiodła obecności wstawki w obrębie genu 1 (pol 1b) we wszystkich trzech badanych szczepach Var2 wprowadzoną do genomu w wyniku rekombinacji homologicznej ze szczepem typu QX. Badania na kurczętach SPF wykazały tropizm izolatu Var2 do układu oddechowego i wydalniczego oraz zmienną patogenność zależnie od wieku ptaków. Najwyższą śmiertelność i najbardziej wyraziste objawy kliniczne notowano po zakażeniu ptaków 1dniowych, gdy u ptaków w 3 tygodniu życia obserwowano tylko przejściowe objawy, bez śmiertelności. Określając protektotyp wybranego szczepu Var2 IBV wykazano, że szczepienia z użyciem szczepionek zawierających wirusy niehomologiczne (typu Mass -1 dzień życia) oraz typu QX i 793B -14 dzień życia) zapewniają protekcję krzyżową na zakażenie badanym izolatem Var2. Jest to niezwykle cenna obserwacja dla lekarzy praktyków układających programy profilaktyczne w stadach drobiu w Polsce. Zaprezentowane wnioski zostały wyciągnięte w sposób adekwatny do uzyskanych wyników badań.

Badania genetyczne wykazały znaczną homologię między polskimi izolatami Var2, Doktorantka podkreśla jednak, że „dotychczasowa wiedza nie pozwala na określenie, które części genomu modyfikują zjadliwość IBV, informacja o regionie kodującym S1 czy nawet sekwencjonowanie całego genomu nie określają patogenności danego szczepu (...) dlatego też podjęto próby określenia zjadliwości wyizolowanego szczepu IBV Var2 w warunkach *in vivo*”. Wnioskowanie, iż wprowadzenie do obrotu szczepionki homologicznej Var2 w Polsce nie było konieczne - słuszne w stosunku do uzyskanych przez mgr Lisowską wyników - może budzić



emocje i dyskusje w środowisku lekarzy praktyków. Ptaki doświadczalne zakażano tylko 1 izolatem - czy jest możliwe że zakażenie innymi izolatami Var2 dałoby odmienne wyniki dotyczące protekcji krzyżowej? Czy na podstawie wyników eksperymentu w którym ptaki zakażano 1 izolatem można wnioskować o celowości wprowadzenia szczepionki opartej na Var2 w całym kraju? Co więcej, obserwacje lekarzy praktyków w sposób jednoznaczny wykazują, iż profilaktyka w odniesieniu do Var2 z zastosowaniem szczepień protektotypowych w wielu wypadkach nie przynosi zadowalających rezultatów. Dopiero wprowadzenie szczepień homologicznych z zastosowaniem Var2 w pełni zabezpieczyło ptaki przed zachorowaniem.

Uzupełnieniem pracy jest liczący 156 pozycji wykaz piśmiennictwa krajowego i zagranicznego, świadczący o zdolności Doktorantki do wyboru prac odpowiednich do analizy uzyskanych wyników i dyskusji w ramach tematyki, będącej przedmiotem badań. Syntetyczne streszczenie w języku polskim i angielskim są bardzo dobrym uzupełnieniem pracy.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednakże zwrócić uwagę na następujące niedociągnięcia:

- 1) Z opisu w rozdziale Materiały i metody (podrozdziały 3.1-3.3) czytelnik mógłby wywnioskować, że w przypadku komercyjnych badań w kierunku zakażeń IBV w PIW-PIB w Puławach standardową procedurą jest najpierw namnażanie wirusa na zarodkach a następnie badania molekularne. Dopiero w podrozdziale 3.4.1 wspomniane jest iż do zarodka wprowadzano supernatant próbki terenowej w której stwierdzono wirusa (OIE 2018). Uważam, iż należy opisać również tą procedurę w podrozdziale 3.2. „Przygotowanie próbek do badań”.
- 2) Na rycinie 4 pojawił się skrót myślowy. Proponowałbym zamiast hasła „eutanazja i ciliostaza” podpis „eutanazja i ocena ciliostazy”
- 3) Rycina 6 składająca się z wykresu i tabeli ma niespójne dane. Np. wg wykresu słupkowego zakażeń w 2016 r. szczepów 793B było 39 a w tabeli jest wartość 36. Podobnie jest w przypadku QX (13/11) i innych szczepów (2/7). Być może potrzebny jest dokładniejszy opis tabeli.
- 4) Tabela 7 – pod tabelą należałoby wpisać dane bibliograficzne publikacji w której znajdują się podane sekwencje, bądź dołączyć jej numer ze spisu piśmiennictwa



5) Dodatkowo pojawiły się nieliczne błędy literowe i odmienna czcionka w przypisie piśmiennictwa oraz drobne błędy składniowe i opisowe (np. rozdział „Wnioski” podpisany jako streszczenie - prawy górny róg; „pierwszym zadaniem pracy była...” – powinno być „pierwszym celem pracy...”) (s 7, 14, 17, 19, 39, 45, 46, 71, 103, 104).

Mimo wspomnianych drobnych niedociągnięć uważam, iż badania mgr Anny Lisowskiej wnoszą istotny wkład zarówno w zakresie epidemiologii zakaźnego zapalenia oskrzeli, jak i ewolucji molekularnej wirusa. Są to jedne z pierwszych badań analizujących izolaty IBV Var2 w Europie.

Poza oczywistym dużym aspektem poznawczym, należy podkreślić charakter aplikacyjny badań – analiza molekularna i wykazanie zmienności wirusa oraz ocena zjadliwości wirusa u kurcząt immunizowanych według różnych programów profilaktycznych wnosi cenne informacje na temat zabezpieczania stad drobiu przed infekcjami IB Var2. Bardzo ważną obserwacją jest, iż zarówno immunizacja szczepionką opartą na Var2 jak i program profilaktyczny trzema produktami (zawierającymi Mass, QX i 793B) dają 100% protekcji, a pozostałe programy szczepień testowanych przez Doktorantkę dawały tylko częściową protekcję.

Podkreślić należy, że Doktorantka jest współautorką 4 prac o tematyce związanej z charakterystyką molekularną koronawirusów zarówno izolowanych od ptaków dzikich jak i drobiu, z czego jest pierwszym autorem w pracy opublikowanej w 2017 roku w *Virus Research* (IF 2,7) dotyczącej charakterystyki polskiego izolatu wirusa Var2 (GI-23).

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

Z wielką przyjemnością stwierdzam że dysertacja pt.: „Charakterystyka molekularna i ocena patogenności szczepów wariantu Var2 wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur” 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.



UNIwersytet  
Przyrodniczy  
we Wrocławiu

KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

Przedkładam Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Anny Lisowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą ze względu na: aktualność tematu badawczego, zastosowany nowoczesny warsztat badawczy oraz wartość aplikacyjną uzyskanych wyników badań.

Prof. dr hab. Andrzej Gaweł

