

Olsztyn 02.11.2020 r.

dr hab. Tomasz Stenzel, prof. UWM
Katedra Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Agnieszki Romanik-Chruścielewskiej pt. "Otrzymanie i charakterystyka cząstek wirusopodobnych parwowirusa kur oraz ich wykorzystanie w diagnostyce i profilaktyce chorób drobiu" wykonanej w Zakładzie Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie oraz w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierownictwem dr hab. Katarzyny Domańskiej – Blicharz, prof. instytutu

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 16 września 2020 r. (BRN – 410/9/20) zgodne z uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętą w dniu 17. 12. 2018 r.

Polska jest jednym z największych producentów drobiu na Świecie. W 2019 roku krajowa produkcja kurcząt brojlerów wynosiła około 1,5 mld co uczyniło nasz kraj liderem w Europie oraz dało nam trzecią pozycję na rynku światowym. W przypadku mięsa indyczego Polska przy produkcji 70 mln indyków rzeźnych zajmuje również pierwsze miejsce na podium rynku europejskiego. Znacząca jest również krajowa produkcja jaj konsumpcyjnych oraz mięsa drobiu wodnego (10 mln gęsi oraz około 20 mln kaczek). Polskie mięso drobiowe oraz jaja towarowe eksportowane są nie tylko na rynki europejskie, ale również i światowe, w tym do krajów azjatyckich. Pandemia związana z zakażeniami SARS-CoV-2 negatywnie wpłynęła na większość sektorów gospodarki, nie omijając również drobiarskiego, nie mniej jednak krajowa produkcja drobiu jest nadal niebagatelna.

Tak duże znaczenie produkcji drobiarskiej sprawia, że stada tych ptaków muszą być objęte profesjonalną opieką, sprawowaną przez wyspecjalizowanych lekarzy weterynarii która nie mogłaby być skuteczna gdyby nie opracowanie szybkich i czułych technik diagnostycznych oraz metod immunoprofilaktyki. Mimo wszystko chów ptaków na masową skalę boryka się z wieloma problemami zdrowotnymi wynikającymi nie tylko z istnienia czynników chorobotwórczych, ale bardzo często również z błędów w technologii chowu, w tym braku bioasekuracji. Brak lub nie przestrzeganie procedur bezpieczeństwa biologicznego prowadzi do rozprzestrzeniania się czynników zakaźnych nie przenoszonych drogą pionową. Takimi czynnikami są m.in. wirusy enteropatogenne. Enteropatie to stany patologiczne przewodu pokarmowego, które mogą być przyczyną wysokich strat ekonomicznych związanych niekoniecznie z padnięciami ptaków, czy ich leczeniem ale przede wszystkim z gorszego współczynnika konwersji, czyli słabszego wykorzystania paszy w przeliczeniu na kilogram przyrostu masy ciała oraz obniżenia końcowej wagi ptaków. Enteropatie to choroby dotykające drób grzebiący najczęściej na początku odchowu mogące być wypadkową zarówno pojedynczych jak i mieszanych zakażeń różnymi wirusami. Udowodniono to w badaniach krajowych, w których wykazano obecność materiału genetycznego zarówno astrowirusów, koronawirusów rotawirusów czy parwowirusów w próbkach jelit kur i indyków.

Obiektem zainteresowań badawczych doktorantki stały się aveparwowirusy drobiu grzebiącego. Aktualnie wirusy należące do tej grupy izolowane są od około 70 % zarówno kurcząt jak i indyków rzeźnych w USA, co przemawia za trafnym doбором obiektu badań. Nie mniej jednak wykazana w naszym kraju prewalencja zakażeń parwowirusami drobiu grzebiącego była niższa i wynosiła 22-29%, przy czym izolowano je nie tylko od ptaków z klinicznymi objawami enteropatii, ale również od ptaków całkowicie zdrowych. Izolacja tych wirusów od ptaków nie wykazujących objawów klinicznych utrudnia niestety wydanie jednoznacznej opinii dotyczącej ich patogenności. Powyższe utrudnia również brak metodyki namnażania tych wirusów w warunkach *in vitro*, co przekłada się na brak możliwości przeprowadzenia doświadczenia uwzględniającego zakażenie eksperymentalne, potwierdzające chorobotwórczość parwowirusów występujących u drobiu grzebiącego.

Mimo wszystko kluczowym elementem zwalczania zakażeń parwowirusowych poza prawidłową bioasekuracją ferm wydaje się opracowanie odpowiedniej strategii szczepień, a do tego z kolei niezbędne są metody oceny immunogenności antygenów. Ze względu na wspomniany wyżej brak możliwości namnażania parwowirusów drobiu grzebiącego w warunkach laboratoryjnych jedynym racjonalnym rozwiązaniem wydaje się uzyskiwanie

antygenów metodami inżynierii genetycznej. Kandydatem na takie antygeny są rekombinowane białka wirusów, które można uzyskiwać w różnych systemach ekspresyjnych. Białka te nie zawsze posiadają właściwą natywnej formie strukturę, ale jeśli tak to spontanicznie agregują, tworząc cząstki wirusopodobne - virus like particles (VLP). VLP stanowią bardzo ciekawą alternatywę dla klasycznych antygenów szczepionkowych, ponieważ morfologicznie przypominają one natywne wirusy, jednakże pozbawione są całkowicie materiału genetycznego. Wobec tego są doskonałym immunogenem ale jednocześnie są bezpieczne, ponieważ nie występuje w tym przypadku ryzyko rewersji patogenu do formy zjadliwej. VLP mają jeszcze jedną bardzo ważną zaletę, która bezpośrednio przekłada się na tematykę podjętą przez doktorantkę choć nie wspomina Ona o tym w ocenianej dysertacji. Zaletą tą jest potencjalne szybkie tempo uzyskania antygenów (zarówno diagnostycznych jak i szczepionkowych) wirusów charakteryzujących się dużą zmiennością genetyczną. Sekwencjonowanie pełnych genomów lub genów odpowiedzialnych za kodowanie białek antygenowych pozwala na zdobycie informacji niezbędnych do laboratoryjnego otrzymywania syntetycznych konstruktów nukleotydowych odpowiadających sekwencji konkretnych genów. W trakcie opracowywania takich konstruktów możliwe jest również optymalizowanie kodonów na potrzeby poszczególnych metod ekspresji. Dużo szybsze w tym przypadku w porównaniu z tradycyjnymi metodami hodowlanymi uzyskiwanie zróżnicowanych antygenów diagnostycznych, czy szczepionkowych umożliwia swoisty pościg za zmiennością antygenową mutującego w terenie zarazka. Ma to też częściowe przełożenie na tematykę podjętą przez Doktorantkę, bowiem cechą charakterystyczną wielu ssDNA wirusów, w tym również parwowirusów występujących u drobiu grzebiącego jest wysoki współczynnik mutacji genomu.

Mając na uwadze wszystkie przytoczone powyżej argumenty wysoko oceniam wybór tematyki badawczej ewaluowanej dysertacji, bowiem dotyczy ona nie tylko problemu niezwykle interesującego z naukowego punktu widzenia, ale również o dużym znaczeniu praktycznym i co najważniejsze o potencjale wdrożeniowym, co może mieć przełożenie na aspekt gospodarczy.

Oceniana rozprawa ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich opracowywanych w formie monografii i napisana jest bardzo starannie. Ewaluowana dysertacja zawarta jest na 138 stronach (wliczając wszystkie tabele i materiały uzupełniające) i zawiera łącznie 27 rycin oraz 1 tabelę. Ocenianą rozprawę doktorską napisano w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań własnych oraz o 222 (wg spisu) pozycje starannie dobranej literatury, z którego

49 prac opublikowano w ciągu ostatnich trzech lat. Powyższe świadczy nie tylko o umiejętnościach Doktorantki w dobieraniu i selekcji właściwego piśmiennictwa, co jest niezwykle ważne w pracy badacza, ale również o aktualności podejmowanego przez Nią problemu badawczego. Opracowanie rozpoczyna się wykazem skrótów i symboli, bardzo przydatnym w rozprawach wielostronicowych. Jednakże w rozdziale tym nie zawarto wszystkich skrótów używanych w tekście.

Rozdział „Wstęp” wprowadza czytelnika w problematykę związaną z pracą badawczą i składa się z dwóch podzielonych wtórnie podrozdziałów, co znacznie zwiększa czytelność pracy i ułatwia jej analizowanie. Wprowadzenie w tematykę badawczą rozpoczyna się od wyjaśnienia czym są VLP, jak są klasyfikowane oraz jaki jest ich mechanizm immunogenego działania. Przejrzystości tej części wstępu zdecydowanie dodają ryciny 1 i 2. VLP uzyskiwane są metodami inżynierii genetycznej i ekspresjonowane mogą być w komórkach ssaków, roślin, owadów, drożdży oraz bakterii. Wszystkie te systemy ekspresji Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała w omawianym rozdziale. Najbardziej obszerny opis dotyczy ekspresjonowania białek w systemach bakteryjnych. Nie powinno to dziwić, ponieważ właśnie ta metoda uzyskiwania antygeny została zastosowana przez Doktorantkę w ramach omawianej dysertacji. W moim mniemaniu stanowi to doskonale wprowadzenie w tematykę pracy. W tym miejscu chciałbym jednak zwrócić Doktorantce uwagę na stosowanie skrótu VLP. W tytule dysertacji VLP scharakteryzowane są prawidłowo jako „cząstki wirusopodobne”. Natomiast w przeważającej części dysertacji, rozpoczynając od wykazu skrótów, Doktorantka używa określenia „cząsteczki VLP”. Cząsteczki to molekuly, a VLP to wielocząsteczkowe rekombinowane białka tworzące struktury przypominające kapsyd wirusa, więc tytułowe „cząstki” są tu bardziej prawidłowym określeniem. Ponadto w angielskim rozwinięciu skrótu „VLP”, „P” oznacza cząstki, więc i z tego powodu nieprawidłowe wydaje się stosowanie przez Doktorantkę sformułowania „cząsteczki VLP”. Jako wnikliwy recenzent zwróciłem uwagę na ten drobny element dotyczący kosmetycznego aspektu ocenianej pracy, jednak podkreślam, że nie umniejsza on w niczym jej merytoryce. W drugiej części wstępu Doktorantka szczegółowo charakteryzuje parwowirusy drobiu poczynając od ich taksonomii poprzez budowę molekularną i morfologiczną po aspekty epidemiologiczne i ich rolę w patologii drobiu. Doktorantka słusznie zauważa, że ze względu na brak możliwości namnażania parwowirusów w warunkach laboratoryjnych, diagnostyka zakażeń ogranicza się do badań molekularnych, bowiem metody serologiczne nie znalazły większego zastosowania, głównie ze względu na ograniczoną dostępność antygenów diagnostycznych. Brak metodyki laboratoryjnej propagacji

parwovirusów jest powodem braku na rynku szczepionek konwencjonalnych. Rozwiązaniem tej sytuacji jest właśnie produkcja VLP, co zostało bardzo obszernie przez Doktorantkę opisane w ostatniej części wstępu, którą uważam za wartościowy element tego rozdziału. Moim zdaniem doktorantka zbyt koncentruje się jednak na VLP parwovirusów psów, świń oraz ludzi. Powyższe zapewne wynika z niewystarczającej liczby publikacji dotyczących VLP aveparwovirusów oraz chęci wskazania potencjału cząstek wirusopodobnych jako antygenów szczepionkowych, co zostało pod koniec rozdziału słusznie skonkludowane.

Cel pracy, którym było otrzymanie funkcjonalnych cząstek wirusopodobnych parwovirusa kur (ChPV) i ich charakterystyka został jasno sprecyzowany. Doktorantka postanowiła założone cele osiągnąć w 7 kolejnych etapach badawczych poczynając od klonowania genu kodującego białko kapsydu (VP2) ChPV, następnie przez uzyskanie transformowanych szczepów bakteryjnych zdolnych do produkcji rekombinowanego białka, opracowanie metod jego oczyszczania, określenia właściwości fizyko-chemicznych, sprawdzenie aktywności biologicznej i immunogenności a także określenie potencjalnego zastosowania uzyskanych VLP.

Rozdział zatytułowany „Materiały i Metody” rozpoczyna się od wylistowania oraz scharakteryzowania zastosowanych w badaniach odczynników i ich mieszanin, a także aparatury. W dalszej części omawianego rozdziału Doktorantka bardzo dokładnie charakteryzuje wszystkie metody badawcze zmierzające do otrzymania czystego rekombinowanego białka kapsydu ChPV. Doktorantka zastosowała model ekspresji w komórkach bakteryjnych *E. coli* szczepu BL21 (DE3) z wklonowanym wcześniej plazmidem zawierającym sekwencję kodującą VP2 ChPV. Jest to najtańsza metoda ekspresji, jednak rekombinowane białka uzyskane tą metodą bardzo często występują w formie ciał inkluzyjnych, co wymaga ich dodatkowej izolacji oraz oczyszczania. Cała procedura rozpuszczania ciał inkluzyjnych i oczyszczania otrzymanego białka została przez Doktorantkę bardzo dobrze opisana. W opisywanym rozdziale znajdują się też deskrypcje otrzymywania VLP przez wysalanie rekombinowanych białek oraz analiza obecności cząstek wirusopodobnych ChPV z zastosowaniem metody mikroskopii elektrycznej oraz metody dynamicznego rozpraszania światła. Z kolei ocenę właściwości biologicznych otrzymanego białka przeprowadzono metodą hemaglutynacji, a w celu potwierdzenia jego immunogenności wykonano eksperyment polegający na immunizacji 2 grup kurcząt SPF. Ptaki immunizowano w 7 dobie życia mieszaniną antygeny i adiuwantu olejowego (grupa badana) lub buforu użytego do zawieszania rekombinowanego białka i adiuwantu (grupa kontrolna). Od wszystkich ptaków

pobierano krew do badań serologicznych przed oraz 3 tygodnie po immunizacji. Pomimo prostoty modelu eksperymentalnego uważam go za wystarczający do uzyskania odpowiedzi na pytanie czy otrzymany antygen jest immunogenny dla kurcząt. Na wykonanie eksperymentu Doktorantka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej. Przeprowadzenie wspomnianego wyżej doświadczenia uważam za bardzo cenny element zaplanowanych badań, ponieważ pozwala on na weryfikację potencjału aplikacyjnego otrzymanych VLP. W tym miejscu mam jednak pytanie do Doktorantki - na jakiej podstawie ustalona została dawka antygeny służącego do immunizacji (20 µg r-VLP/ ptaka)?

Ocena swoistej odpowiedzi humoralnej na immunizację, przeprowadzona została za pomocą testu in house ELISA, w którym do opłaszczania płytki użyto buforu zawierającego 1 µg antygeny/ ml i serie dwukrotnych rozcieńczeń surowicy (od 1:200 do 1:100 mln). Domyślam się, że stężenie antygeny jak i koniugatu przeciwciał zostało wcześniej zoptymalizowane, jednak uważam, że metoda optymalizacji również powinna znaleźć się w tym rozdziale.

Badania będące tematem ocenianej dysertacji mają charakter stricte metodologiczny, wobec czego w rozdziale „Wyniki” przedstawiono bardzo obszernie i z maksymalną liczbą szczegółów efekty kolejnych etapów otrzymywania rekombinowanego antygeny ChPV. Treść tego rozdziału wzbogacona jest licznymi rycinami, co znacznie ułatwia analizę wyników. W ramach prac badawczych Doktorantka uzyskała plazmid zawierający insert odpowiadający fragmentowi genu VP2 ChPV. Otrzymany produkt poddano sekwencjonowaniu, które wykazało jego wysoką homologię z referencyjnymi sekwencjami parwowirusów kur i indyków. Zweryfikowane pod kątem prawidłowości sekwencji amplikony ligowano z plazmidem ekspresyjnym, którym transformowano komórki kompetentne *E. coli* BL21(DE3) metodą elektroporacji. Selekcji transformantów dokonywano stosując dodatek antybiotyku (chloramfenikol) do podłoża. Moim zdaniem brakuje w tym miejscu informacji, czy Doktorantka sprawdzała przed przesianiem kolonii do pożywki płynnej, czy wyrosłe na podłożu LB z antybiotykiem bakterie posiadają plazmid z insertem genu VP2 ChPV, czy plazmid „pusty”. Analiza metodą SDS-PAGE wykazała, że po 2 godzinach od indukcji komórek dochodziło do produkcji białka odpowiadającego masą VP2 ChPV. W tym miejscu mam kolejną drobną uwagę - na str. 72 zarówno w tekście jak i w opisie do ryc. 10 nie widnieje żadna informacja dotycząca spodziewanej wielkości białka. Informacji tej też nie znalazłem w rozdziale „Materiały i Metody”. Dopiero na stronach 79 (ryc. 16) oraz 80 (w tekście) znajdują się informacje o jego masie (ok. 58 kDA). Komórki otrzymane po indukcji ekspresji posłużyły

Doktorantce za bank komórek wykorzystywany w dalszych etapach otrzymywania rekombinowanego antygeny. W związku z faktem, że do uzyskania VP2 ChPV Doktorantka wybrała bakteryjny system ekspresyjny, rekombinowane białko odkładane było w agregujących wewnątrz bakterii ciałach inkluzyjnych. Jest to bardzo powszechne zjawisko w tego rodzaju systemach ekspresyjnych prowadzące nierzadko do problemów z uzyskaniem czystych frakcji białka o dobrej rozpuszczalności. Z problemem tym Doktorantka poradziła sobie doskonale stosując cały szereg działań poczynając od rozpuszczania w warunkach denaturujących zawartych w osadzie bakteryjnym ciał inkluzyjnych, późniejszego oczyszczania wstępnie wyizolowanego białka metodą kolumnową, a następnie jego renaturacji metodą rozcieńczeń, wysalaniu, ponownemu rozpuszczaniu w warunkach denaturujących, kolejnej renaturacji, by w końcowym etapie przeprowadzić zatężanie oczyszczonego białka metodą filtracji stycznej. Wszystkie etapy tego żmudnego procesu są bardzo dobrze opisane, a dużym ułatwieniem analizy tego fragmentu rozdziału „Wyniki” jest schematyczne przedstawienie całej procedury na ryc. 15. Wydajność ekspresji białka należy uznać za dobrą – wynosiła ona około 10% pierwotnej masy ciał inkluzyjnych i białek nierozpuszczalnych, natomiast określona techniką przepływów czystość końcowej zawiesiny białka można uznać za bardzo dobrą, ponieważ wyniosła aż 93%. Zrekombinowane białko zostało zidentyfikowane metodą spektrometrii mas, która wykazała zbieżność uzyskanego profilu masowego peptydów z profilem VP2 szczepu referencyjnego.

Jednakże uzyskanie rekombinowanego białka to tylko połowa zamierzonego przez Doktorantkę celu, ponieważ z założenia uzyskane białka muszą spontanicznie agregować w VLP oraz posiadać właściwe cechy biologiczne - w tym wypadku zdolność do aglutynowania krwinek kurzych. Przeprowadzone metodami TEM oraz dynamicznego rozpraszania światła analizy wykazały, że w świeżo przygotowanym roztworze białka występowały cząstki o średnicy 19-20 μ m posiadające wyraźne granice zewnętrzne co wskazuje, że zakładany cel został przez Doktorantkę osiągnięty. Trzeba mieć jednak na uwadze, że rekombinowane białka bardzo szybko ulegają proteolizie. Zostało to również uwzględnione w ocenianej dysertacji, bowiem testem hemaglutynacji Doktorantka potwierdziła nie tylko właściwości biologiczne uzyskanego rekombinowanego antygeny ale również wykazała jak przechowywanie otrzymanego roztworu wpływa na jego stabilność. Powyższe badanie uważam za bardzo zasadne i ważne z praktycznego punktu widzenia. Wyniki zaprezentowane na rycinie 22 są dowodem na to, że 5-dniowe przechowywanie konstrukt białkowego zarówno w warunkach chłodniczych (4°C) jak i w warunkach zwykłego mrożenia (-20°C) nie wpływa znacząco na

aktywność biologiczną rekombinowanego białka. Niestety wydłużenie okresu przechowywania do 43 dni w warunkach chłodniczych skutkowało znacznym obniżeniem zdolności aglutynowania krwinek kurzych przez rekombinowane białko, co wiąże się z koniecznością dodawania inhibitorów proteaz. Jest to bardzo ważna obserwacja w kontekście potencjalnego wdrażania do produkcji masowej opracowywanego białka, które może być zastosowane nie tylko jako antygen diagnostyczny ale również jako antygen szczepionkowy. Dowiodła temu Doktorantka przeprowadzając eksperyment, w którym otrzymanym białkiem immunizowano kurczęta. Eksperyment ten wykazał, że pojedyncza iniekcja mieszaniną rekombinowanego białka i adiuwantu zaindukowała swoistą odpowiedź humoralną, co potwierdza silną immunogenność tak przygotowanego preparatu. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na nieco niefortunne zaprezentowanie wyników na ryc. 25, na której miana przeciwciał z grupy kontrolnej przedstawione są jako wartość uśredniona, natomiast w przypadku próbek pochodzących od ptaków z grupy badanej przedstawiono zarówno pojedyncze jak i uśrednione wartości. Moim zdaniem wprowadza to pewne „zamieszanie” do ryciny i nieco utrudnia analizę danych w niej zawartych. Wobec tego uważam, że lepszym rozwiązaniem byłoby zamieszczenie wartości średnich dla obu grup z uwzględnieniem odchyłeń standardowych. Moją uwagę zwróciła również ryc. 27, na której zaprezentowane zostały wyniki badań serologicznych badanych kurcząt przed immunizacją. W moim odczuciu zestawienie na jednej rycinie wyników sprzed i po immunizacji ptaków z obu grup byłoby lepszym rozwiązaniem. Ze względu na zastosowanie licznych rozcieńczeń surowicy na rycinie mogłyby znaleźć się jedynie wyniki poimmunizacyjne dla surowicy nierozcieńczonej oraz dla surowicy w najwyższym rozcieńczeniu dającym wynik dodatni. Powyższa uwaga powinna być traktowana jednak jako życzliwa sugestia do rozpatrzenia przed publikacją wyników w formie pracy oryginalnej i w niczym nie umniejsza przeprowadzonym przez Doktorantkę badaniom.

Rozdziałem, który często przysparza doktorantom najwięcej trudności jest „Dyskusja”, bowiem wymaga od autorów umiejętności nie tylko prawidłowej analizy osiągniętych przez siebie wyników ale również odpowiedniego porównania ich z danymi dostępnymi w światowej literaturze. W zawartym na niecałych 19 stronach rozdziale, który w tym przypadku zatytułowano „Podsumowanie i dyskusja” Doktorantka opisuje wszystkie etapy badań zmierzających do uzyskania rekombinowanego białka, dyskutując i wyjaśniając wiele zaistniałych po drodze problemów związanych z tym żmudnym procesem. Autorka poddaje również ocenie zdolność agregowania otrzymanego białka w cząstki wirusopodobne oraz jego właściwości biologiczne, jak i stabilność w różnych warunkach przechowywania. W rozdziale

tym mgr inż. Agnieszka Romanik - Chruścilewska zwraca uwagę na jedną istotną obserwację, mianowicie że do tworzenia struktur VLP nie są potrzebne początkowe aminokwasy (n=39) w N-końcu białka oraz, że białko takie nie traci swoich właściwości biologicznych. W dalszej części omawianego rozdziału Doktorantka dyskutuje uzyskane wyniki eksperymentalnej immunizacji. Uwzględniając aspekt praktyczny immunizacji, zastosowany w niniejszej pracy model eksperymentalny polegający na szczepieniu piskląt w 7 dobie życia może nie być idealnym rozwiązaniem, ponieważ do wirusowych enteropatii u drobiu dochodzi właśnie w pierwszych tygodniach odchowu. Wobec tego lepszym rozwiązaniem może być immunizowanie stad rodzicielskich, w celu zapewnienia pisklątom odporności biernej w pierwszych tygodniach życia, oraz ewentualne 1 lub dwukrotne doszczepianie po spadku mian przeciwciał matczynych. Doktorantka w omawianym rozdziale również zauważa konieczność takich badań jednocześnie zwracając uwagę na olbrzymie ograniczenia metodologiczne wynikające z braku możliwości weryfikacji skuteczności szczepienia przez niemożliwość przeprowadzenia zakażenia eksperymentalnego oraz niektórych testów, jak np. test HI. Bardzo istotnym elementem komercyjnego wdrażania rekombinowanych antygenów jest cena ich otrzymywania, z tego powodu w dalszej części rozdziału „Podsumowanie i dyskusja” Doktorantka porównuje i opisuje różne techniki ekspresji VLP parwowirusów różnych gatunków zwierząt z metodą wykorzystywaną we własnych badaniach, co uważam za bardzo wartościowy element ocenianego rozdziału.

Podsumowując uważam, że część dysertacji poświęcona dyskusji omawianych wyników napisana jest w sposób klarowny i odzwierciedla dużą wiedzę Doktorantki z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Jednakże mam też jedną dosyć poważną uwagę. Moim zdaniem po rozdziale dotyczącym dyskusji otrzymanych wyników brakuje wniosków jakie zostały wyciągnięte z przeprowadzonych badań. W mojej opinii zamieszczone na stronach 96-97 podsumowanie może zostać usunięte z tego rozdziału i stanowić podstawę do utworzenia rozdziału „Wnioski”. Dla przykładu kluczowe informacje z punktów 1-5 mogłaby stanowić wniosek pierwszy. Wniosek drugi może zostać utworzony przez informacje wynikające z punktów 6 i 7; natomiast punkty 8 i 9 po niewielkim przeredagowaniu mogłyby stanowić kolejne dwa wnioski.

Ostatnią częścią omawianej dysertacji są streszczenia w języku polskim i angielskim, w których Doktorantka w sposób zwięzły podsumowała cele badawcze, metodykę oraz wyniki.

Recenzowaną rozprawę doktorską oceniam pozytywnie ze względu na jej następujące walory:

- stanowi ona nie tylko ważne uzupełnienie wiedzy z zakresu otrzymywania rekombinowanych białek kapsydu ChPV, ale jest wręcz swoistym instruktorem jak otrzymać zadowalającą ilość takiego białka przy zachowaniu jego odpowiedniej czystości, wobec czego uzyskane wyniki mogą mieć charakter wdrożeniowy,
- przeprowadzone badania dotyczące immunogenności otrzymanego antygeny mogą być podstawą do dalszych prac zmierzających do opracowania programów szczepień przeciwko chorobie przynoszącej duże straty ekonomiczne w produkcji drobiu rzeźnego,
- zastosowano metody badawcze zgodne z aktualnie panującymi w nauce trendami.

Z obowiązku wnikliwego recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę Doktorantce na następujące, wcześniej nie wymienione, jej niedociągnięcia:

- na str. 16 podano, że „*Wirus CAV należy do rodziny Circoviridae.*”, jednakże zgodnie z aktualną nomenklaturą utworzoną przez Międzynarodowy Komitet ds. Taksonomii Wirusów (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) wirus ten należy do rodziny *Anelloviridae*. Ponadto określenie „*Wirus CAV*” jest nieco niefortunne, ponieważ we wspomnianym wyżej skrótce, właśnie „V” oznacza wirusa,
- na str. 24 niepotrzebnie zdefiniowano znaczenie skrótu „IBDV”, ponieważ po raz pierwszy został on zdefiniowany na str. 16; to samo dotyczy skrótu „HBCAg” dotyczącego rekombinowanego antygeny wirusa zapalenia wątroby typu B, który na stronie 28 jest niepotrzebnie dwukrotnie zdefiniowany,
- na str. 31 omyłkowo podano, że węgierski izolat CHPV ABU-P1 przedstawiony jest na ryc. 1C, a taka nie istnieje. Struktura genomu wspomnianego wyżej izolatu przedstawiona jest na ryc. 3C (str. 32),
- na str. 33 znajduje się niefortunne sformułowanie wyjaśniające drogę poziomą zakażeń jako „*droga kał-dziób*”, moim zdaniem lepszym określeniem byłoby „*droga per os*”,
- na str. 34 wkradł się błąd, bowiem podano, że prowadzono badania „*prewalencji parwowirusów w stadach indyków*”. W tym wypadku badano „prewalencję”,
- na str. 35 podano, że „*u 2-4 tygodniowych indyków można obserwować osteoporozę*”, jednakże deformacje kończyn stwierdzane u indyków w tym wieku to peroza,
- str. 53, 54, 63, 66, 92, 93 w odniesieniu do „próbek” (np. DNA) nieprawidłowo stosowane jest określenie „*próby*”,

- na str. 63 podano, że do testu HA „zastosowano świeży preparat erytrocytów pobranych z krwi kurcząt”, jednakże to krew została od kurcząt pobrana, a erytrocyty zostały z niej wyizolowane,
- str. 67, na ryc. 5B brakuje ścieżki markera wielkości mas,
- str. 69 w podanym zwrocie „reakcja PCR” „R” oznacza reakcję,
- str. 94 zwrot „powrót atenuowanego szczepu szczepionki do bardziej zjadliwego stanu” sugeruję zamienić na „rewersja do formy zjadliwej”,
- w wykazie piśmiennictwa poszczególne pozycje tego samego pierwszego autora wykazywane są niechronologicznie, np. prace Zsak L. i wsp. wylistowane na str. 137,
- poz. 53 piśmiennictwa – nazwisko pierwszego autora nie koresponduje z cytowaniem na str. 23 („Fuenmayo i wsp. 2017” zamiast „Fuenmayor i wsp. 2017”), podobnie poz. 69 piśmiennictwa nie zgadza się z cytowaniem na str. 104 („Hau i wsp. 2020” zamiast „Hua i wsp. 2020”), podobny błąd dotyczy poz. 142 piśmiennictwa, w którym nazwisko pierwszego autora nie koresponduje z cytowaniem na str. 21 („Pattended i wsp. 2005” zamiast „Pattenden i wsp. 2005”), jak również poz. 220 nie zgadza się z cytowaniem na str. 33 („Zask i wsp. 2015” zamiast „Zsak i wsp. 2015”),
- proponuję by dla łatwiejszej analizy tekstu i odnoszących się do niego referencji, w przypadku prac tego samego autora opublikowanych w jednym roku opatrzyć referencje dodatkowymi symbolami, np. A, B, C itp.). Dotyczy to referencji nr 80-82 oraz 97-98,
- na str. 35 znajdujemy referencję Barnas i wsp. (2003), jednakże taka praca nie znajduje się w wykazie piśmiennictwa, podobnie na str. 36 zacytowano pracę autorstwa Tarasiuk (2015), jednak w wykazie piśmiennictwa znajdują się tylko prace Tarasiuk i wsp. z lat 2012 i 2019; podobny błąd istnieje na stronach 104 i 105, gdzie dwukrotnie cytowana jest praca Zeng i wsp. (2008) nie widniejąca w wykazie piśmiennictwa,
- w tekście brak jest cytowania widniejącego w wykazie piśmiennictwa opracowania autorstwa Saif i wsp. 2020 (poz. 166, str. 132).
- Ponadto w pracy występują nieliczne błędy literowe i edycyjne.

Reasumując stwierdzam, że pomimo powyższych uwag, moja ocena tej dysertacji jest pozytywna. Zrealizowana rozprawa doktorska poszerza niewątpliwie wiedzę na temat otrzymywania VLP parwowirusów kur i ich immunogenności dla tego gatunku ptaków. Konkludując wyrażam opinię, iż rozprawa doktorska pt. „Otrzymanie i charakterystyka cząstek wirusopodobnych parwowirusa kur oraz ich wykorzystanie w diagnostyce i profilaktyce chorób drobiu ” odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14

marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z 2003 r. ze zmianami w Dz. U. z 2005 r.) oraz § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. Nr 204, poz. 1200), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Romanik – Chruścielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na fakt, że przedłożona mi do oceny praca bez wątpienia stanowi doskonałe odzwierciedlenie przełożonej na praktykę wiedzy z dziedziny biotechnologii połączonej z potencjałem wdrożeniowym w dyscyplinie „Weterynaria”, torując tym samym drogę dalszym badaniom z tego zakresu, wnioskuję o wyróżnienie ewaluowanej dysertacji stosowną nagrodą.


dr hab. Tomasz Stenzel, prof. UWM