

prof. dr hab. Włodzimierz Meissner
Katedra Ekologii i Zoologii Kręgowców
Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 59
80-309 Gdańsk

Ocena pracy doktorskiej mgr Justyny Miłek-Krupa pt. „Występowanie gamma- i deltakoronawirusów w populacji dzikich ptaków na terenie Polski i ich rola w epidemiologii zakażeń koronawirusami drobiu”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Justyny Miłek-Krupa pt. „Występowanie gamma- i deltakoronawirusów w populacji dzikich ptaków na terenie Polski i ich rola w epidemiologii zakażeń koronawirusami drobiu” zawiera 122 ponumerowane strony, w tym 13 tabel i 21 ponumerowanych rycin. Obszerny spis literatury liczy 158 pozycji, co świadczy o dobrym rozeznaniu doktorantki w tym, czego już dokonano w tematyce związanej z jej pracą. Podjęty temat bardzo dobrze wpasowuje się we wzrost zainteresowania koronawirusami, spowodowany pandemią Covid-19 i poszerza naszą wiedzę na temat koronawirusów występujących w populacjach dzikich ptaków.

Wstęp rozprawy doktorskiej Pani Justyny Miłek-Krupa, liczący 26 stron, jest dobrym wprowadzeniem w tematykę jej badań i w wyczerpujący sposób uzasadnia wybór tematu rozprawy. We wstępie omówiono też zagadnienia związane z diagnostyką laboratoryjną. Po odpowiednim przeredagowaniu ten obszerny fragment pracy mógłby stać się artykułem przeglądowym, zwłaszcza po uzupełnieniu go o niektóre fragmenty znajdujące się na początku rozdziału Omówienie wyników i dyskusja. W obecnym czasie taka publikacja na pewno wzbudziłaby duże zainteresowanie. Część wstępna kończy się sformułowaniem celu pracy. Pani Justyna Miłek-Krupa postawiła przed sobą trzy zadania sformułowane w sposób bardzo ogólny, tj. ocenę występowania koronawirusów w populacji dzikich ptaków na terenie Polski oraz ich charakterystykę molekularną na podstawie genu replikazy, jak też na podstawie całego genomu.

Doktorantka wykazała się nie tylko znajomością metod i technik badawczych, ale także umiejętnością ich zastosowania w analizach genetycznych. Wdrożyła też nową metodę wykrywania materiału genetycznego koronawirusów, z którą zapoznała się przebywając ma stażu w Luksemburskim Instytucie Zdrowia. Przedstawiony w pracy

dokładny opis stosowanych metod laboratoryjnych liczy aż 12 stron i jest moim zdaniem wystarczający do powtórzenia tego typu analiz w przyszłych badaniach.

Nie mam zastrzeżeń do języka i stylu pracy. Niekiedy jednak pojawiają się błędy edycyjne, np. w opisie osi odciętych ryciny nr 21 pojawia się termin „przebadane”, a jego usytuowanie powoduje, że czytelnik ma przed sobą zapis „przebadane kaczk”. Natomiast chodzi tu o liczebność wszystkich przebadanych ptaków. W rozdziale Omówienie wyników i dyskusja pojawiają się nazwy łacińskie gatunków ptaków, z których część pojawiła się w tekście pracy wcześniej i nie powinna już tu być powtarzana.

Magister Justyna Miłek-Krupa wykazała się dużą znajomością tematyki poruszanej w rozprawie, a w analizie zebranego przez nią bardzo bogatego materiału zastosowała nowoczesne techniki badawcze. Badanie wykonano w oparciu o bardzo dużą liczbę próbek. W przypadku, gdy co najmniej pięć próbek pobrano od ptaków tego samego gatunku, w tym samym miejscu i w tym samym czasie, zostały one połączone. Pulowanie zostało przeprowadzone w prawidłowy sposób, jednak w pracy nie znalazłem wytłumaczenia dlaczego zdecydowano się na taki zabieg. Czy w grę wchodziły koszty analiz, czy też okres, z którego pochodziły zebrane dane, na co wskazuje tabela nr 3, gdzie próbki z lat 2009-2011 wymienione są w oddzielnej kolumnie? Nasuwa się też pytanie czy pulowanie próbek mogło mieć negatywny wpływ na interpretację uzyskanych wyników. W grupie próbek zebranych od pojedynczych ptaków, obecność materiału genetycznego koronawirusa wykryto w 4,2% prób, natomiast w próbach spulowanych odsetek ten był wyższy i osiągnął 7,5%. Łatwo jest wykazać z pomocą testu niezależności chi-kwadrat, że ta różnica jest istotna statystycznie ($\chi^2=9,57$; $df=1$; $p=0,002$). Proszę doktorantkę o rozwinięcie tego tematu i przybliżenie potencjalnych konsekwencji pulowania próbek dla wyników uzyskiwanych w badaniach mikrobiologicznych.

Od 264 ptaków pobrano próbki krwi w celu wykrycia przeciwciał. Zgodnie z polskim prawem (Ustawa o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych) na pobieranie krwi od zwierząt wymagane jest zezwolenie Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach, a osoby wykonujące tę czynność powinny być przeszkolone i posiadać odpowiednie certyfikaty. W czasopiśmie naukowym podanie takiej informacji jest obowiązkowe. Niestety nie znalazłem jej w przedstawionej mi rozprawie doktorskiej. Zastanowiło mnie też, że 88 próbek krwi pochodziło od bocianów białych. Osobniki dorosłe tego gatunku jest niezwykle trudno schwytać, tak więc mogę

przypuszczać, że próbki te wzięto od piskląt lub od ptaków przebywających w ośrodkach rehabilitacji dzikich zwierząt. W pierwszym przypadku powstaje pytanie, czy należałoby się spodziewać innych wyników u piskląt i u ptaków dorosłych, a w drugim powstaje wątpliwość, czy ptaki przetrzymywane w niewoli można zaliczyć do ptaków dzikich i czy przebywanie wielu osobników w klatkach ośrodka rehabilitacyjnego nie wpływa na uzyskane wyniki, ponieważ transmisja wirusów w takiej sytuacji jest przecież ułatwiona.

Dużą część pracy stanowią wyniki analiz filogenetycznych, które według mnie są jej najciekawszym fragmentem. Przyporządkowano wykryte w próbach koronawirusy do dwóch podrodzajów i wykazano ich zróżnicowanie w obrębie wyróżnionych gałęzi drzewa filogenetycznego. Ten fragment wraz z odpowiadającą mu częścią dyskusji stanowi dobre źródło do oddzielnej publikacji, do czego doktorantkę namawiam.

W tej niewątpliwie ciekawej pracy doktorskiej można też znaleźć szereg niedociągnięć, które z obowiązku recenzenta muszę tu wymienić. Omawiając te najważniejsze, świadomie pomijam drobne błędy interpunkcyjne i edycyjne.

Moje wątpliwości budzi formalny układ rozprawy, w którym zrezygnowano z klasycznego rozdziału dyskusja, a połączono go z omówieniem wyników. Choć nie mam często do czynienia z rozprawami doktorskimi z zakresu wirusologii, mogę stwierdzić, że takie rozwiązanie jest obecnie bardzo rzadko stosowane, a w przypadku renomowanych czasopism naukowych i publikacji przedstawiających wyniki oryginalnych badań jest zdecydowanie unikane. Ponadto, przedstawiony w pierwszym akapicie tego rozdziału rys historyczny badań nad koronawirusami u dzikich zwierząt (wraz z tabelą 13) lepiej pasuje do wstępu niż do rozdziału dyskusja.

Nazwy wszystkich gatunków ptaków zostały w Polsce ujednolicone. W roku 1999 został opublikowany nomenklator i autorzy wszystkich prac naukowych są zobowiązani do używania oficjalnych nazw gatunkowych. Jego na bieżąco uaktualniana wersja on-line jest do znalezienia na stronie Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego. Także większość popularno-naukowych źródeł wiedzy stosuje się do tego oficjalnego nazewnictwa. Niestety w ocenianej rozprawie doktorskiej nie zawsze jest ono używane. O ile dodanie do nazw jednoczłonowych przymiotnika „zwyczajny” jest formalnie akceptowane, to nie należy modyfikować nazw oficjalnie przyjętych. Na przykład na stronie 37 wymieniono orła bielika. Oficjalna nazwa tego gatunku, to bielik, a rewizja taksonomiczna ptaków szponiastych oparta na analizach genetycznych wykazała brak

bliskiego pokrewieństwa bielika z orłami, stąd użycie nazwy orzeł bielik jest błędem. Tak samo nazwa gołąb sportowy nie jest poprawna. Nie zawsze też w pracy przytaczane są pełne nazwy gatunkowe, np. na str. 53 pojawia się zapis gołąb, a wiadomo, że próbki analizowane w pracy pochodziły od trzech gatunków gołębi. Dopiero z tabeli nr 5 można odczytać, że chodzi tu o gołębia miejskiego, bo tylko ten gatunek dał w badaniach próbki pozytywne.

W pracy zabrakło mapy pokazującej miejsca, z których pochodziły próby. Nie wiadomo, czy miejsca ich poboru były równo rozmieszczone po całym terytorium Polski, czy też grupowały się w kilku miejscach. Różne rozłożenie miejsc poboru prób może w pewnym stopniu przekładać się na interpretację wyników. Przykładowo krzyżówki dostarczyły aż 1566 prób pobranych w latach 2011-2018 od pojedynczych ptaków, z których w 4% znajdowały się koronawirusy. Byłoby ciekawe zobaczyć, czy te pozytywne próbki nie występowały częściej w jakimś regionie Polski, czy też udział takich pozytywnych próbek wśród wszystkich pobranych jest podobny we wszystkich częściach Polski.

Z tytułu tabeli 1 wynika, że przedstawiona została w niej taksonomia koronawirusów występujących w gromadzie ptaków, natomiast wymieniono w niej dwa wirusy związane z ssakami. Odpowiednie wyjaśnienie znalazło się wprawdzie w przypisie pod tabelą, jednak lepszym rozwiązaniem byłby zmiana tytułu tabeli, lub pominięcie w niej koronawirusów stwierdzanych u ssaków. Niekiedy w tabelach zamieszczonych w pracy brakuje tytułów i numerów (str. 39, 47, 48, 49, 50 i szczególnie na str. 65). Wprawdzie poprzedzające te tabele zdanie niejako wprowadza w ich zawartość, ale zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami formatowania tekstu naukowego każda zamieszczona w pracy tabela powinna mieć swój tytuł i numer, do którego autor odwołuje się w tekście.

Na stronie 51 zamieszczono krótki opis zastosowanych metod statystycznych. Nie daje on informacji do oceny jakich różnic wykorzystano test chi-kwadrat i czy to był test zgodności czy test niezależności. Błędnie podano też, że poprawkę Yatesa stosuje się, gdy liczebność w jednej z kategorii jest niższa od 5. Tymczasem zalecenie stosowania tej poprawki dotyczy sytuacji małej wartości liczebności oczekiwanych, które przecież nie są tożsame z liczebnością uzyskaną w badaniach. Mała objętość opisu metod statystycznych wynika z faktu, że uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej w ograniczonym zakresie. Zgromadzony bardzo obfity materiał można było poddać bardziej zaawansowanym analizom, opartym np. na modelach liniowych. Dałoby to możliwość

kompleksowego spojrzenia na uzyskane wyniki i uwzględnienia potencjalnych interakcji mogących występować między różnymi czynnikami, jakie bierze się pod uwagę w tego typu badaniach.

Terminy poboru prób od ptaków zostały przedstawione bardzo zgrubnie w oparciu o trzy okresy fenologiczne. Taki podział może budzić wątpliwości, ponieważ różne gatunki ptaków różnią się fenologią migracji i w różnych terminach pozostają na zimowiskach. Niektóre gatunki, z których pobrano próby, w ogóle nie podejmują wędrówek (np. gołąb miejski), a w przypadku najliczniej reprezentowanej w pobranym materiale krzyżówki na tych samych zbiornikach wodnych, w tym samym czasie, mogą przebywać zarówno osobniki z populacji osiadłej, jak i wędrownej. Wątpliwości budzi też jeden z przyjętych okresów, nazwany „migracja wiosenna i okres wczesnego lata”. Obejmuje on dwie zupełnie różne grupy ptaków. Z jednej strony są to ptaki migrujące przez nasz kraj, których lęgowiska położone na północ i wschód są niekiedy oddalone od Polski nawet o kilka tysięcy kilometrów. Z drugiej natomiast są to ptaki odbywające lęgi u nas. Te dwie grupy ptaków mogą być w różnym stopniu narażone na infekcję koronawirusami i w różnym stopniu przyczyniać się do ich transmisji.

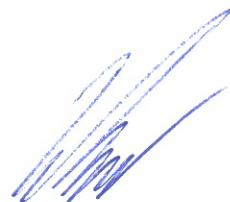
Zebranie tak dużej liczby próbek od dzikich ptaków z pewnością nie byłoby możliwe bez współpracy z ornitologami. Nie znalazłem w ocenianej pracy ani jednej wzmianki na ten temat. Czy próbki pochodziły z projektu badawczego dedykowanego monitoringowi koronawirusów u dzikiego ptactwa na terenie całej Polski, czy też zbierane były na potrzeby innych badań, np. w ramach monitoringu wirusów ptasiej grypy? Tego typu informacje powinny znaleźć się nie tylko przy opisie sposobu zbioru materiałów do tej pracy, ale także wypadałoby, aby odpowiednia wzmianka pojawiła się w podziękowaniach.

Rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Miłek-Krupa kończy się podaniem wniosków, wyciągniętych z jej pracy. Wnioski w pracy naukowej muszą przynosić odpowiedzi na stawiane w celach pytania. Spotkałem się nawet ze stwierdzeniem, że oś cele-wnioski jest kręgosłupem rozprawy doktorskiej. Tymczasem przy trzech przedstawionych celach pracy, przedstawionych zostało aż 11 wniosków, z czym w pracach doktorskich, z którymi miałem do czynienia, jeszcze się nie spotkałem. Pewnym usprawiedliwieniem może być fakt, że cele pracy zostały sformułowane bardzo ogólnie, co w oczywisty sposób prowadzi do sformułowania większej liczby wniosków, jednak w tej długiej liście mamy wymieszane punkty podsumowujące wyniki i rzeczywiste wnioski. Trudno np. uznać za wniosek płynący

z przeprowadzonych analiz stwierdzenie, że w analizach genetycznych zastosowano dobrze dobrane startery (punkt 1). Listę wymienionych w rozdziale szóstym wniosków można by było skrócić poprzez połączenie niektórych z nich, gdy mówią o tym samym aspekcie pracy (np. wniosek 4 i 5, 8 i 10).

Oceniana rozprawa doktorska ma formę maszynopisu, więc uzyskane wyniki nie zostały pewnie jeszcze opublikowane w czasopismach naukowych. Mam nadzieję, że moje uwagi, zwłaszcza te dotyczące metod analizy danych i braku odpowiednich oświadczeń dotyczących pozwoleń na pobieranie krwi od dzikich ptaków pomogą doktorantce w umieszczeniu najważniejszych wyników doktoratu w renomowanych czasopismach naukowych.

Biorąc pod uwagę zarówno mocniejsze, jak i słabsze strony przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej mgr Justyny Miłek-Krupa, pomimo sporej liczby uwag jakie przedstawiłem w swojej recenzji, uważam, że w dostatecznym stopniu spełnia ona wymagania stawiane tego typu pracom i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Gdańsk 28-06-2021

/prof. dr hab. Włodzimierz Meissner/