

Olsztyn 07.07.2021 r.

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

### **Ocena rozprawy doktorskiej**

mgr Justyny Miłek - Krupy pt. “Występowanie gamma i deltakoronawirusów w populacji dzikich ptaków na terenie Polski i ich rola w epidemiologii zakażeń koronawirusami drobiu”  
wykonanej w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego -  
Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

pod kierownictwem dr hab. Katarzyny Domańskiej – Blicharz, prof. instytutu oraz

dr n. wet. Anny Pikuły pełniącej rolę promotora pomocniczego.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 14 maja 2021 r. (BRN – 410/6/21) zgodne z uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętą w dniu 26. 10. 2018 r.

Wirusy z rodzaju *Coronavirus* zdolne są do zakażenia licznych gatunków ptaków i ssaków, w tym również człowieka powodując choroby układu oddechowego, pokarmowego i nerwowego. Zakażenia koronawirusami (CoV) mogą szerzyć się bardzo szybko i mieć różny przebieg: od bezobjawowego po ciężki, doprowadzający niekiedy do zejść śmiertelnych. Dla przykładu CoV wywołujący u ludzi ciężki ostry zespół oddechowy (SARS) wywołał w 2003 roku epidemię, która trwała 6 miesięcy, rozprzestrzeniła się na 30 krajów i spowodowała śmierć 775 osób. Natomiast pojawienie się w 2019 roku nowego, wysoce zaraźliwego patogenu SARS-CoV-2 przyczyniło się do wybuchu pandemii i śmierci do tej pory kilku milionów osób.

Koronawirusy cechują się dużą zmiennością genetyczną. Oczywiście najczęstszą i podstawową przyczyną tego zjawiska są wynikające z błędów powstałych w procesie transkrypcji mutacje punktowe. Pomimo tego, że dotyczą one pojedynczych nukleotydów mogą wpływać na funkcję kodowanego przez zmutowany gen białka lub jego zmiany fenotypowe w tym zmiany antygenowości, tym samym mogą mieć bezpośredni wpływ na efektywność szczepień. Ale zmienność genetyczna to nie tylko mutacje, bowiem może ona wynikać z mechanizmów zupełnie z nimi niezwiązanych jak np. rekombinacji genetycznych, które poprzez „przetasowanie” fragmentów materiału genetycznego różnych szczepów wirusów mogą być przyczyną powstawania nowych genotypów jak i gatunków koronawirusów. Największą zmiennością genetyczną charakteryzują się CoV izolowane od nietoperzy i ptaków. U ptaków wolnożyjących występują koronawirusy należące do rodzaju gamma- i delta. Natomiast ptactwo domowe jest rezerwuarem gammakoronawirusów. Ze względu na zachowanie stadne i zdolność do latania na duże odległości ptaki posiadają ogromny potencjał do skutecznego rozprzestrzeniania koronawirusów między sobą i innymi zwierzętami. Uważa się, że ptaki wolno żyjące są ważnym rezerwuarem koronawirusów groźnych dla drobiu. Wynika to z faktu, iż niektóre gatunki ptaków dzikich są synantropijne i przebywając w pobliżu siedzib ludzkich lub gospodarstw (w tym ferm drobiu) mogą brać udział w rozprzestrzenianiu tych wirusów do populacji drobiu utrzymywanego systemem intensywnym.

Powyższe uważam za najważniejszy argument przemawiający za celowością przeprowadzenia badań zmierzających do oceny prewalencji koronawirusów w populacji ptaków wolnożyjących oraz prób scharakteryzowania ich zmienności genetycznej. Tym samym wysoko oceniam wybór tematyki badawczej ewaluowanej dysertacji.

Oceniana rozprawa ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich opracowywanych w formie monografii i napisana jest bardzo starannie. Ewaluowana dysertacja zawarta jest na 122 stronach i zawiera łącznie 21 rycin oraz 13 tabel. Ocenianą rozprawę doktorską napisano w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań własnych oraz o 158 pozycji piśmiennictwa, z którego 30 prac opublikowano w ciągu ostatnich trzech lat. Powyższe wskazuje na umiejętność Doktorantki w dobieraniu właściwego piśmiennictwa oraz podkreśla aktualność podejmowanego przez Nią problemu badawczego. Praca doktorska rozpoczyna się wykazem skrótów i oznaczeń, co stanowi bardzo przydatny element tego typu opracowań.

Bardzo obszerny, ponieważ liczący 24 strony rozdział „Wstęp” wprowadza czytelnika w problematykę związaną z pracą badawczą i składa się z pięciu podrozdziałów. Wiadomości ogólne dotyczące koronawirusów i ich klasyfikacji stanowią wprowadzenie w tematykę

badawczą. Następnie Doktorantka w bardzo szczegółowy sposób charakteryzuje wirusy będące obiektem Jej zainteresowań naukowych w głównej mierze koncentrując się na ich budowie molekularnej. Ryciny 1-3 oraz tabele 1 i 2 zdecydowanie ułatwiają analizę tego fragmentu dysertacji. W dalszej części rozdziału „Wstęp” Doktorantka charakteryzuje źródła zmienności genetycznej koronawirusów. Ten fragment analizowanego rozdziału uważam za bardzo cenny, ponieważ jak wszystkie RNA-wirusy, CoV charakteryzują się ogromną zmiennością genetyczną która wynika z trzech powodów. Po pierwsze, RNA-zależna polimeraza RNA CoV posiada organiczną aktywność egzonukleazy 3'-5' weryfikującą poprawność wstawianych nukleotydów w replikacji co prowadzi do powstawania licznych mutacji punktowych w genomie. Po drugie, wirusy te mogą ulegać rekombinacjom w przypadku zakażenia jednej komórki dwoma lub więcej rodzajami wirusa. Po trzecie, CoV wyróżniają się łatwością w pozyskiwaniu i gubieniu genów tak by jak najlepiej dopasować się do żywiciela. Te trzy czynniki odpowiedzialne są za powstawanie kolejnych rodzajów czy gatunków tych wirusów które mogą być w stanie przełamywać bariery międzygatunkowe. Dalszą część rozdziału „Wstęp” Doktorantka poświęca na scharakteryzowanie delta- i gammakoronawirusów koncentrując się przede wszystkim na wirusach występujących u różnych gatunków ptaków utrzymywanych przez człowieka jak kury, indyki, bażanty, perlice, przepiórki czy gołębie. W rozdziale tym opisane są również koronawirusy występujące u ptaków wolnożyjących, co nawiązuje bezpośrednio do tematyki pracy. Przydatnym elementem tego rozdziału jest wieńczący go fragment dotyczący diagnostyki laboratoryjnej.

Cel pracy, którym była ocena prewalencji koronawirusów u ptaków dzikich w Polsce oraz ich charakterystyka molekularna w oparciu o sekwencję nukleotydową zarówno wybranego fragmentu genomu (gen kodujący RNA-zależną polimerazę RNA, RdRp) jak i cały genom został zwięźle sprecyzowany.

Rozdział zatytułowany „Materiał i Metody” rozpoczyna się od opisanie próbek służących Doktorantce do badań, który stanowiły blisko 4 tyś. wymazów z kloaki pochodzących od pojedynczych osobników oraz 400 wymazów pulowanych pochodzących od ptaków wolnożyjących. Próbkę pobrano łącznie od aż 81 gatunków ptaków reprezentujących 12 rzędów. Liczbę próbek wykorzystanych do badań zdecydowanie należy uznać za wystarczającą. W tym miejscu zwracam uwagę, że zdobycie próbek od ptaków wolnożyjących nie jest sprawą łatwą, jednak materiał do badań Doktorantki został pobrany w ramach monitoringu występowania grypy ptaków na terenie Polski. Powyższe odbieram bardzo pozytywnie, bowiem jest dowodem na maksymalne wykorzystanie dostępnego materiału

terenowego. W dalszej części omawianego rozdziału Doktorantka szczegółowo opisuje wszystkie zastosowane metody badawcze, poczynając od izolacji całkowitego RNA, przez amplifikację genu RdRp, sekwencjonowanie Sangera, przygotowywanie bibliotek do sekwencjonowania nowej generacji oraz analizy filogenetyczne. Do oceny prewalencji koronawirusów w populacji ptaków dzikich Doktorantka zastosowała zaadoptowaną w Zakładzie Chorób Drobiu PiWet - PIB metodę RT-nested-PCR opierającą się na amplifikacji konserwatywnego fragmentu genomu jakim jest fragment genu kodujący polimerazę RNA. Zastosowana metoda jest bardzo dobrym wyborem, ponieważ pozwala na wykrycie wszystkich typów koronawirusów. Z tego powodu Doktorantka nazwała ją metodą „pankoronawirusową” (str. 40). Nie mniej jednak uważam, to sformułowanie za niefortunne, wobec tego podrozdział 3.1.3 powinien zostać odmiennie nazwany, np.: „Zmodyfikowana metoda umożliwiająca wykrycie wszystkich typów/ rodzajów koronawirusów”. Uzyskane fragmenty genu RdRp wielkości ok. 550 par zasad sekwencjonowano metodą Sanger a złożone amplikony poddawano analizie filogenetycznej metodą maksymalnego prawdopodobieństwa. Tego rodzaju analizy należy uznać za wystarczające do wstępnej klasyfikacji badanych izolatów oraz określenia ich zmienności genetycznej. Bardzo ważnym uzupełnieniem badań była próba wykonania sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Ze względu na fakt braku możliwości laboratoryjnej propagacji większości koronawirusów występujących u ptaków wolnożyjących konieczne było zastosowanie metody polegającej na zwiększeniu ilości matrycy w próbkach. Z problemem tym Doktorantka doskonale sobie poradziła prowadząc ten proces przy użyciu 3 różnych metod. Przeprowadzenie sekwencjonowania NGS zarówno w jednostce Doktorantki jak i w jednostce zewnętrznej oraz metodyka późniejszej obróbki wyników nie budzi żadnych zastrzeżeń. Ciekawym uzupełnieniem przeprowadzonych badań jest moim zdaniem badanie serologiczne, które Doktorantka przeprowadziła na 264 próbkach pochodzących od ptaków dzikich. Ważnym ze względów publikacyjnych elementem wszystkich badań biologicznych jest analiza statystyczna, którą Doktorantka wykorzystwała nie tylko do oszacowania występowania koronawirusów w populacji ptaków wolnożyjących, ale również do oceny sezonowości występowania tych wirusów u ptaków, co uważam za bardzo ciekawy pomysł.

Wyniki przedstawione są przez Doktorantkę w kolejności analogicznej do opisu metod. Obecność materiału genetycznego CoV stwierdzono u ok. 4% badanych ptaków należących do 10 gatunków, przy czym najliczniej izolowano je od ptaków blaszkodziobych i siewkowych. Co ciekawe koronawirusy stwierdzono również u gołębi. Natomiast w 7% próbek pulowanych potwierdzono obecność materiału genetycznego badanych wirusów z podobnym rozkładem

dominujących żywicieli. W kolejnej części rozdziału „Wyniki” Doktorantka wglębia się w szczegóły wynikające z analizy molekularnej badanych izolatów. W tym miejscu mam drobną uwagę do nazwy podrozdziału 4.3 tj. „Różnicowanie wykrytego CoV” (str. 60), który moim zdaniem powinien zostać przeredagowany. Tytuł „Różnicowanie badanych izolatów koronawirusów” ma moim zdaniem lepsze brzmienie. Wyniki sekwencjonowania I generacji wykazały, że w próbkach pochodzących od pojedynczych ptaków stwierdzono zarówno, obecność delta- jak i gammakoronawirusów ze zdecydowaną przewagą tych pierwszych. Prewalencja każdego z rodzajów koronawirusów różniła się ze względu na przynależność taksonomiczną żywiciela – ptaki blaszkodziobe były nosicielami gammakoronawirusów, natomiast siewkowe zakażone były oboma rodzajami CoV z niewielką przewagą gammakoronawirusów. Podobne wyniki uzyskano w przypadku próbek pulowanych. Analiza sezonowości występowania koronawirusów u wybranych gatunków ptaków, tj. mew (ogólnie), łabędzi niemych i krzyżówek wykazała różnice zależne od pory roku, bowiem najwyższą prewalencję stwierdzano od późnego lata do zimy. Powyższe Doktorantka słusznie tłumaczy rolą większego kontaktu międzysobniczego w trakcie migracji ptaków oraz największego w tym okresie odsetka ptaków młodocianych w populacji, które jak wiadomo mogą wykazywać większą wrażliwość na zakażenie wirusami. W tym miejscu mam jednak do Doktorantki pytanie – sezonowość występowania koronawirusów nie potwierdziła się w przypadku łabędzi niemych, a jak wiadomo, ptaki te również odbywają migracje łącząc się w grupy, nierzadko wielogatunkowe. Czy istnieje sposób na wytłumaczenie zjawiska braku sezonowości występowania koronawirusów u tego gatunku ptaków?

Kolejna część badań to analiza filogenetyczna przeprowadzona zarówno w oparciu o fragment genu RdRp jak i pełne sekwencje genomu uzyskane metodą NGS. Badania wykazały zmienność genetyczną koronawirusów izolowanych od ptaków dzikich. Moim zdaniem duże znaczenie pod kątem epidemiologicznym ma wykazanie faktu, iż jedna z podgrup filogenetycznych reprezentowana przez izolaty pochodzące od gęgawy i bażanta łownego tworzyła wspólną gałąź z groźnymi dla drobiu wirusami jak IBV i TCoV. Powyższe bowiem potwierdza rolę ptaków dzikich jako rezerwuarów koronawirusów groźnych dla drobiu w chowie przemysłowym. Ciekawy wydaje się również fakt potwierdzenia odrębnej grupy filogenetycznej gammakoronawirusów izolowanych od gołębi z Polski, Finlandii oraz Chin. Za ciekawe uważam także wyniki analizy filogenetycznej fragmentu genu RdRp deltakoronawirusów, która wykazała, że spośród 26 analizowanych szczepów aż 23 pochodziło od ptaków rodziny *Laridae*. Ponadto szczepy te tworzyły odrębną grupę filogenetyczną nie

reprezentowaną przez żaden ratyfikowany gatunek wirusa, co moim zdaniem wskazuje na potrzebę utworzenia oddzielnego gatunku w rodzaju *Buldecovirus* jakim byłby koronawirus mew. Ma to tym większe znaczenie, iż Doktorantce udało się uzyskać metodą NGS sekwencję pełnego genu jednego z mewich deltakoronawirusów, tym samym może on zostać uznany za szczep nominatywny dla nowoutworzonego gatunku. Powyższe zdecydowanie podnosi wartość przeprowadzonych przez mgr Justynę Miłek – Krupę badań i nadaje wynikom nowatorskiego charakteru. Podsumowując ocenę tej części rozdziału wyniki muszą stwierdzić, że ich główna wartość wynika przede wszystkim z wykrycia wspomnianych wyżej deltakoronawirusów mew oraz bażanta łownego. Izolat pochodzący od bażanta plasował się w grupie filogenetycznej skupiającej gatunek ratyfikowany przez ICTV jako koronawirus świń, co jest według mojej wiedzy pierwszym (opisanym) takim przypadkiem na świecie.

Rozdział „Wyniki” kończy krótkie podsumowanie badań nad seroprevalencją koronawirusów u ptaków dzikich. Z badań tych wynika, że aż 23% badanych surowic było seropozytywnych, jednakże spośród nich blisko 65% pochodziło od bocianów białych. Zjawisko to bardzo trafnie Doktorantka wyjaśnia w rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja” (str. 105), tłumacząc, że większość próbek od bocianów białych pobrano od ptaków przebywających w ośrodkach rehabilitacji. Utrzymywanie ptaków w tego typu ośrodkach z jednej strony mogło sprzyjać szerzeniu się wirusów wśród ptaków umieszczonych we wspólnej wolierze, a z drugiej z systemu karmienia ptaków – rekonwalescentów, w którym wykorzystuje się brakowane pisklęta. Powyższe może być przyczyną potencjalnego kontaktu bocianów z wirusami szczepionkowymi stosowanymi w ZWD.

Sam rozdział „Omówienie wyników i dyskusja”, jest stosunkowo obszerny, bowiem zawiera się na blisko 20 stronach, a Doktorantka z dużą trafnością odnosi się w nim do wszystkich uzyskanych wyników porównując je z danymi dostępnymi w literaturze światowej. Moim zdaniem część dysertacji poświęcona dyskusji omawianych wyników napisana jest w sposób klarowny i odzwierciedla dużą wiedzę Doktorantki z zakresu prowadzonych przez siebie badań oraz pokazuje Jej umiejętność analizowania danych, co jest ważną cechą w pracy badacza. Pozytywną stroną tego rozdziału jest Tab. 13, na podstawie której można dokonać porównania metod molekularnych służących do wykrywania koronawirusów.

Rozdziałem podsumowującym całą pracę jest stanowiący aż 11 punktów rozdział „Wnioski”. Moim zdaniem część wniosków jest zbyt rozwlekłe napisana i zdecydowanie można je skrócić (np. wniosek 2, 4, 6, 9) lub przeredagować, ponieważ w obecnej formie są to raczej stwierdzenia podsumowujące badania niż rzeczywiste wnioski (wnioski 4-11).

Ostatnią częścią omawianej dysertacji są dwustronicowe 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:

- Uzyskane wyniki badań wyraźnie wskazują na rolę ptaków dzikich w epidemiologii koronawirusów niebezpiecznych dla drobiu oraz wyjaśniają sezonowość występowania zakażeń wirusowych u ptaków wolnożyjących.
- Wyniki, mimo iż nie wymagały autorskiej metodyki mają nowatorski charakter, bowiem Doktorantka wykazała obecność deltakoronawirusów typowych dla przedstawicieli rodziny mewowate. Uzyskane wyniki zdecydowanie wymagają dalszych analiz a sekwencja izolatu dCoV/Poland/P350/2017 ma duże szanse zostać sklasyfikowana jako szczep wzorcowy dla nowego gatunku koronawirusa – Gull CoV.
- Wykryty w badaniach Doktorantki deltakoronawirus bażanta jest - jak do tej pory - pierwszym i jedynym przypadkiem na świecie wykrycia u ptaka z rodziny grzebiących koronawirusa blisko spokrewnionego z wirusem występującym u ssaków – koronawirus świń (HKU15).

Oceniając ogólne przygotowanie nadesłanej mi do oceny dysertacji z przyjemnością stwierdzam, że praca przygotowana została bardzo starannie a jej czytelności nadają kolorowe grafiki i dobrze opracowane tabele. Jednak z obowiązku wnikliwego recenzenta pragnę zwrócić uwagę Doktorantce na następujące, drobne niedociągnięcia:

- W pracy znajdują się nieliczne błędy dotyczące zarówno polskich jak i łacińskich nazw gatunkowych ptaków, np. str. 10 „Night heron” w wolnym tłumaczeniu oczywiście oznacza czaplę nocną, ale w rzeczywistości chodzi o przedstawicieli ptaków m.in. z rodzaju *Nycticorax*, czyli ślepowrony; na str. 28 nazwa łacińska gołębi sportowych jest poprawna, ale w związku z tym iż są to zwierzęta udomowione powinna ona brzmieć „*Columba livia f. domestica*” – gołębie sportowe morfologicznie różnią się od ich dzikich protoplastów; str. 36, Tab. 3: łacińska nazwa śmieszki, która w tabeli zapisana jest jako „*Larus ridibundus*” wg aktualnej nomenklatury brzmi „*Chroicocephalus ridibundus*”; str. 37, Tab. 3: „*Pica Pica*” – drugi człon nazwy gatunkowej sroki zwyczajnej powinien być pisany z małej litery; str. 37, Tab. 3: bielik nie należy do orłów, tylko do orłanów, więc określenie gatunkowe „Orzeł bielik” jest nieco niefortunne – w

standardowej nomenklaturze ptak ten zwany jest po prostu „bielikiem”, str. 91: „bekas krzyk” – nazwa gatunkowa brzmi „bekas kszyk”; str. 93: nazwa gatunkowa łabędzia krzykliwego to nie „Whooper swan” – nazwa angielska – tylko „*Cygnus cygnus*”.

- Bardzo częstym błędem w monografiach jak i publikacjach jest pojawiający się zwrot „reakcja PCR”, gdzie w rzeczywistości ostatnia litera skrótu „PCR” oznacza reakcję. Błędu tego nie uniknęła również Doktorantka – str. 47, 49, 52.
- Równie częstym błędem jest stosowanie niewłaściwej nomenklatury do materiału pobranego do badań, czyli „próbek”, które często mylnie nazywane są „próbami”, co również przytrafiło się Doktorantce na str.: 57, 58, 63, 65, 90 ...
- Tytuł Tab. 11: „Położenie ORF-ów i ich długości ...” powinien zostać przeredagowany na „Położenie otwartych bramek odczytu i ich długości ...”, bowiem w pracach naukowych nie powinno stosować się skrótów myślowych ani żargonu laboratoryjnego.
- Dla lepszej przejrzystości należałoby ujedlinić metodę zapisu wyników przewalencji CoV, której odsetek w tekście na str. 53 podawany jest do 2 miejsc po przecinku a w wybranych kolumnach Tab. 5 zaokrąglony jest do jednego miejsca po przecinku.
- Ponadto w pracy występują nieliczne błędy literowe (str. 16 „aparat Golgie”, zamiast „aparat „Golgiego”; str. 26 „specyficznymi” zamiast „specyficznych”; str. 26 „część” zamiast „część”; str. 28 „u ich” zamiast „u nich”; str.: 65 „szczepów koronawirusowych” zamiast „szczepów koronawirusów”; str. 81-83: „szczepów deltakoronawirusowych” również powinno zostać zamienione na „szczepów deltakoronawirusów”; str. 96: „podchodzenie” powinno być zamienione na „pochodzenie” itp.) i edycyjne (np. często brakuje kropki na końcu zdania, jak na str.: 10, 17, 22, 26, 31, 45, 46, ... 100; podwójne spacje jak na str.: 20-22, 24, 29, 30 ...).
- Niektóre zdania wymagają przeredagowania ze względu na nieczytelną składnię, jak np. na str. 71 zdanie rozpoczynające się w 9 wierszu (licząc od dołu strony).

Reasumując stwierdzam, że pomimo powyższych uwag, które określić należy jako błędy edycyjne lub błędy merytoryczne o małym znaczeniu moja ocena tej dysertacji jest pozytywna. Zrealizowana rozprawa doktorska rzuca nowe światło na epidemiologię koronawirusów u ptaków dzikich i zdecydowanie może stanowić podstawę do dalszych badań z tego zakresu. Konkludując wyrażam opinię, iż rozprawa doktorska pt. „Występowanie gamma i deltakoronawirusów w populacji dzikich ptaków na terenie Polski i ich rola w epidemiologii zakażeń koronawirusami drobiu” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym



oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. oraz przepisów ją wprowadzających, tj. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669 ze zm.), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Justyny Miłek-Krupy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na fakt, że przedłożona mi do oceny praca wnosi nowe dane w wiedzę dotyczącą koronawirusów występujących u ptaków wolnożyjących i wskazuje na istnienie potencjalnie nowych gatunków tych wirusów, co ma duże znaczenie poznawcze, wnioskuję o wyróżnienie ewaluowanej dysertacji stosowną nagrodą.

dr hab. Tomasz Stenzel, prof. UWM

