

Prof. dr hab. Marcin Bańbura
Zakład Mikrobiologii
Katedry Nauk Przedklinicznych
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Warszawa, 07.08.2023

**Recenzja wniosku dr n. wet., inż. Anny Orłowskiej
o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego
na podstawie osiągnięcia naukowego pt.
„WYSTĘPOWANIE WIRUSÓW ZOONOTYCZNYCH W POPULACJI NIETOPERZY W POLSCE”
oraz całokształtu dorobku naukowego**

Recenzję sporządzono na podstawie uchwały Nr 26/2023 z dnia 6 czerwca 2023 r. Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach oraz Art. 221, pkt 8. Ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 16 marca 2021, poz. 478 – tekst jednolity Ustawy).

Wydarzenia ostatniego ćwierćwiecza dowodzą, że zagrożenia wynikające bądź to z pojawiania się nowych wirusowych czynników zakaźnych, bądź ze zmian ich geograficznego rozprzestrzenienia, są całkiem realne. Wirus grypy jest klasycznym już tego przykładem. Obok niego wymienić można wirusy Nipah, SARS, MERS, Zika, czy w końcu wirus choroby Zachodniego Nilu. Do listy tej dołączają jeszcze gorączki krwotoczne powodowane przez wirus Ebola, *Flavi-*, *Arena-* i *Bunyaviridae*, a także odkleszczowe zapalenie mózgu, hantawirusowy zespół płucny, limfocytarne *choriomeningitis* i wiele innych. Nie sposób także pominąć wściekliznę, która wprawdzie w krajach rozwiniętych została właściwie zwalczona i zachorowania wśród ludzi zdarzają się rzadko, jednak w Ameryce Południowej czy Azji nie należą do rzadkości – w Indiach na przykład ciągle notuje się 25 000 do 30 000 zgonów wskutek pokąsania przez wściekłe zwierzęta.

Na naszej szerokości geograficznej większość z wymienionych wyżej wirusów nie stanowi wprawdzie dużego problemu, jednak globalizacja transportu i migracje ludności są uwarunkowaniami komplikującymi sytuację epidemiologiczną. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym ryzyko pojawiania się zagrożeń, wirusów o nowych bądź zmienionych właściwościach, jest zasiedlanie przez człowieka nowych obszarów, wcześniej pozostających domeną Natury. Powoduje to bliższy kontakt zarówno człowieka, jak i hodowanych przez niego zwierząt z dziką przyrodą co ułatwia przenoszenie chorób, w tym wirusowych, ze zwierząt wolnożyjących na gospodarskie i, pośrednio lub bezpośrednio, na ludzi. Nie bez znaczenia jest też obrót zwierzętami dziko żyjącymi – ich kontakt z gatunkami z którymi w normalnych warunkach nie miałyby szans się zetknąć powodować może trudne do przewidzenia skutki.

Region geograficzny w którym żyjemy jest pod względem wspomnianych wyżej zagrożeń relatywnie bezpieczny. Jednak skromna wiedza o występowaniu u zwierząt w Polsce wirusów zoonotycznych, innych niż wirus wścieklizny, nie pozwala na wiarygodne oszacowanie ryzyka przeniesienia ich na człowieka. Z drugiej strony, wydarzenia ostatnich czterech lat i pandemia SARS-CoV-2 silnie wspierają hipotezę o szczególnej roli nietoperzy jako rezerwuaru wirusów realnie niebezpiecznych dla człowieka, wystarczy wspomnieć o szacunkowych danych mówiących o ponad 400 gatunkach samych koronawirusów występujących u tych ssaków na Dalekim Wschodzie. Przedłożona mi do oceny rozprawa habilitacyjna znacząco przyczynia się do uzupełnienia tej wiedzy i stanowi znakomity wstęp zachęcający do kontynuacji tego rodzaju badań i, być może, rozszerzenia ich zakresu.

1. Charakterystyka osiągnięcia naukowego

Podstawą przedłożonego mi wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk weterynaryjnych jest osiągnięcie naukowe zatytułowane „**Występowanie wirusów zoonotycznych w populacji nietoperzy w Polsce**”, na które składa się pięć spójnych tematycznie publikacji o łącznym współczynniku wpływu równym 21.429 i sumarycznej punktacji MEiN wynoszącej 470.

Celem głównym jaki wyznaczyła sobie Habilitantka była ocena występowania wybranych wirusów u nietoperzy w Polsce, z uwzględnieniem, jak podkreśla sama Autorka, tych o potencjale zoonotycznym, oraz określenie pokrewieństwa filogenetycznego izolatów krajowych z izolatami pochodzącymi z innych krajów.

Celami szczegółowymi natomiast było, cytując:

1. „*Określenie seroprewalencji oraz występowania lyssawirusów u różnych gatunków nietoperzy w Polsce, pozyskanych w ramach urzędowego nadzoru nad wścieklizną*”
2. „*Wykrywanie zakażeń astrowirusami w populacji nietoperzy w kraju*”
3. „*Badanie występowania koronawirusów w populacji nietoperzy w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem nietoperzy z gatunku podkowców (Rhinoloptidae), uznawanych za rezerwuara wirusów SARS-podobnych*”
4. „*Wykrywanie zakażeń hantawirusami w populacji nietoperzy w kraju*”

Osiągnięcie szczegółowego celu nr 1 opisane jest w trzech pierwszych publikacjach:

- i) Smreczak M., Orłowska A., Marzec A., Trębas P., Müller T., Freuling C.M., Żmudziński J.F. **Bokeloh bat lyssavirus isolation in a Natterer's bat, Poland.** *Zoonoses Public Health.* 2018, 65, 1015–1019. (40% udziału)
- ii) Smreczak M., Orłowska A., Trębas P. **Wykrycie BBLV u nocka Natterera w Polsce.** *Medycyna Wet.* 2020, 76 (2), 119-123. (40% udziału)
- iii) Orłowska A., Smreczak M., Freuling C.M., Muller T., Trębas P., Rola J. **Serological Survey of Lyssaviruses in Polish Bats in the Frame of Passive Rabies Surveillance Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.** *Viruses,* 2020, 12(3), 271. (60% udziału).

Habilitantka opisała wyniki serologicznych badań nad występowaniem wirusa wścieklizny u różnych gatunków nietoperzy w Polsce oraz, na podstawie analizy sekwencji nukleotydów, określiła stopień pokrewieństwa nowo wykrytego u nocka Natterera szczepu BBLV (*Bokeloth bat lyssavirus*). Badanie płynów ustrojowych pochodzących od padłych nietoperzy wykazało występowanie swoistych dla wirusa wścieklizny przeciwciał u 9 spośród 13 przebadanych gatunków, przy czym u tych 4 z nich, u których stwierdzano najwyższy odsetek wyników dodatnich, wahał się od 10.7 do 25% w zależności od gatunku. Przy okazji wykonywania badań wykazano przydatność do tego celu komercyjnego zestawu diagnostycznego, potwierdzoną metodami referencyjnymi.

W publikacji **Orłowska A., Smreczak M., Potyrało P., Trębas P., Bomba A., Rola J. First Detection of Bat Astroviruses (BtAstVs) among Bats in Poland: The Genetic BtAstVs Diversity Reveals Multiple Co-Infection of Bats with Different Strains.** *Viruses*, 2021, 13(2), (70% udziału) Autorka zawarła wyniki badań nad występowaniem u nietoperzy astrowirusów, stanowiące osiągnięcie szczegółowego celu nr 2. Obecność wirusowego RNA stwierdzono w różnych tkankach pochodzących od padłych zwierząt, a analiza genomów wykazała przynależność wykrytych szczepów do grupy typowej dla nietoperzy, istotnie różniącej się od astrowirusów zakażających inne ssaki. Stwierdzono przy tym wysoką ich zmienność zawartą w przedziale 54.4-100%, a analiza sekwencji wirusowego RNA pochodzącego od różnych gospodarzy pozwoliła na wykrycie zakażeń mieszanych, spowodowanych przez genetycznie odległe szczepy.

W publikacji autorstwa **Orłowska A., Smreczak M., Thor K., Niedbalska M., Pawelec D., Trębas P., Rola J. „The Genetic Characterization of the First Detected Bat Coronaviruses in Poland Revealed SARS-Related Types and Alphacoronaviruses.”** *Viruses* 2022, 14, 1914. (udział 70%) przedstawione zostały wyniki prowadzące do realizacji celu szczegółowego nr 3 dotyczącego występowania u nietoperzy zakażeń koronawirusami. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono występowanie koronawirusów SARS-podobnych u niemal wyłącznie u *Rhinolophus hipposideros* oraz dokonano analizy filogenetycznej i porównania z innymi, wcześniej opisanymi w literaturze szczepami. Autorka stwierdziła również, że uzyskane wyniki potwierdzają wysoką specyficzność gatunkową koronawirusów „...w stosunku do żywicieli, u których były wykrywane.”

Czwartym i ostatnim celem naukowym jaki postawiła sobie Habilitantka było wykrywanie zakażeń hantawirusami u nietoperzy, a wyniki uzyskanie w tym zakresie zostały opublikowane w pracy: **Dafalla M.; Orłowska A.; Keleş, S.J.; Straková, P.; Schlottau, K.; Jeske K.; Hoffmann, B.; Wibbelt, G.; Smreczak, M.; Müller, T.; Freuling, C.M.; Wang, X.; Rola, J.; Drewes, S.; Fereidouni, S.; Heckel, G.; Ulrich, R.G. „Hantavirus Brno loanvirus (Hantaviridae) is highly specific to the common noctule bat (*Nyctalus noctula*) and widespread in Central Europe.”** *Virus Genes*. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01952-2> (udział 40%). Łącznie przebadano próbki od ponad tysiąca zwierząt pochodzących z Niemiec, Austrii i Polski.

Techniką RTm RT-PCR Brno loanwirus wykryty został u siedmiu nietoperzy z gatunku borowiec wielki, u trzech z Niemiec, jednego z Austrii i trzech z Polski. Analiza filogenetyczna wykazała, że wszystkie one były blisko spokrewnione z wirusem wykrytym w Czechach.

2. Charakterystyka dorobku publikacyjnego:

Tytuł magistra inżyniera biotechnologii Kandydatka uzyskała w 2004 roku po ukończeniu Międzywydziałowego Studium Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, w specjalności Biotechnologia w produkcji i ochronie zdrowia zwierząt. Miedzy kwietniem a sierpniem 2005 roku zatrudniona była w Pracowni Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (na stronie 3 jako lata zatrudnienia tamże podaje 2004-2005, czy to błąd?) i w latach 2003-2005 ukazało się 5 prac oryginalnych z Jej udziałem. Ponadto wyniki badań prezentowane były na kilku konferencjach naukowych.

Od września 2005 Pani dr Orłowska zatrudniona została w Zakładzie Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, a jej zainteresowania naukowe skupiły się na diagnostyce wścieklizny, w szczególności na wykorzystaniu narzędzi biologii molekularnej do wykrywania i badań nad zmiennością genetyczną lyssawirusów. Od chwili zatrudnienia w PIW-PIB praca naukowa Habilitantki konsekwentnie związana była z wirusologią, czego efektem było opublikowanie licznych prac, w tym składających się na osiągnięcie będące podstawą wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Ogółem, przed uzyskaniem stopnia doktora, opublikowanych zostało 9 prac o łącznym współczynniku wpływu 3.152 i 112 punktach MEiN. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych w 2012 roku w czasopismach indeksowanych ukazały się, z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia, 34 pozycje o łącznym współczynniku wpływu 56.066 i 1870 punktach MEiN. W sześciu z nich Kandydatka widnieje jako pierwszy autor. Ponadto w czasopismach spoza listy czasopism punktowanych pojawiło się 5 pozycji przed i 6 po uzyskaniu stopnia doktora. Część badań realizowana była we współpracy z ośrodkami innymi niż PIW-PIB, również zagranicznymi, czego efektem były publikacje z udziałem badaczy z innych krajów, np. pozycje 7-14 wykazu publikacji po uzyskaniu stopnia doktora.

3. Charakterystyka innej istotnej działalności naukowej:

Kandydatka brała udział, jako wykonawca, w realizacji dwóch projektów: KNOW2018/PIWet-PIB/LAB2/9 w ramach Konsorcjum Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego, oraz międzynarodowego ASKLEPIOS 2013-2016, FP7-HEALTH-2013-INNOVATION-1, No. 602825. Jako Kierownik natomiast realizowała projekt w ramach KNOW UMO-KNOW 2018/PIWet-PIB/MN1/01/5 oraz grant MINIATURA 5 w latach 2021-2022. Obecnie, jako wykonawca, bierze udział w realizacji dwóch projektów. W latach 2007-2022 uczestniczyła, jako wykonawca, w pracach licznych zespołów badawczych, a obecnie w dwóch z nich pełni funkcję kierownika i w jednym – wykonawcy.

Habilitantka odbyła trzy krótkoterminowe szkolenia w ośrodkach zagranicznych – 2 tygodniowy w Referencyjnym Laboratorium ds. Wścieklizny, Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife, Malzeville, Francja, tygodniowe szkolenie w Duńskim Uniwersytecie Technicznym w Kopenhadze oraz dwutygodniowe szkolenie w Friedrich-Loeffler-Institut, Niemcy.

Kandydatka jest autorem 20 recenzji publikacji w czasopismach naukowych z listy JCR oraz jednej recenzji wniosku grantowego złożonego do słowackiej agencji VEGA Scientific Grant Agency Ministerstwa Edukacji Republiki Słowackiej i Słowackiej Akademii Nauk.

W ramach współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym Pani dr Orłowska prowadziła od 2013 roku liczne szkolenia przeznaczone dla pracowników Inspekcji Weterynaryjnej oraz jest autorką ponad 20 opinii i ekspertyz, przeważnie związanych z diagnostyką zakażeń wirusowych u zwierząt.

4. Ocena osiągnięcia naukowego dr n. wet., inż. Anny Orłowskiej:

Przedstawione jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego cykl publikacji jest spójny tematycznie i stanowi znaczny wkład w rozwój nie tylko dyscypliny weterynaria, ale stanowi cenne uzupełnienie wiedzy ważnej z punktu widzenia bezpieczeństwa i zdrowia człowieka. Zwłaszcza, że w Polsce, jak dotąd, prowadzono bardzo niewiele badań tego typu. Wydarzenia ostatnich lat, w tym epidemie SARS, MERS czy pandemia SARS-CoV-2, wskazują z kolei, że rola nietoperzy jako rezerwuarów wirusów potencjalnie niebezpiecznych dla ludzi nie może być lekceważona i osiągnięcie Habilitantki dotyczy tematu niezwykle ważnego i interesującego, któremu warto poświęcić więcej uwagi. W mojej opinii przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora habilitowanego nauk weterynaryjnych.

5. Ocena aktywności naukowej Habilitantki

Z zamieszczonego w dokumentacji wykazu osiągnięć naukowych wynika, że właściwie od początku zatrudnienia w Zakładzie Wirusologii zainteresowania Kandydatki skupiały się na zagadnieniach związanych z wścieklizną, którym poświęcona była zdecydowana większość publikacji w czasopismach indeksowanych. Zaznaczyć w tym miejscu należy, że niektóre z nich ukazały się w tytułach o współczynniku wpływu przekraczającym 5, a nawet 6.

Zakażenia wirusem wścieklizny są z pewnością wątkiem dominującym w dorobku naukowym Pani dr Orłowskiej, aczkolwiek nie jedynym – wśród publikacji znajdujemy również pozycje związane z chorobą niebieskiego języka, a w ostatnich latach, co wydaje się poniekąd oczywiste, pojawiły się również prace dotyczące koronawirusów. Część prac opublikowana była we współautorstwie z badaczami zagranicznymi, co było efektem współpracy międzynarodowej Kandydatki.

Prócz publikacji w czasopismach indeksowanych Habilitantka prezentowała też wyniki swoich badań podczas licznych konferencji naukowych, czy to w formie plakatów, czy wystąpień ustnych, co stanowi cenne uzupełnienie dorobku publikacyjnego. Jest również doświadczonym recenzentem prac naukowych - autorem 20 recenzji publikacji naukowych które ukazały się w języku angielskim w czasopismach z listy JCR.

Kandydatka ma również pewne doświadczenie w realizacji grantów badawczych, głównie jako wykonawca, w dwóch natomiast występowała w charakterze kierownika. W mojej opinii opisana we wniosku habilitacyjnym, szeroko rozumiana aktywność naukowa Pani dr Anny Orłowskiej jest aktywnością istotną i spełnia wymagania niezbędne do nadania stopnia doktora habilitowanego.

Ocena osiągnięcia naukowego oraz całokształtu dorobku naukowego kandydatów do nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego odbywa się na podstawie przedłożonych wniosków zawierających wymagane ustawą informacje, a recenzenci wydają swoje opinie po zapoznaniu się z ich treścią. Integralną częścią każdego wniosku jest autoreferat zawierający wprowadzenie, cel podjętych badań i ich uzasadnienie, omówienie przeprowadzonych badań i ich wyników oraz podsumowanie i wnioski. Podczas lektury przedłożonego mi wniosku dr n. wet., inż. Anny Orłowskiej nasunął mi się cały szereg spostrzeżeń i uwag, które, z obowiązku recenzenta, zmuszony jestem przedstawić poniżej.

Wątpliwość budzi zestawienie badanych przez Autorkę zakażeń różnymi wirusami z tytułem rozprawy, bowiem do wirusów zoonotycznych zaliczyła ona astrowirusy, podczas gdy nie spotkałem się w dostępnej literaturze z publikacjami opisującymi transmisję astrowirusów ze zwierzęcia na człowieka. Uznanie ich zatem za zoonotyczne uważam za co najmniej przedwczesne.

Na stronie 7 czytamy, że (nietoperze) „...są jedynymi ssakami posiadającymi zdolność aktywnego lotu dzięki zintegrowanej błonie lotnej z palcami.” Czy istnieje może zintegrowana błona bez palców? Nieprawidłowy szyk wyrazów w zdaniu sprawia, że jego sens nie jest oczywisty.

Na tejże stronie zdania: „Zdolność aktywnego lotu oraz nocny tryb życia, to cechy, wyróżniające nietoperze spośród pozostałych rzędów ssaków, a które pozwoliły im na opanowanie wielu nisz ekologicznych niedostępnych dla innych zwierząt. Zwierzęta te występują na całym świecie.” sugerują, że na całym świecie występują zwierzęta dla których wiele nisz ekologicznych pozostaje niedostępnych. Natomiast ze zdania „...że bliskie kontakty pomiędzy nietoperzami i ludźmi oraz zwierzętami domowymi są przyczyną powstawania chorób.” wynika, że skutkiem bliskiego kontaktu człowieka ze zwierzętami są choroby, można zatem przypuszczać, że chodzi tu również o reumatyzm, marskość wątroby, chorobę wieńcową i inne choroby wewnętrzne.

Na stronie 8 czytamy: „Epidemie SARS oraz MERS, których źródło pochodzenia od nietoperzy zostało udokumentowane...”; sformułowanie „źródło pochodzenia od nietoperzy” brzmi nienaturalnie i dziwacznie, i winno być zastąpione przez, np. „których pochodzenie od nietoperzy zostało udokumentowane”. Z tekstu na tej samej stronie dowiadujemy się, że „Nietoperze są uznawane za rezerwuar i żywicieli wysoce patogennych oraz zoonotycznych czynników takich jak: lyssawirusy wywołujące wściekliznę, wirus Marburg, wirus Nipah, wirus Hendra, koronawirusy”. Otóż termin „żywiciel” zarezerwowany jest dla pasożytów! A użycie go w odniesieniu do wirusów jest, z oczywistych względów, niedopuszczalne! Dalej na tej samej stronie Autorka stwierdza, że „Liczne przypadki chorób u ludzi i zwierząt w ostatnich dziesięcioleciach wskazały na rolę nietoperzy jako zagrożenie dla zdrowia publicznego.”,

choć nie wyjaśnia, jaki jest związek chorób występujących u ludzi i zwierząt z rolą nietoperzy jako zagrożenia dla zdrowia publicznego.

Na stronie 9 Habilitantka przyjmuje, że pandemia SARS-CoV-2 ciągle jeszcze trwa, co nie do końca zgodne jest z prawdą. Stwierdzenie, na tej samej stronie, że efektem wzrostu temperatury ciał nietoperzy podczas lotu, imitującego gorączkę, jest „...możliwość selekcji wirusów odpornych na mechanizmy obronne gospodarza i tym samym zdolnych do przetrwania w organizmie nowo zakażonego osobnika pomimo uruchomionej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie.” jest nieuprawnione. W tym przypadku mówić można jedynie o selekcji szczepów wirusa o zwiększonej tolerancji na podwyższoną temperaturę, nie zaś na „uruchomioną odpowiedź immunologiczną”. Na tej samej stronie znów znaleźć można „żywiciela” wirusów.

Na stronie 10 w linii 2 i 3 słowo „nietoperzy” powtórzone jest trzykrotnie. Nie jest to oczywiście błąd, należałoby jednak rozważyć nieco inny sposób wyrażenia zawartej w tym zdaniu myśli. Nieco niżej znów napotykamy „żywiciela” wirusa. Błąd ten jest, niestety powtórzony w tekście co najmniej kilka razy.

Na stronie 11 zdanie „Niemniej jednak stosunkowo nieliczne badania dotyczące występowania wirusów u nietoperzy w Europie wykazały występowanie koronawirusów, adenowirusów, astrowirusów, hantawirusów, paramyksowirusów, cirkowirusów i innych wirusów zarówno u nietoperzy jak i w ich odchodach.” Brzmi nieco dziwnie; wynika z niego bowiem, że badania dotyczące występowania wirusów u nietoperzy wykazały występowanie (.....) wirusów u nietoperzy... I w tym miejscu należałoby rozważyć przeformułowanie całego zdania.

Na stronie 11, w opisie celu podjętych badań, Habilitantka stwierdza, że jednym z głównych celów było „...określenie pokrewieństwa krajowych izolatów (sekwencji nukleotydowych) wykrytych wirusów z sekwencjami patogenów, które wyizolowano od nietoperzy w Europie jak również na świecie.” Mowa tu o „izolatach” podczas gdy Autorka *de facto* wirusów nie izolowała, a jedynie wykazywała ich obecność, bądź obecność specyficznych dla nich przeciwciał. Użycie słowa „izolat” wynika, być może, z zastosowania kalki z języka angielskiego. Jednakże nawet przyjmując je za prawidłowe, wskazane przez podkreślenie zestawienie „...określenie pokrewieństwa krajowych izolatów (sekwencji nukleotydowych) wykrytych wirusów z sekwencjami patogenów...”, czym są bowiem „krajowe izolaty wykrytych wirusów”? Zastanawia też sens użycia w nawiasie terminu „sekwencji nukleotydowych”, czego bowiem w końcu pokrewieństwo badano, „krajowych izolatów” czy „sekwencji nukleotydowych”? I czy w ogóle można mówić o pokrewieństwie sekwencji? Błędne jest również użycie terminu „sekwencji nukleotydowych”, bowiem chodzi tu o sekwencję (czego?) - nukleotydów, a nie (jaką?) - nukleotydową. Błąd ten, jest niestety, popełniany bardzo często. Błędnie użyty jest również termin „częstotliwość wystąpienia”, bowiem „częstotliwość” oznacza liczbę wystąpień zdarzenia w jednostce czasu (np. na sekundę) i w tym miejscu należałoby użyć słowa „częstość”. W dalszej części tego samego zdania Autorka stawia znak równości między „wystąpieniem patogenu” a „chorobą”, co w wielu wypadkach nie jest

równoznaczne. Podczas zakażenia latentnego herpeswirusami, czy we wczesnej fazie zakażenia retrowirusami „występuje patogen”, ale nie „choroba”.

Na stronie 13 znajdujemy stwierdzenie, że „...jedynym odpowiednim sposobem oceny występowania wścieklizny u nietoperzy jest urzędowy bierny nadzór, który jest metodą z wyboru i jest zalecany przez organizacje międzynarodowe.” Czyli „sposobem oceny” jest „bierny nadzór”, który jest w dodatku „jedynym odpowiednim sposobem”. To zdanie daje do myślenia, zwłaszcza, że już dwie linijki niżej znaleźć można informację o sposobie alternatywnym, nadzorze aktywnym. Treść tego fragmentu sugeruje, że nie jest to sposób odpowiedni, skoro jedynym odpowiednim jest nadzór bierny.

Na stronie 14 Habilitantka wyraża pogląd, że serologiczne „Testy te są niestety pracochłonne, a w odniesieniu do próbek surowic nietoperzy, dodatkowo, stanowią wyzwanie nad interpretacją wyników badań...”. Czy można stanowić wyzwanie nad czymś? A może lepiej byłoby napisać „a interpretacja ich wyników stanowi wyzwanie z uwagi na występowanie reakcji nieswoistych”?

Na stronie 15 zastanawiają przedstawione przez Kandydatkę dane liczbowe ilustrujące odsetek przeciwciał specyficznych dla lyssawirusów u różnych gatunków nietoperzy. Jak możliwe jest, aby przy $n=7$ odsetek ten wynosił równo 25%? Albo przy $n=6$ odsetek osiągał 21.4%? Przy $n=5$ – 17.8%, a przy $n=3$ tylko 10.7%? Zwłaszcza, że porównanie danych widniejących w Autoreferacie z danymi zawartymi w tabeli 1 w publikacji 4.3 sugeruje, że wartości liczby n oznaczają liczbę próbek z wynikiem dodatnim, co jest nieco mylące. Nie wyjaśnia również różnicy w wartości procentowej między danymi z Autoreferatu i odpowiednimi wartościami z tabeli 1 wyżej wspomnianej publikacji. Ponadto w samej publikacji wartości n zawarte w opisie tabeli nie zgadzają się z tymi widniejącymi w samej tabeli, np. w opisie liczba n dla *Eptesicus serotinus* równa jest 32, a w tabeli – 31. Dla czytelnika nie jest do końca jasne, czy są to błędy Autorki, czy też problem ze zrozumieniem ze strony czytającego. Niemniej jednak, dane te winny być przedstawione w sposób nie budzący wątpliwości. **Na tej samej stronie** Autorka stwierdza, że „Wyniki badań są oryginalne, gdyż potwierdzałyby hipotezę międzygatunkowej transmisji lyssawirusów krążących u nietoperzy od powszechnie znanych rezerwuarów (jak *E. serotinus*).....” Oznacza to, że wynik badań są oryginalne ponieważ potwierdzają hipotezę transmisji wirusów. Wydaje mi się, że wynik te są oryginalne nie dlatego, że potwierdzają hipotezę, ale dlatego, że są pierwszymi potwierdzającymi hipotezę. I dobrze byłoby rozszerzyć badania w celu uzyskanie całkowitej pewności.

Na stronie 17 w dwóch pierwszych liniijkach, w jednym zdaniu niepotrzebne jest powtórzenie terminu „testu immunofluorescencji bezpośredniej”. **Na tej samej stronie**, obok prawidłowej nazwy gatunkowej Bat Bokeloh LyssaVirus widnieje nazwa nieprawidłowa, *lyssavirus Bokeloh*. Dwuczłonowa nazwa gatunkowa zarezerwowana jest dla organizmów żywych.

Na stronach 18 i 19 znów natknąć się można na „żywciele” wirusów. **Na 19** w zdaniu „...AstV izolowane od nietoperzy wykazywały bliskie pokrewieństwo filogenetyczne z astrowirusami wykrywanyymi u lisów, myszy, norek, owiec, ludzi, a nawet ptasimi

astrowirusami z rodziny Avastroviridae....” Zawarta jest sugestia, że istnieją inne ptasie astrowirusy które mogłyby pochodzić z rodziny innej niż *Astroviridae*. Na tej samej stronie „...RNA astrowirusów zostało wykryte...”, podczas gdy RNA, jako kwas, jest rodzaju męskiego, a zatem „został wykryty”. Błąd ten popełniany jest bardzo często. Nieco niżej, również na tej stronie *Pipistrelle* (właściwiej byłoby *Pipistrellus*) opisany jest jako gatunek, podczas, gdy jest to rodzaj.

Na stronie 20 Autorka zamieściła ciekawą obserwację, iż „...określone warianty astrowirusów zakażają określone gatunki nietoperzy. Z drugiej strony przeprowadzone badania wykazały występowanie u tego samego gatunku nietoperzy odległych genetycznie astrowirusów.” Badania nad występowaniem astrowirusów u nietoperzy prowadzone były w kontekście możliwej ich transmisji na człowieka i spostrzeżenie to, w mojej opinii, możliwości takiej nie potwierdza. Nieco dalej znajdujemy stwierdzenie, że „Zastosowanie głębokiego sekwencjonowania, dodatkowo pozwoliło na wykrycie u pięciu (41,7%) spośród 12 nietoperzy współzakażenia odległymi genetycznie astrowirusami, co sprzyja powstawaniu nowych rekombinantów o odmiennej charakterystyce genotypowej oraz fenotypowej”, nie jest jednak jasne, na jakiej podstawie Kandydatka wspomina o zmienności fenotypowej skoro badania fenotypowe nie były przez Nią prowadzone. Poważne wątpliwości budzi również zdanie na stronie 21: „Występowanie u jednego osobnika odległych genetycznie astrowirusów sprzyja zjawisku rekombinacji i powstawaniu nowych, odmiennych genetycznie AstV; w tym zdolnych do przełamania bariery międzygatunkowej stwarzając potencjalne ryzyko transmisji wirusa od nietoperzy do zwierząt domowych i ludzi.” Owe odmiennie genetycznie AstV których występowanie Kandydatka stwierdzała u tego samego osobnika ciągle pozostają astrowirusami nietoperzy i trudno mi wyobrazić sobie, że rekombinacja między nimi prowadzić może do powstawania wariantów zdolnych do przełamania bariery międzygatunkowej i transmisji wirusa na inne gatunki ssaków. Co innego gdyby ten sam nietoperz zakażony był wirusem nietoperzy i dodatkowo wirusem pochodzącym od innego gatunku. Nieco niżej na tej samej stronie czytamy, że „Uzupełnienie bazy GenBank, z kolei, o sekwencje nukleotydowe kolejnych izolatów astrowirusów dostarcza cennych danych epidemiologom molekularnym śledzącym ewolucję astrowirusów jak również umożliwia określenie ryzyka przełamania bariery międzygatunkowej w kontekście zdrowia publicznego.” Mogę się oczywiście mylić, ale nie widzę związku uzupełnienia bazy GenBank o sekwencje nukleotydowe (znów ten sam błąd) a określaniem ryzyka przełamania bariery międzygatunkowej. Na jakiej bowiem podstawie można to stwierdzić analizując sekwencje nukleotydów różnych szczepów?

Pisząc o badaniach występowania koronawirusów u nietoperzy w Polsce Autorka wspomina o trzech dużych epidemiach spowodowanych przez koronawirusy – SARS, MERS i COVID-19. O ile COVID-19 z całą pewnością był taką dużą, nie tylko epi-, ale pandemią, o tyle SARS i MERS liczyły sobie odpowiednio niespełna 9000 i nieco ponad 2600 przypadków.

Na stronie 22 widnieje sformułowanie: „Z materiału klinicznego (...) izolowano materiał genetyczny, który następnie poddawany był badaniu w kierunku obecności RNA koronawirusów.” Podkreślony fragment brzmi nieco dziwnie, badanie wykonuje się bowiem

na ogół na obecność, nie zaś w kierunku obecności. W następnym zdaniu RNA znów staje się rodzajem nijakim.

Na stronie 23 i 24 znów napotykamy „sekwencje nukleotydowe”, natomiast na 25 znów występują „żywiciele” wirusów. Z ostatniego zdania tej części tekstu dowiadujemy się, że „...omawiane powyżej wyniki badań dostarczyły bardzo cennych, oryginalnych i unikatowych w skali kraju informacji na temat występowania i rozprzestrzenienia koronawirusów w populacji nietoperzy w Polsce i wzbogaciły wiedzę europejską i światową na temat zagrożeń dla człowieka ze strony koronawirusów.” W mojej opinii to badania, a nie ich wyniki, dostarczyły cennych informacji, wyniki są wszak tą informacją. I chyba to ze strony nietoperzy, nie koronawirusów, istnieją zagrożenia dla człowieka. Zagrożenia polegające na możliwości zakażenia koronawirusami pochodzącymi od nietoperzy. Ale jest to oczywiście kwestia punktu widzenia.

Na stronie 25 , w części dotyczącej zakażeń hantawirusami, zdanie „Początkowo sądzono, że hantawirusy są wyłącznie przenoszone przez gryzonie, mimo że pierwszy hantawirus został wyizolowany u azjatyckiej ryjówki domowej, *Suncus murinus*” brzmi dziwnie – chodzi zapewne o to, że choć hantawirusy są przenoszone wyłącznie przez gryzonie, to pierwszy hantawirus został wyizolowany od ryjówki. Jednak zastosowany szyk zdania całkowicie zmienia jego sens.

Na stronie 26 w zdaniu „Występowanie hantawirusów, dla których udowodniono wcześniej potencjał zoonotyczny, w populacji nietoperzy w Niemczech, Austrii, Polsce oraz w Czechach nasuwa konieczność przeprowadzenia dogłębnych badań nad charakterystyką oraz patogenezą BRNV,...” Niewłaściwie użyty został termin „patogeneza”. Patogeneza jest to bowiem nauka o mechanizmie powstawania i rozwoju choroby który bada sposób działania czynników chorobotwórczych na powstawanie chorób, przenikanie do ustroju i szerzenie się czynników chorobotwórczych oraz reakcje organizmu na obecność i działanie tych czynników. Nie można zatem mówić o patogenezie wirusa! Błąd ten powtórzony jest trzykrotnie, również na stronie 27 jest mowa o „patogenezie wykrytych wirusów”. Na tej samej stronie znów pojawiają się nietoperze które są „...żywicielami, w tym rezerwuarami szeregu patogenów wirusowych...” i jest mowa o „...częstotliwości wystąpienia ewentualnego patogenu...” zamiast częstości. Samo zaś „Podsumowanie uzyskanych wyników i osiągnięć” zawiera bardzo ogólnikowe stwierdzenia, które nie wynikają z prezentowanych przez Autorkę wyników i mają zastosowanie do wielu chorób zakaźnych, a zdanie „Jednocześnie potwierdzono, iż stały nadzór nad występowaniem tych wirusów należy do jednego z najważniejszych środków do monitorowania ryzyka oraz transmisji tych czynników zakaźnych/chorób do zwierząt lądowych i człowieka, a także ich zapobiegania” brzmi kuriozalnie (szczególnie zaś podkreślenie). Zabrakło również wniosków jakie można wysnuć z prezentowanych przez Habilitantkę wyników, np. czy odsetek zwierząt zakażonych lub seropozytywnych uznać należy za wysoki i czy, statystycznie rzecz biorąc, stanowi to rzeczywiste zagrożenie dla człowieka. Ten aspekt mógłby być z powodzeniem rozwinięty, zwłaszcza, że Autorka badała wirusy przenoszące się w różny sposób i różniące się mechanizmami ich chorobotwórczości.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Na podstawie analizy przedłożonej mi do oceny dokumentacji w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego Dr n. wet., inż. Annie Orłowskiej stwierdzam, biorąc pod uwagę zamieszczoną wyżej ocenę osiągnięcia p.t.: „**WYSTĘPOWANIE WIRUSÓW ZOONOTYCZNYCH W POPULACJI NIETOPERZY W POLSCE**” oraz pozostałego dorobku naukowego stwierdzam, że Habilitantka spełnia wymagania stawiane osobom kandydującym do nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie weterynaria, określonych w Ustawie z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 16 marca 2021, poz. 478 – tekst jednolity Ustawy, art. 219 ust. 1 pkt 2 i Art. 221 ust. 8). Jako recenzent mam jednak obowiązek zwrócenia uwagi na błędy które pozwoliłem sobie przytoczyć na stronach 5 do 10. Błędy, których Habilitantka nie powinna była popełnić („żywiciel wirusa”, „patogeneza wirusów”, „częstotliwość występowania”, „sekwencje nukleotydowe” czy „izolaty” przy braku izolacji wirusa), tym bardziej że jest Ona nie tylko biotechnologiem, ale także doktorem nauk weterynaryjnych, ubiegającym się nadanie stopnia doktora habilitowanego tychże nauk, w dodatku wieloletnim pracownikiem Zakładu Wirusologii (sic!) PIW-PIB w Puławach.



