



KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

Wrocław 20.11.2024 r.

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

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz weterynarii, magister inżynier Karoliny Piekarskiej

“Charakterystyka molekularna szczepów polyomawirusa i cirkowirusa gęsiego
izolowanych od gęsi w Polsce”

wykonanej pod kierunkiem

dr hab. Wojciecha Kozdrunia

oraz

dr hab. Jowity Samanty Niczyporuk

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 17.10.2024 roku, zgodne z uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z 26.10.2018r., powołujące mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej lekarz weterynarii, magister inżynier Karoliny Piekarskiej.



KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

Chów i hodowla gęsi w Polsce charakteryzują się długą tradycją, której początki sięgają XVII wieku. Polska jest istotnym producentem i największym eksporterem gęsiny w Unii Europejskiej. Równocześnie Polska zajmuje trzecie miejsce, zaraz po Chinach i Egipcie, pod względem wielkości produkcji gęsiny na świecie. Według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii, w 2023r. ubito w Polsce 6,13 mln gęsi, w 2022 r – 5,67 mln, w 2021r -5,13 mln, w 2020 r – 6,77 mln a w 2019 r – 8,13 mln gęsi. Dane te świadczą o stabilnej produkcji gęsi tuczowych w naszym kraju.

Gęsina, w tym polska gęś owsiana to produkt od lat wysoce ceniony za granicą, a od niedawna również szeroko promowany w Polsce. Hasło „gęsina na świętego Marcina” jest już dobrze znane i przyczynia się do coraz częstszego spożywania wyrobów z mięsa gęsiego. Dzięki akcjom promującym gęsinę, m.in. przez resort rolnictwa, potrawy z tego gatunku drobiu znalazły się na „Liście produktów tradycyjnych”. Obecnie jest na niej 21 produktów i potraw mięsnych z gęsi (za KOWR).

Mięso gęsie charakteryzuje się najwyższą kalorycznością wśród mięs drobiowych oraz bardzo wysoką zawartością białka, jest także cennym źródłem witamin z grupy B oraz witamin A i E.

Tłuszcz gęsi zawiera nienasycone kwasy tłuszczowe: kwas oleinowy, kwas linolowy czy kwas linolenowy. Pożądanym produktem jest nie tylko mięso gęsie ale także pierze i puch, których jakość ocenia się na podstawie rozmiaru, długości włókien, wysadności oraz sprężystości.

W Polsce najbardziej popularna jest rodzima rasa - Gęś Biała Kołudzka®, która charakteryzuje się bardzo dobrymi cechami reprodukcyjnymi, wysoką zawartością mięsa w tuszce oraz dobrą jakością pierza. Gęsi Białe Kołudzkie® stanowią około 95 proc. wszystkich gęsi utrzymywanych w Polsce, a prace nad tą rasą prowadzone są w Instytucie Zootechniki, w zakładzie doświadczalnym w Kołudzie Wielkiej (woj. kujawsko-pomorskie) od lat 50-tych. Protoplastą gęsi Białej Kołudzkiej® była gęś biała włoska, jednak współczesną hodowlę gęsi w Polsce zapoczątkowało wytworzenie gęsi zatorskiej (1956), która w 1960 roku trafiła do Kołudy Wielkiej. W następnym roku dołączyła do niej gęś gorkowska, a rok później gęś biała włoska.

Ze względu na system utrzymania gęsi - konieczność dostępu do wybiegów, ten gatunek ptaków w porównaniu z innymi gatunkami drobiu jest narażony na liczne patogeny środowiskowe zarówno wirusowe i bakteryjne jak i pasożytnicze.



KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

Lekarz weterynarii, magister inżynier Karolina Piekarska podjęła bardzo potrzebne z lekarsko-weterynaryjnego i naukowego punktu widzenia badania, mające na celu ocenę sytuacji epizootycznej w kontekście występowania zakażeń wirusowych - poliomawirusem i cirkowirusem w stadach gęsi hodowanych w Polsce, wraz z opracowaniem metod diagnostycznych, w tym real-time PCR.

Manuskrypt ocenianej rozprawy ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich i liczy 248 stron wydruku komputerowego. „Wstęp” obejmujący 50 stron składa się z 3 części - danych dotyczących produkcji gęsi oraz 2 podrozdziałów - pierwszy zawiera informacje dotyczące poliomawirusów, a drugi - informacje dotyczące cirkowirusów. W każdym z podrozdziałów znajdują się informacje na temat m.in. klasyfikacji, struktury i budowy genomu, replikacji wirusów, wrażliwości gatunkowej, transmisji i patogenезы zakażeń, diagnostyki czy zapobiegania zakażeniom. Rozdział ten jest opracowany z dużą starannością i w przystępny dla czytelnika sposób przedstawia zarówno historyczną jak i najnowszą wiedzę na temat badanych przez Doktorantkę wirusów. Czytelnie przygotowane tabele bardzo dobrze obrazują dane które Doktorantka zamierzała przedstawić.

CEL PRACY

Prowadzone przez Doktorantkę badania wstępne dotyczące sytuacji epizootycznej w kontekście występowania zakażeń polioma- (GHPV) i cirkowirusem (GoCV) w stadach gęsi hodowanych w Polsce oraz metody identyfikacji i charakterystyka molekularna wirusów pozwoliły zebrać dane, by następnie przeprowadzić szeroko zakrojone badania.

Celem badań było:

1. Opracowanie metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz reakcji amplifikacji w czasie rzeczywistym (real-time PCR) służących do wykrywania i identyfikacji zakażeń GHPV i GoCV
2. Zastosowanie metod molekularnych do wykrywania materiału genetycznego oraz identyfikacji szczepów GHPV oraz GoCV w próbkach narządów wewnętrznych pozyskanych od gęsi w Polsce z podejrzeniem zakażenia poliomawirusem gęsim i cirkowirusem gęsim

KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

3. Izolacja i charakterystyka szczepów własnych GHPV i GoCV metodami wirusologicznymi z wykorzystaniem klasycznych metod wirusologicznych: izolacja wirusa w zarodkach gęsich, hodowli fibroblastów zarodka gęsiego (ang. goose embryo fibroblast – GEF) oraz hodowli komórek nerki zarodka gęsiego (ang. goose embryo kidney – GEK)
4. Identyfikacja szczepów GHPV i GoCV oraz ich charakterystyka molekularna względem sekwencji szczepów GHPV i GoCV izolowanych na świecie z pełnym uwzględnieniem analizy geograficznej
5. Ocena sytuacji epizootycznej w zakresie występowania zakażeń tymi wirusami w stadach gęsi hodowanych w Polsce.

Rozdział „Materiały i metody” obejmujący 16 stron maszynopisu, składa się z 6 podrozdziałów obejmujących opis materiału do badań oraz opis metod badawczych: wirusologicznych, PCR, real-time PCR, sekwencjonowanie i analizę sekwencji badanych wirusów.

Materiał do badań pochodził od ptaków ze 185 stad gęsi o różnym profilu produkcyjnym (gęsi stad reprodukcyjnych oraz gęsi przeznaczone na tucz), które zostały przesłane do badań diagnostycznych do Zakładu Chorób Drobii PIWet-PIB w Puławach z podejrzeniem choroby o etiologii wirusowej w latach 2007 - 2024. W trakcie sekcji, do badań laboratoryjnych pobrano wycinki narządów wewnętrznych: wątroba, serce, śledziona, płuca, nerki oraz jelita. W badaniach własnych wykorzystano 100 terenowych szczepów GHPV oraz 59 terenowych szczepów GoCV z kolekcji Zakładu Chorób Drobii PIWet-PIB w Puławach z lat 2007-2024, a szczepami wzorcowymi były szczep poliomawirusa 50/15 (GenBank Accession No: MG869737) oraz szczep cirkowirusa gęsiego (GoCV) oznaczony jako 39/14 (GenBank Accession No: MH138278).

Zdaniem recenzenta, ze względu na dużą liczbę prób, warto byłoby w zbiorczej tabeli rozpisać do jakich badań ile i jakich prób było wykorzystanych. Przykładowo do zakażenia zarodków użyto 10 izolatów poliomawirusa gęsiego, co jest zaznaczone w tabeli 6, a materiał do zakażenia hodowli nerki stanowiło sześć supernatantów pochodzących z homogenatów przygotowanych z narządów wewnętrznych pochodzących od gęsi naturalnie zakażonych szczepem poliomawirusa gęsiego.



Informacje są więc dostępne w różnej formie w treści rozprawy, natomiast umieszczenie ich w jednym miejscu wpłynęłoby na czytelność pracy.

Kolejnym elementem manuskryptu jest opis badań wirusologicznych wykonanych metodami klasycznymi, które obejmowały namnażanie poliomawirusa gęsiego w zarodkach gęsich, namnażanie szczepów poliomawirusa gęsiego w przygotowanych wcześniej hodowlach fibroblastów zarodka gęsiego oraz hodowlach komórek nerki zarodka gęsiego. Doktorantka izolowała całkowite komórkowe DNA (podrozdział 3.2.4) z różnego materiału: z hodowli komórkowych (6 pasaż), niezakażonych hodowli komórkowych, płynów i błon zarodka, narządów wewnętrznych pochodzących od zakażonych zarodków oraz od zarodków stanowiących kontrolę ujemną, a także z homogenatów narządów wewnętrznych chorych gęsi. W mojej opinii warto byłoby podzielić na grupy materiał i opisać w oddzielnych podrozdziałach, gdyż w opisywanych wynikach nie ma odniesienia do tego podrozdziału. Recenzent spodziewałby się wyników w podrozdziale 4.2.4, natomiast w rozdziałach 4.2.4 i 4.2.5 znajduje informacje o izolacji szczepów GHPV w hodowli komórek fibroblastów i nerki (dane dotyczące prób pochodzących od chorych stad są umieszczone w rozdziale 4.1.2). Uwaga ta jest wyłącznie uwagą porządkową, gdyż przy tak dużej objętości pracy wynikającej z szerokiego zakresu badań i dużej ilości wyników, mogą zdarzyć się niedociągnięcia związane z podziałem manuskryptu. Kolejną częścią jest opis metod molekularnych PCR i rt-PCR do wykrywania szczepów poliomawirusa i cirkowirusa szczegółowo opisująca warunki reakcji, użyte startery oraz określenie czułości i specyficzności metod. Ostatnim elementem badań było sekwencjonowanie uzyskanych w reakcji PCR produktów oraz analiza uzyskanych sekwencji w programie MEGA 7.1.

Rozdział „Wyniki” obejmuje 136 stron i podzielony jest na dwie części - część dotyczącą badań nad poliomawirusami i część dotyczącą badań nad cirkowirusami. Część pierwsza składa się z 3 podrozdziałów opisujących: wykrywanie zakażeń w narządach gęsi, charakterystykę izolatów metodami klasycznymi (z użyciem zarodków gęsi i linii komórkowych) i charakterystykę molekularną izolatów. Część druga rozdziału składa się z 2 podrozdziałów - wykrywanie zakażeń cirkowirusem w narządach gęsi oraz charakterystyka molekularna terenowych szczepów GoCV.



bardzo dobrym zabiegiem były podziały drzew genetycznych, poprawiające czytelność rycin. Dodatkowo próby w klasycznym PCR wykorzystano następnie do badań rt-PCR uzyskując pozytywne rezultaty.

Zakażenia cirkowirusowe potwierdzono w 22,3 % stad (amplifikacja fragmentu ORFC1). PCR ze starterami dla białka Rep pozwolił na wykrycie zakażenia tylko w 8,1% stad, stąd wniosek iż do diagnostyki zakażeń należy amplifikować wspomniany fragment ORFC1. Na podstawie uzyskanych sekwencji białka ORFC1 wykorzystując metodę NJ analizowane szczepy utworzyły na drzewie filogenetycznym 5 grup, a podobieństwo nukleotydowe między szczepami polskimi i światowymi mieściło się w granicach 58,5 – 100%. Homologia nukleotydów genu białka Rep wszystkich polskich szczepów do szczepu referencyjnego (GenBank Accession No.:OK070810) wynosiła 95,29 – 99,22%.

Recenzent przypomina, iż zgodnie z zasadą otwartej nauki, należy zdeponować uzyskane sekwencje polioma- i cirkowirusów w którejś z ogólnosiwiatowych baz danych (np. GenBank, NCBI), by mogły być wykorzystane do porównań filogenetycznych przez innych naukowców.

Rozdział “Dyskusja i omówienie wyników” mieści się na 19 stronach maszynopisu. Doktorantka odnosi się w nim do danych zawartych w dostępnym piśmiennictwie, wskazując na rolę badań własnych takich jak zaprojektowanie własnych sekwencji starterów komplementarnych do innego fragmentu genu VP1, co pozwala na wstępną identyfikację szczepów GHPV. Doktorantka stwierdza również brak użyteczności hodowli nerki gęsiej do pozyskania oraz zbankowania żywych cząstek wirusowych GHPV. Przeprowadzona sprawnie dyskusja świadczy o znajomości literatury z omawianego tematu i właściwe porównanie danych literaturowych z uzyskanymi wynikami.

Doktorantka podsumowuje efekty badań w rozdziale „Wnioski” wykazując że:

1. Opracowano testy PCR, które mogą być stosowane do wykrywania i potwierdzania zakażeń GHPV oraz GoCV, jak również do ich identyfikacji. Testy te charakteryzują się wysoką czułością, specyficznością oraz krótkim czasem ich wykonania.



KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

Reakcją PCR wykrywającego fragment genu białka VP1, potwierdzono obecność poliomawirusa w 54% badanych stad gęsi. W przypadku całego białka VP1 obecność produktów reakcji o wielkości 1232 par zasad stwierdzono w 71 spośród badanych stad, co stanowiło 38,4%.

Badania wirusologiczne z użyciem szczepów poliomawirusów wykazały, że zakażone do woreczka żółtkowego wybranymi izolatami zarodki gęsie, wykazywały różnego stopnia zmiany w wątrobie, nerkach, mózgu oraz wybroczyny na ciele. Na podstawie oceny kolejnych pasażów, Doktorantka stwierdziła predylekcję wirusa do narządów mięsnych. W przypadku zarodków zakażonych do jamy owodniowo-omoczniowej charakterystyczne były zmiany makroskopowe wątroby, przekrwienie nerek, obrzęk jelit oraz przekrwienie opon mózgowych.

W momencie przygotowania publikacji do druku w tabelach 7, 8 i 9 oraz 13, 14 i 15 które opisują występowanie zmian anatomopatologicznych u zarodków zakażonych, recenzent sugerowałby umieszczenie dokładniejszego opisu zmian sekcyjnych zarodków, gdyż mają one być samodzielnymi i czytelnymi elementami publikacji. Opisy zmian są umieszczone w tekście ocenianej rozprawy, stąd uwaga jest wyłącznie dobrą radą recenzenta dotyczącą przyszłej publikacji.

Badania genetyczne potwierdziły obecność materiału genetycznego wirusa w jelitach i nerkach wszystkich badanych zarodków niezależnie od drogi podania wirusa. Nie obserwowano obecności efektu cytopatycznego w żadnym pasażu wybranych szczepów na fibroblastach, natomiast obserwowano zmiany w jednolitej warstwie komórek nerki, gdzie zaobserwowano granulację cytoplazmy oraz drobne, zaokrąglone komórki silnie załamujące światło, przypominające pęcherzyki. Miano infekcyjne wybranych szczepów wahało się w zakresie od 10^3 TCID₅₀/0,1ml do 10^6 TCID₅₀/0,1ml, a miano szczepu wzorcowego 50/15N wynosi 10^5 TCID₅₀/0,1 ml.

Zsekwencjonowane fragmenty białek VP1 obrazują zróżnicowanie genetyczne szczepów poliomawirusa izolowanego od gęsi w Polsce. Pomiędzy badanymi sekwencjami szczepów GHPV, a sekwencjami pochodzącymi z bazy danych GenBank (NCBI) wykazano podobieństwo nukleotydowe na poziomie 98,25-100%. Ze względu na dużą liczbę analizowanych szczepów,



KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

2. Wykazano dość powszechne zakażenia poliomawirusem gęsim (GHPV) oraz cirkowirusem gęsim (GoCV) u gęsi hodowanych w Polsce.
3. Badania filogenetyczne krajowych szczepów GoCV wykazały dużą zmienność genetyczną wyrażoną w licznych mutacjach punktowych, a omawiane sekwencje szczepów charakteryzowały się znaczną heterogennością na poziomie łańcucha aminokwasowego.
4. Badania filogenetyczne krajowych szczepów GHPV oraz szczepów krążących na świecie pochodzących od gęsi hodowanych w Polsce, wykazały stosunkowo niską zmienność na poziomie nukleotydowym oraz aminokwasowym, jak również dużą homologię badanych szczepów.
5. Szczepy GHPV pochodzące od gęsi hodowanych w Polsce mogą się namnażać w hodowli komórek nerki zarodka gęsiego (GEK) wywołując efekt cytopatyczny (CPE), jak również w zarodkach gęsich powodując zmiany anatomopatologiczne gęsich embrionów.
6. Wykonane badania własne stanowią istotny wkład w literaturę polską i światową w zakresie dostępności unikalnych sekwencji szczepów GoCV i GHPV.

W mojej opinii wniosek 6 powinien zostać zlikwidowany, a informacje o unikalnych sekwencjach polioma- i cirkowirusów dołączone odpowiednio do punktów 3 i 4 wraz z uwzględnieniem numerów sekwencji w bazie. Dobrze aby punkty w rozdziale Wnioski były ułożone w tej samej kolejności co punkty w rozdziale dotyczącym celu badań, by jasno uwidocznienie uzyskanie zamierzonych efektów.

Kolejne rozdziały (7 i 8) obejmują streszczenie pracy w języku polskim i angielskim.

Spis piśmiennictwa (rozdział 9) jest szeroki, prawidłowo dobrany i uwzględnia 141 pozycji literaturowych w kolejności alfabetycznej. Ostatnie 2 rozdziały (10 i 11) zawierają spis tabel i spis rycin zamieszczonych w manuskrypcie.

W mojej opinii oceniana rozprawa stanowi wartościowe opracowanie naukowe, a zastosowane metody badawcze są zróżnicowane i dostarczają wielu cennych informacji dotyczących zakażeń polioma- i cirkowirusami u gęsi z uwzględnieniem charakterystyki izolatów.



Dysertacja potwierdza biegłość Doktorantki w wielu obszarach diagnostyki chorób drobiu oraz bogaty warsztat badawczy – zarówno metod klasycznych jak i molekularnych. Praca bez wątplenia poszerza wiedzę na temat występowania i diagnostyki polioma- i cirkowirusów, a także struktury genetycznej i aminokwasowej izolatów, odpowiadając wymogom naukowym i formalnym stawianym rozprawom doktorskim.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę na następujące niedociągnięcia:

str 14 .we Wstępie pomiędzy zdaniem

“Gęsi należące do odmian północnych cechuje lepsza nieśność (23-39 jaj w sezonie) oraz większa masa ciała (3,7 – 4,4 kg) w porównaniu z gęsiami odmian południowych, gdzie cechy te zawierają się odpowiednio między 14 a 26 jaj i 3,4 a 3,8 kg”

a

“Spośród czynników wirusowych zagrażających wielkostadnej produkcji drobiu wodnego bardzo ważną rolę epizootyczną odgrywają polyomawirusy należące do rodzaju Polyomavirus z rodziny Polyomaviridae ”

brakuje zdań które spajały by obie części wypowiedzi. W tym miejscu warto byłoby wspomnieć o systemie utrzymania gęsi, w którym zwierzęta mają kontakt ze środowiskiem zewnętrznym, przez co są bardziej narażone na zakażenia m.in. od dzikich ptaków oraz środowiska którego nie można skutecznie zdezynfekować. Krótki opis warunków utrzymania mógłby być zręcznym przejściem do opisanych chorób wirusowych.

Str. 19: w opisie tabeli 1 należałoby zaznaczyć że to przegląd poliowirusów ptasich

Str. 25: niewłaściwa składnia zdania “Udokumentowano, że zachowuje pełną wirulentność po 2 h inkubacji w temp. 55°C, proces wielokrotnego zamrażania i rozmrażania oraz na rozpuszczalniki tłuszczowe”.

str. 25: należy używać polskiego nazewnictwa jeśli jest taka możliwość - komórki endothelialne to komórki śródbłónka

str. 26: rasa kaczki - Pekin powinna być pisana wielką literą

str.27: sugeruję użycie sformułowania „transmisja pionowa” zamiast „transmisja wertykalna”



KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

str. 27: „zarodki gęsie zakażone do żółtka (yolk sac)” powinno być do woreczka żółtkowego

str. 36: „nie ma komercyjnej szczepionki przeciwko HNEG”. Należałoby sprecyzować wypowiedź – nie ma zarejestrowanej w Unii Europejskiej szczepionki przeciwko HNEG, natomiast w Europie są produkowane autoszczepionki przeciwko tej jednostce chorobowej (producent Prophyl Ltd., Węgry)

str. 52: “Częstotliwość występowania zakażeń” powinno być “częstość występowania zakażeń”, gdyż częstotliwość jest pojęciem fizycznym używanym do opisywania występowania zjawiska zawsze po upływie takiego samego czasu (cyklicznie)

str. 79-81: proponuję zmianę w opisie tabeli „worka żółtkowego” na „woreczka żółtkowego”

str. 209: powtórzenie “namnożenia wybranych sześciu wybranych szczepów GHPV”

Pojawiły się także błędy literowe powstałe w trakcie maszynowego pisania (literówki) typu podwójne kropki/ brak kropek, dodatkowe spacje lub brak spacji (np. na stronach 5, 6, 8, 27) czy niewłaściwa odmiana (np. str. 9 - powinno być mikromol zamiast mikromola)

Podsumowując, mimo wymienionych niedociągnięć tekstu, Doktorantka uzyskała wiele wartościowych wyników, które należy opracować pod kątem przyszłych publikacji uwzględniając życzliwe uwagi recenzenta.

Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) dlatego przedkładam wniosek o dopuszczenie Pani Karoliny Piekarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Andrzej Gawęł