



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej lek. wet. Kamili Natalii Dziadek

p.t.: „Zmienność genetyczna wirusa grypy ptaków u różnych gatunków drobiu”

Przygotowanej pod kierunkiem Promotora dr hab. Krzysztofa Śmietanki, profesora instytutu

w Zakładzie Wirusologii i Chorób Wirusowych Zwierząt

Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego

z udziałem Promotora pomocniczego dr Edyty Świętoń z Działu Naukowego Wsparcia

Potencjału Badawczego

Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego

Wirusy grypy ptaków (AIV; avian influenza virus) stanowią istotne zagrożenie zarówno dla przemysłu drobiarskiego, jak i systemów zdrowia publicznego. W Polsce pierwsze potwierdzenie obecności wirusa grypy u ptaków odnotowano w 1995 roku (podtyp H7N7 u indyków). W kolejnych latach obserwowano serologiczne dowody kontaktu drobiu z wirusami grypy, gdzie przełomowym momentem było pojawienie się wysoko zjadliwego wirusa H5N1 w latach 2006–2007, który po raz pierwszy wywołał ogniska zarówno u ptaków dzikich, jak i hodowlanych. Po okresie względnego spokoju, w 2013 roku odnotowano istotną epizootię nisko zjadliwego wirusa H9N2, a od 2016 roku dominują w Europie, w tym także i w Polsce, wirusy z grupy H5Nx (szczególnie H5N8, w następnej kolejności H5N1). Epizootcja z lat 2020–2021 była najpoważniejsza w historii naszego kraju i zapoczątkowała zjawisko zaniku sezonowości zakażeń, co doprowadziło do endemicznego występowania wirusa.

Zjadliwość oraz zdolności adaptacyjne AIV są ściśle związane z jego zmiennością genetyczną. Kluczową rolę odgrywa tu białko hemaglutyniny (HA), którego struktura decyduje o patogenności wirusa (LPAI oraz HPAI). Mutacje w tym regionie mogą prowadzić do przejścia formy nisko zjadliwej w wysoko zjadliwą. Istotne znaczenie ma także



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

powinowactwo hemaglutyniny do receptorów komórkowych typu ptasiego (SA α 2,3Gal) lub ludzkiego (SA α 2,6Gal), co warunkuje możliwość zakażenia nowych gospodarzy, w tym ludzi. Dodatkowo procesy takie jak glikozylacja hemaglutyniny wpływają na unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Drugim ważnym elementem jest neuraminidaza (NA), której zmiany mogą zwiększać adaptację wirusa do drobiu oraz wpływać na jego zakaźność. Neuraminidaza stanowi również istotny cel działania leków przeciwwirusowych, choć obserwuje się narastającą oporność wirusów grypy na tę grupę preparatów. Kluczowe znaczenie dla replikacji wirusa ma kompleks polimerazy (PB2, PB1, PA). Mutacje takie jak PB2-E627K czy PB2-D701N zwiększają zdolność wirusa do namnażania się w komórkach ssaków, co ma istotne znaczenie w kontekście potencjału zoonotycznego. Dodatkowe białka wirusowe (np. NS1, PB1-F2) mogą modulować odpowiedź immunologiczną gospodarza i wpływać na wirulencję.

Zakażenia drobiu mogą następować zarówno poprzez bezpośredni kontakt z dzikim ptactwem wodnym (naturalnym rezerwuarem wirusa), jak i pośrednio – poprzez skażone środowisko lub działalność człowieka. Zakażenia wirusami LPAI często przebiegają bezobjawowo, jednak podtypy H5 i H7 niosą ryzyko mutacji do form wysoko zjadliwych. Ogniska HPAI charakteryzują się wysoką śmiertelnością, objawami ogólnoustrojowymi oraz znacznymi stratami ekonomicznymi. AIV stanowi również zagrożenie dla ssaków, w tym ludzi. W latach 2003–2025 odnotowano globalnie 985 przypadków zakażeń H5N1 u ludzi, z zauważalnie wysoką śmiertelnością. W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby zakażeń u innych ssaków (np. kotów, bydła, ale także i psów), co wskazuje na postępującą adaptację wirusów grypy do nowych gospodarzy i podkreśla znaczenie idei „One Health”.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy 192 strony, w tradycyjnym układzie dla prac tego typu, z klasycznym podziałem na wstęp, cele badawcze i hipotezy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz bibliografię liczącą 188 pozycji. Prócz tego na początku pracy zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz artykułów (artykułu) naukowego wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej, spis treści oraz wykaz stosowanych skrótów.



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

Hipotezy badawcze i cele pracy zostały sformułowane jasno i klarownie; ponadto opatrzone je wstępem, liczącym 16 stron, który znacząco ułatwia zrozumienie przestaniek podjęcia tej właśnie tematyki przez Doktorantkę. Same badania obejmowały dwie części: analizę molekularno-filogenetyczną wirusów grypy ptaków krążących w Polsce w latach 2018–2022 oraz eksperymentalne badania patogenności i zmienności genetycznej wirusa LPAIV H7N7 u różnych gatunków drobiu. W pierwszym etapie przeanalizowano 52 izolaty AIV (10 LPAI i 42 HPAI H5Nx) pochodzące z krajowego monitoringu. Wykorzystano próbki od dzikich ptaków i drobiu, a wykrywanie wirusa przeprowadzono metodą RT-PCR. Następnie zastosowano sekwencjonowanie NGS, co pozwoliło na uzyskanie pełnych genomów wirusów. Analiza bioinformatyczna i filogenetyczna umożliwiła ocenę pokrewieństwa szczepów, identyfikację reasortacji oraz powiązań epidemiologicznych, a także wykrycie markerów związanych z patogennością i adaptacją. W drugim etapie przeprowadzono doświadczenia na kurach, przepiórkach, indykach i kaczkach zakażonych eksperymentalnie wirusem LPAIV H7N7 pochodzenia dzikiego. Monitorowano przebieg zakażenia przez 7 dni, oceniając siewstwo wirusa metodą RT-PCR oraz określając cechy zakażenia (okres utajenia, czas trwania i poziom wydalania wirusa). Analizy statystyczne wykonano testami nieparametrycznymi.

Dodatkowo Doktorantka zastosowała głębokie sekwencjonowanie próbek o wysokiej zawartości RNA wirusa w celu analizy różnorodności genetycznej. Oceniano strukturę populacji wirusa (quasi-gatunki), liczbę i częstość wariantów, entropię Shannona oraz udział mutacji synonimicznych i niesynonimicznych, a także warianty *de novo* i te pochodzące z inokulum.

Całość badań lek. wet. Kamili Dziadek umożliwiła kompleksową charakterystykę wirusów grypy ptaków w warunkach naturalnych i eksperymentalnych oraz ocenę mechanizmów jego ewolucji i adaptacji do różnych gospodarzy. Pozwoliło to na kompleksową ocenę zmienności genetycznej wirusów grypy ptaków zarówno w środowisku naturalnym, jak i w warunkach eksperymentalnych, ze szczególnym uwzględnieniem procesów ewolucyjnych oraz potencjalnych mechanizmów adaptacji wirusa do nowych gospodarzy.



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chalubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

Badania Doktorantki wykazały, że wysoka zmienność genetyczna wirusów HPAIV H5Nx w latach 2020–2022 wynikała z działania wielu mechanizmów ewolucyjnych, w tym dryfu genetycznego, reasortacji segmentów genomu oraz wielokrotnych introdukcji wirusa do Polski z różnych regionów świata. Potwierdzono dynamiczny, globalny charakter rozprzestrzeniania się AIV oraz obecność mutacji o potencjalnym znaczeniu zoonotycznym, co podkreśla konieczność stałego monitoringu wirusa, obejmującego zarówno HPAIV, jak i LPAIV oraz analizę genomową markerów funkcjonalnych.

W części eksperymentalnej Doktorantka wykazała, że wirus LPAIV H7N7 skutecznie zakaża różne gatunki drobiu, jednak infekcja ma zwykle przebieg bezobjawowy i krótkotrwały. Stwierdziła także wyraźne różnice w tropizmie: u drobiu grzebiącego dominowała replikacja w układzie oddechowym, a u ptactwa wodnego w układzie pokarmowym, co przekłada się na odmienne drogi transmisji (kropelkową i fekalno-oralną). Zakażenie prowadziło do powstania złożonej populacji wirusa (quasi-gatunków), zdominowanej przez warianty mniejszościowe, co wskazuje na wczesną fazę adaptacji wirusa do gospodarza. Choć pojawiały się nowe warianty o potencjalnym znaczeniu biologicznym (np. MP-G950A), nie ulegały one utrwaleniu w populacji dominującej. Autorka nie wykazała istotnych różnic międzygatunkowych w ogólnej różnorodności genetycznej wirusów grypy, choć obserwowano pewne różnice wewnątrzgatunkowe, szczególnie u kaczek. Wyniki te sugerują silny wpływ poziomu replikacji wirusa na ocenę jego zmienności (ujemna korelacja z entropią Shannona), co może prowadzić do częściowego zaniżania obserwowanej różnorodności. Całość wyników Doktorantki potwierdza wysoką dynamikę ewolucyjną AIV oraz jego zdolność do adaptacji, istotną z punktu widzenia epizootologii i zdrowia publicznego.

Kluczowe mechanizmy zmienności wirusów grypy ptaków stanowią dryf genetyczny oraz reasortacja, umożliwiające szybkie powstawanie nowych wariantów. Introdukcja wirusa do stad drobiu zwiększa jego potencjał adaptacyjny i epidemiologiczny. W sezonie 2020/2021 w Polsce dominował jednorodny genotyp H5N8 (A), a poziom reasortacji był umiarkowany. W latach 2021/2022 nastąpił wyraźny wzrost różnorodności genetycznej, z dominacją H5N1 i wieloma nowymi genotypami, co wskazuje na rozwój endemii HPAIV w



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5
02-004 Warszawa
tel.: (0-22) 622 00 28
fax: (0-22) 628 27 39

Europie. Większość wariantów wirusów miała pochodzenie regionalne, jednak potwierdzono także introdukcje spoza Europy. Wyniki te potwierdzają dynamiczny, transkontynentalny charakter ewolucji wirusów grypy ptaków oraz znaczenie stałego monitoringu genetycznego. Analiza wirusów HPAI H5Nx z Polski (2020–2022) pokazuje, że segmenty HA i MP były najbardziej stabilne, a także często NA, co sugeruje ich wspólną koadaptację zwiększającą przewagę H5N1 (np. transmisję). Reasortacja z wirusami LPAI była możliwa, ale trudna do uchwycenia przez braki w danych. Wykazano natomiast liczne przykłady dryfu genetycznego, zwłaszcza przy dużych ogniskach i wysokiej zakaźności wirusa wśród ptaków. Mimo wielu mutacji związanych z adaptacją i potencjałem zoonotycznym, w Polsce nie potwierdzono zakażeń LPAI u ssaków (prawdopodobnie przez brak ścisłego monitoringu). Jednocześnie podobne zmiany były powszechne w Europie. Wirusy LPAI były bardzo zróżnicowane, ale słabo poznane genetycznie. Co ważne, część mutacji (np. wpływających na potencjalną oporność na leki przeciwwirusowe) występowała także u nich, co podkreśla ich znaczenie epidemiologiczne. Eksperymenty na drobiu potwierdziły, że zakażenie LPAI (H7N7) ma głównie bezobjawowy przebieg, a jego dynamika zależy od gatunku i adaptacji wirusa. Stwierdzono także, iż przepiórki, kaczki, kury i indyki różnią się podatnością na zakażenie wirusem grypy ptaków oraz sposobem jego wydalania i replikacji. Przepiórki wykazują bardzo wysokie wydalanie wirusa, głównie z układu oddechowego, często bez objawów choroby, co czyni je potencjalnymi „gospodarzami pośrednimi” sprzyjającymi transmisji i powstawaniu nowych wariantów wirusa. U drobiu grzebiącego (kury, indyki, przepiórki) wirus namnaża się przede wszystkim w układzie oddechowym, natomiast u kaczek w układzie pokarmowym, co wiąże się z rozmieszczeniem receptorów komórkowych. Kaczki charakteryzują się dłuższym i silniejszym siewstwem wirusa z przewodu pokarmowego oraz dominacją transmisji fekalno-oralnej. Różnice w drodze zakażenia wpływają na tempo replikacji wirusa w różnych układach. Analiza różnorodności genetycznej wykazała brak jednoznacznych, uniwersalnych trendów, choć przepiórki często wykazywały większą zmienność wirusa.

Ogólnie obserwuje się ujemną korelację między poziomem replikacji wirusa a jego różnorodnością genetyczną, szczególnie wyraźną u przepiórek. Poziom replikacji wirusa



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

grypy ptaków (LPAIV) silnie wpływa na jego różnorodność genetyczną, szczególnie u przepiórek, gdzie wysoka replikacja wiąże się z większą liczbą wariantów i złożonością populacji wirusa. Wskazuje to, że obserwowane wzrosty różnorodności w późnych etapach zakażenia (np. 7 dpi) mogą być artefaktem wynikającym z niskiego poziomu siewstwa. Podobna, choć słabsza zależność występuje u indyków, natomiast u kur i kaczek różnorodność wirusa zależy także od innych, niebadanych czynników. U kaczek różnorodność wirusa w układzie oddechowym nie wykazuje istotnej korelacji z poziomem replikacji, co sugeruje wpływ odmiennych warunków selekcyjnych w różnych układach (oddechowym i pokarmowym). Porównania międzygatunkowe nie wykazały istotnych różnic w liczbie wariantów ani złożoności populacji, co oznacza brak jednoznacznych trendów w różnorodności genetycznej H7N7 LPAIV między gatunkami drobiu. W analizie wariantów stwierdzono wysoką częstość mutacji niesynonimicznych oraz oznaki pozytywnej selekcji, szczególnie w genach HA, NA i MP, co wskazuje na adaptację wirusa do gospodarza. Zidentyfikowano także warianty *de novo*, w tym MP-G950A (M2: D88N), obecny u wszystkich badanych gatunków, który może mieć znaczenie funkcjonalne i adaptacyjne. Większość mutacji o potencjalnym znaczeniu biologicznym ulegała jednak szybkiemu wygaszaniu, co sugeruje dominację dryfu genetycznego i efektów losowych nad trwałą selekcją. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki omówione w „Dyskusji” nie potwierdzają hipotez o wyraźnych międzygatunkowych różnicach w różnorodności wirusa, choć wskazują na złożone, dynamiczne procesy ewolucyjne zachodzące podczas zakażenia drobiu.

W mojej opinii rozprawa doktorska lek. wet. Kamili Dziadek została przygotowana z wielką starannością, uzyskane wyniki są precyzyjnie udokumentowane, zaś wyciągniętych 6 wniosków jest logicznych i w pełni wynikających z treści pracy. Wszystko to składa się na łatwość odbioru zawartych w rozprawie Doktorantki informacji.

Z całym przekonaniem stwierdzam więc, iż w mojej opinii rozprawa doktorska lek. wet. Kamili Dziadek stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a co za tym idzie, spełnia wymogi Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. 2003 nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

Instytutu Badawczego o dopuszczenie lek. wet. Kamili Dziadek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

T. Dzieciatkowski
dr hab. n. med. Tomasz Dzieciatkowski