

Wrocław 29.07.2024 r.

Prof. dr hab. Paweł Chorbiński  
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

### Recenzja

#### **rozprawy doktorskiej mgr inż. Dagmary Zdańskiej p.t. „Identyfikacja zakażeń wirusowych u matek pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w Polsce”**

wykonanej w Zakładzie Chorób Pszczół Państwowego Instytutu Weterynaryjnego –  
Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

pod kierunkiem Pana Profesora Artura Rzeżutki oraz Pani dr hab. Krystyny  
Pohoreckiej jako promotora pomocniczego

Podstawę formalną wykonania opinii niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi pismo Pana Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach powołujące się na Uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 12.07.2023 roku.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana jako monografia i składa się z 10 rozdziałów. Pierwszy z nich to Wstęp obejmujący 6 podrozdziałów, poświęconych rysowi historycznemu, prevalencji występowania zakażeń wirusowych u pszczoły miodnej na terenie Europy, budowie i organizacji genomu wybranych wirusów pszczelich, metodach ich transmisji oraz patogenieze wywoływanych przez nie zakażeń oraz metodach diagnostycznych służących do ich wykrywania. Kolejne rozdziały pracy to: Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Piśmiennictwo oraz Załączniki. Rozdział „Wstęp” poprzedza obszerny wykaz skrótów używanych w pracy. Rozprawa została bardzo starannie przygotowana pod względem edycyjnym, wydrukowana czytelnym drukiem i estetycznie oprawiona.

Łącznie rozprawa doktorska liczy 116 stron, zawiera 20 tabel, 25 rycin oraz 263 pozycje literaturowe oraz 6 załączników.

Temat ocenianej pracy doktorskiej uważam za aktualny i istotny nie tylko dla wąskiej dziedziny apipatologii ale również dla szeroko rozumianego pszczelarstwa. Występowanie w rodzinach pszczoły zakażeń wirusowych staje się coraz powszechniejsze i wielu krajach prewalencja zakażeń niektórymi wirusami osiąga poziom nawet 100%. Stanowią przez to coraz poważniejszy problem nie tylko zdrowotny ale także ekonomiczny. Wybranie modelu badawczego jakim są matki pszczele jest szczególnie ważny, gdyż zakażenia te mogą być przenoszone na jej potomstwo zarówno drogami pionowymi jak i poziomymi. W naszym kraju co roku do pszczelarzy trafia ponad sto tysięcy młodych matek pszczelich pochodzących z komercyjnych hodowli i połowa z nich jest poddawana zabiegom sztucznego unasienia u producenta. Łatwość przemieszczania takich matek w przesyłkach, umożliwia przenoszenia tych patogenów na duże odległości. Nie posiadamy jednak wiedzy o prewalencji zakażeń wirusami w populacji matek w zależności od regionu naszego kraju, jak również współzależności ich występowania ze sobą oraz w powiązaniu z wiekiem matek jak i innymi powszechnie występującymi, groźnymi patogenami pszczół.

Recenzowana praca posiada układ typowy dla tego typu opracowań. Wstęp został napisany zwięźle, bez wdawania się w niepotrzebne szczegóły, a równocześnie znalazły się w nim wszystkie podstawowe informacje potrzebne do wprowadzenia czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem dysertacji. Podano w nim krótkie informacje dotyczące rozwoju wiedzy o występowaniu wirusów w rodzinach pszczelich. Więcej miejsca Autorka poświęciła opisowi częstotliwości występowania zakażeń wirusowych u pszczoły miodnej na terenie Europy, skupiając się najczęściej występujących przedstawicielach rodziny *Districtoviridae* i *Iflaviridae* oraz niesklasyfikowanym dotychczas wirusie chronicznego paraliżu pszczół (CBPV). Uwypukliła również znaczenie mieszanych zakażeń wirusowych. Kolejne punkty Wstępu zostały poświęcone dostępnej wiedzy dotyczącej budowy i struktury genomu tych wirusów, mechanizmowi ich replikacji w komórkach gospodarza oraz ich przenoszenia w obrębie rodziny pszczelej, a także patogenezie zakażeń wirusowych z podziałem na stadia rozwojowe pszczoły oraz istotnym wpływie jednoczesnej inwazji *Varroa destructor* czy infekcji *Vairimorpha sp.*

Ostatni punkt Wstępu został poświęcony metodom wykrywania zakażeń wirusowych w materiale pszczelim w ujęciu historycznym jak i obejmującym najnowsze techniki diagnostyczne oparte na metodach biologii molekularnej.

Podane we wstępie informacje są właściwie usystematyzowane i stanowią logiczne uzasadnienie podjęcia badań własnych.

Przegląd piśmiennictwa oraz jego zestawienie świadczy o dobrej znajomości przez Autorkę problematyki, zaprezentowanej w jej dysertacji doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w spisie piśmiennictwa, zawierającym 263 pozycji, aż 250 prac dotyczy publikacji obcojęzycznych, zamieszczonych przeważnie w renomowanych czasopismach anglojęzycznych. W ogromnej większości są to oryginalne prace twórcze z ostatnich lat. Nieliczne, starsze pozycje są istotne dla poruszanych zagadnień i ich cytowanie jest w pełni uzasadnione.

Wykaz uwag redakcyjnych niemających wpływu na wartość pracy a związanych głównie z cytowaniem przekazano do wiadomości Doktorantce.

W rozdziale Cel pracy Autorka wyznaczyła sobie trzy zasadnicze cele badawcze:

1. Opracowanie i walidacja testów mRT-PCR zawierających kontrolę wewnętrzną amplifikacji do wykrywania districtowirusów, iflawirusów pszczół i CBPV.
2. Ocena występowania zakażeń wirusowych u matek pszczelich pochodzących z krajowych pasiek produkcyjnych przy użyciu opracowanych testów Ifla-CPV i Disrticto mRT-PCR.
3. Ocena wpływu wybranych czynników biotycznych i abiotycznych na występowanie zakażeń wirusowych u matek pszczelich.

Cele pracy doktorskiej sformułowane zostały jasno i logicznie.

W rozdziale „Materiały metody” Autorka wyszczególniła wykorzystany materiał badawczy, który stanowiły: (a) homogenaty pszczół robotnic zawierające wirusy BQCV, ABPV, DWV i SBV, homogenaty pozbawione czynników zakaźnych oraz posiadające materiał genetyczny SBV i BQCV o niskim i wysokim poziomie koncentracji; (b) matki pszczele w liczbie 239 sztuk pozyskane w latach 2017-2022 ze 136 pasiek z terenu całego kraju, z rozbiciem na poszczególne jego regiony. Znając realia współpracy z sektorem pszczelarskim chciałbym w tym miejscu pogratulować Autorce sukcesu w gromadzeniu tak licznych materiałów badawczego.

Ponadto Doktorantka wykorzystwała w badaniach materiał genetyczny krajowych szczepów districtowirusów, iflawirusów i CBPV pochodzący z zasobów Zakładu Chorób Pszczół PIWet-PIB. Pozwolił on na projektowanie lub modyfikację sekwencji starterów w wykorzystywanych w opracowywanych testach a także na optymalizację i ocenę odporności oraz specyficzności tych testów. Również dla potrzeb kontroli projektowanych testów wykorzystano materiał genetyczny pochodzący od siedmiu gatunków bakterii.

Następnie Autorka opisała wykorzystane metody izolacji kwasów nukleinowych z pozyskanych próbek matek pszczelich, warunki amplifikacji materiału genetycznego, wizualizacji otrzymanego produktu i jego sekwencjonowania. Bardzo obszernie przedstawiła metodykę służącą do opracowania testów Ifla-CBPV i Districto mRT-PCR, od wyboru starterów, optymalizacji warunków reakcji molekularnych, kontroli wewnętrznej amplifikacji, oceny wydajności, czystości i odporności testów. W kolejnym punkcie tego rozdziału przedstawiła rezultaty związane z walidacją przygotowanych testów. Gotowe testy wykorzystwała do oceny zebranego materiału matecznego a uzyskane rezultaty poddała stosownej analizie statystycznej.

Przyjęte przez Doktorantkę metody i zaprojektowane przez Nią testy Ifla-CBPV i Districto mRT-PCR są adekwatne do realizacji zamierzonych badań. Na uznanie zasługuje bardzo dobre przygotowanie i opanowanie warsztatu w wykorzystaniu technik biologii molekularnej.

Wyniki badań zostały przedstawione w usystematyzowany sposób na 16 rycinach i w 15 tabelach. Zarówno ryciny, jak i tabele zostały umiejętnie rozmieszczone w tekście pracy, co ułatwia śledzenie opisywanych przez Doktorantkę zależności. Przy dłuższej lekturze tekstu tak liczny materiał graficzny wymaga dużego skupienia uwagi, dlatego przy przygotowywaniu pracy do druku należy go ograniczyć.

Autorka wykorzystując zaprojektowane do testów startery, uwzględniające zmienności wynikające z mutacji w obrębie odcinków genomów, dokonała optymalizacji warunków amplifikacji w zakresie stężeń starterów, ilości polimerazy *Taq*, dodatku albuminy bydlęcej (BSA), koncentracji jonów Mg i wartości temperatury przyłączania starterów. Rezultat w postaci zoptymalizowanych składów mieszanin reakcyjnych dla obu testów oraz profilu temperaturowo-czasowego został zebrany w trzech tabelach. Przygotowane testy Ifla-CBPV i Districto mRT-PCR wykazały się 100% zgodnością, czułością i specyficznością diagnostyczną w procesie ich walidacji.

W ocenianym materiale maticznym Doktorantka wykazała, że na ogólną liczbę 239 przebadanych matek tylko 5 z nich (2,09%) było wolne od zakażeń wirusowych. W pozostałych najczęściej notowany był wirus DWV (89,9%) a wirusy ABPV i BQCV odpowiednio 55,2% i 49,4%. U większości matek pszczelich występowały infekcje mieszane: dwoma gatunkami wirusów (26,4% DWV i ABPV), trzema gatunkami (15,1% DWV, ABPV i BQCV). Tylko u 13,8% zakażonych matek stwierdzono jeden gatunek wirusa, ale aż w 12,6% prób wykryto więcej niż trzy gatunki wirusów.

W zestawieniu uwzględniającym regionalizację kraju najwyższy odsetek matek zakażonych: DWV stwierdzono w województwie mazowieckim (95,8%), SBV - regionie północnym (44,1%), CBPV - regionie południowo zachodnim, ABPV - regionie północnym (73,5), BQCV - regionie południowo zachodnim (60,9%) i IAPV w województwie mazowieckim (4,2%). Najwięcej zakażeń mieszanych posiadały matki z regionu centralnego (95,0%) a najmniej z regionu północno-zachodniego. Analizując wpływ czynników biotycznych i abiotycznych Autorka wykazała zależności w prewalencji districtowirusów, SBV i CBPV powiązane z wiekiem matki oraz regionem i pochodzenia, ale nie dotyczyły one DWV. Wielkość napszczenia terenu skąd pochodziły matki nie miała wpływu na obecność u matek districto- i iflawirusów oraz CBPV. Nie obserwowano również istotnego wpływu inwazji *Varroa destructor* oraz infekcji *Vairimorpha sp.* na występowanie zakażeń wirusowych bez względu na wiek matek pszczelich.

W obszernym rozdziale Dyskusja Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością piśmiennictwa związanego z tematem pracy, jak również umiejętnością konfrontacji własnych rezultatów z wynikami innych badaczy. Zaprezentowane wyniki pozwoliły na sformułowanie aż 10 wniosków, które są zgodne z postawionymi celami. Oznacza to, że mgr inż. Dagmara Zdańska wykazała się samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Doktorantka w mojej ocenie zrealizowała w pełni wszystkie postawione z dysertacji cele badawcze, a na szczególną uwagę zasługuje zaprojektowanie, opracowanie i zwalidowanie testów Ifla-CBPV i Districto mRT-PCR. Ta część zadania badawczego ma wysoki walor naukowy a także aplikacyjny w diagnostyce wirusologicznej zakażeń wirusowych u pszczoły modnej.

Dodatkowo należy podkreślić iż Doktorantka w swoich badaniach wykorzystwała najnowsze techniki badawcze co świadczy o Jej profesjonalizmie i dobrym merytorycznym przygotowaniu. Zaznaczyć należy iż badania zrealizowane przez Nią

zostały wykonane na dużej liczbie matek pszczelich, dla których to nie ma zbyt licznych danych literaturowych z zakresu prevalencji zakażeń wirusowych a szczególnie z terenu naszego kraju.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska p.t. „Identyfikacja zakażeń wirusowych u matek pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w Polsce” autorstwa mgr inż. Dagmary Zdańskiej spełnia warunki zawarte w Art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, z dnia 20.07.2018 r. (Dz.U. 2023 poz. 742 ze zm.) i składam wniosek do Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie mgr inż. Dagmary Zdańskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy, motywując to jej wysoką wartością poznawczą i aplikacyjną oraz bardzo dobrym przygotowaniem i opanowaniem warsztatu badawczego związanego z modyfikowaniem i wykorzystaniem technik biologii molekularnej.

Paul Chabinski