

Olsztyn 1.08.2024 r.

dr hab. Maria Iller, prof. UWM
Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Dągmary Zdańskiej** pt. „**Identyfikacja zakażeń wirusowych u matek pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w Polsce**”, wykonanej pod kierunkiem promotora: prof. dr hab. Artura Rzeżutki w Zakładzie Wirusologii Żywności i Środowiska Państwowego Instytutu Weterynaryjnego–Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach oraz dr hab. Krystyny Pohoreckiej, emerytowanego profesora instytutu.

Podstawa formalna recenzji

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 12 lipca 2023 roku zgodnie z wymaganiami art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.).

Oryginalność, aktualność i przydatność podjętego problemu naukowego

Doktorantka podjęła się badań nad identyfikacją zakażeń wirusowych u matek pszczelich w Polsce. Pierwszym celem pracy było opracowanie i walidacja testów mRT-PCR zawierających kontrolę wewnętrzną amplifikacji do wykrywania dicistrowirusów, iflawirusów pszczół i CBPV. Drugim celem była ocena występowania zakażeń wirusowych u matek pszczelich pochodzących z krajowych pasiek produkcyjnych przy użyciu opracowanych testów ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR oraz trzecim, ocena wpływu wybranych czynników biotycznych i abiotycznych na występowanie zakażeń wirusowych u matek pszczelich.

Do badań Doktorantka pozyskała martwe matki pszczele w wieku od 1 do 5 lat ze 136 pasiek produkcyjnych z terenu całej Polski. Łączna liczba próbek wynosiła 239 osobników. Materiał do badań gromadzono w latach 2017-2022 w ramach krajowego programu monitorowania stanu zdrowotnego rodzin pszczelich. W pasiekach, z których pobrano matki pszczele obserwowano zwiększoną śmiertelność pszczół, trudności z poddawaniem matek do rodzin lub ich słabe czerwienie. Ponadto Doktorantka podjęła się próby oceny wpływu wybranych czynników abiotycznych na występowanie zakażeń wirusowych u matek pszczelich. Zbierała informacje dotyczące występowania w pasiekach inwazji *Varroa destructor* i *Nosema* sp., liczby rodzin pszczelich w badanych pasiekach oraz geograficznego rozmieszczenia pasiek produkcyjnych, z których pochodziły próbki. Podjęte badania oceniam jako oryginalne i aktualne, wpisujące się do badań o wysokich walorach poznawczych, poszerzających wiedzę z zakresu diagnostyki i chorób pszczół.

Ogólna charakterystyka przedstawionego do recenzji manuskryptu

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji ma formę monografii, o układzie redakcyjnym odpowiadającym wymogom stawianym pracom naukowym. Układ dysertacji jest zgodny z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim i zawiera wszystkie wymagane rozdziały. Liczy 116 stron wydruku komputerowego, obejmującego 3 strony spisu treści, 3 strony wykazu, 6 stron jednobrzmiącego streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, 17 stron wstępu, 1 stronę celów badań, 16 stron materiałów i metod, 21 stron wyników, 16 stron dyskusji i wniosków oraz 19 stron piśmiennictwa. Dokumentacja obejmuje 6 załączników, w skład których wchodziły tabele.

Ocena przedstawionego do recenzji manuskryptu

Tytuł pracy jasno precyzuje przedmiot rozprawy w zakresie prowadzonych badań. Praca rozpoczyna się wstępem, w którym Doktorantka naświetliła problematykę związaną z chorobami pszczół oraz ich diagnostyką, przedstawiając w sposób bardzo przejrzysty i zrozumiały dla czytelnika rys historyczny dotyczący występowania wirusów u pszczół. Następnie Doktorantka opisała, częstotliwość występowania zakażeń u pszczoły miodnej w Europie, załączając dwie przejrzyste ryciny pokazujące procentowe występowanie tych zakażeń w Europie. Autorka scharakteryzowała budowę i organizację genomu ifla-i dicistrowirusów oraz CBPV, dodając dwie ryciny (ryc. 2 i 3) obrazujące strukturę wirionu dicistro- i iflawirusów oraz organizację ich genomów. Rycina numer 4 w sposób zrozumiały

pokazuje drogi zakażeń wirusowych w rodzinie pszczołej. Moja uwaga dotyczy rycin 5-8, gdzie brakuje źródła pochodzenia zdjęć. Jeśli są to własne zbiory archiwalne to należy taką informację podać. Doktorantka we wstępie na stronie numer 20 i 21 cytuje Ribiere i wsp. 2008, Ball i Bailey 1997, Hails i wsp. 2008, pozycji tych brakuje w piśmiennictwie. Autorka omówiła transmisję i patogenezę zakażeń wirusowych w rodzinie pszczołej oraz ich diagnostykę (klasyczne oraz molekularne metody). W mojej ocenie jest to dobra analiza zgromadzonego piśmiennictwa, poświęconego omawianym zagadnieniom. Merytoryczną wartość wstępu oceniam wysoko.

Na podstawie przeglądu starannie dobranego piśmiennictwa Autorka sformułowała następujące cele badawcze:

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

Rozdział Materiał i metody jest dobrym i precyzyjnym opisem zastosowanych metod. Moim zdaniem rozprawa doktorska zyskałaby na przejrzystości, gdyby dodano do niej schemat przeprowadzonych badań. Mimo braku schematu, opis materiałów i metod został dokładnie, czytelnie przedstawiony. Doktorantka podzieliła rozdział na podrozdziały: próbki pszczół, wirusowe RNA, DNA bakterii, sekwencje nukleotydowe fragmentów genomu ifla-, dicistrowirusów pszczół i CBPV, oczyszczanie i sekwencjonowanie produktów PCR, opracowanie testów ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR do wykrywania wirusów pszczół, ocena odporności testów mRT-PCR na etapie przedwalidacyjnym, walidacja testów ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR, ocena występowania zakażeń u matek pszczelich oraz analizy statystyczne. Dzięki temu całość wygląda bardzo przejrzysto. Mam tylko kilka uwag dotyczących pobierania próbek do badań. Autorka napisała, że w ramach wywiadu lekarsko-weterynaryjnego zebrano informacje na temat występowania w pasiekach inwazji *V. destructor* i *Nosema* sp. Należałoby podać na czym polegało zebranie tych informacji i jakie badania wykonano w tym celu. Chciałabym podkreślić ogromną dokładność w opisanu sposobu opracowania testów ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR do wykrywania wirusów. Świadczy to o

dużej wiedzy i umiejętności Doktorantki w tym zakresie. Podrozdział 3.9. dotyczący odporności testów mRT-PCR na etapie przedwalidacyjnym, również został poprawnie opisany z wyszczególnieniem poszczególnych etapów. W podrozdziale 3.10 walidację testów ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR Doktorantka przeprowadziła zgodnie z wytycznymi WHO określając parametry takie jak: specyficzność i czułość analityczną, specyficzność i czułość diagnostyczną, dokładność, powtarzalność oraz odtwarzalność.

Rozdział Wyniki jest bogaty w 32 ryciny, ciekawie ilustrujące rezultaty uzyskane w badaniach. Ponadto Doktorantka w rozdziale tym załączyła 14 wykresów, które w bardzo obrazowy sposób przedstawiają uzyskane wyniki. Wyniki są najcenniejszą i przez to najważniejszą dla oceny recenzenta częścią rozprawy doktorskiej. Doktorantka ten rozdział napisała bardzo czytelnie, wyjaśniając uzyskane wyniki krok po kroku. W tym rozdziale przedstawiła wybór starterów ifla-CBPV i Dicistro-PCR, pokazała optymalizację testów mRT-PCR i udokumentowała to na załączanych rycinach. Dzięki temu wyniki są bardziej przejrzyste w odbiorze. Należy również podkreślić, że Doktorantka w tabelach 11-13 szczegółowo przedstawiła skład mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo-czasowy testów mRT-PCR, dzięki temu z łatwością można odtworzyć reakcje. Na uwagę zasługuje podrozdział dotyczący wykrywania wirusów u matek pochodzących z pasiek produkcyjnych. Doktorantka uzyskała ciekawe wyniki pokazując, że zakażenia wirusami u matek pszczelich występowały aż u 234 spośród 239 badanych osobników. Szczegółowe wyniki zostały przedstawione w tabeli 16, gdzie Doktorantka w czytelny sposób opisała występowanie wirusów u owadów. Interesujące informacje dostarcza tabela 17, pokazująca typy infekcji mono i zakażenia mieszane. Autorka przeprowadziła analizę występowania wirusów w poszczególnych regionach, przedstawiając wyniki w tabelach 18, 19 oraz 20. Ponadto uwagę przykuwają bardzo ciekawe wyniki na temat wpływu czynników biotycznych i abiotycznych na występowanie zakażeń wirusowych u matek pszczelich oraz ich istotnych współzależności pomiędzy parametrami. Wyniki analiz eksploracyjnych występowania zakażeń wirusowych u matek pszczelich, uwzględniające region pochodzenia i wiek owadów, liczbę rodzin pszczelich obecną w poszczególnych regionach Polski, obecność *Nosema* sp. i *V. destructor* w rodzinach oraz wyniki analiz eksploracyjnych występowania zakażeń wirusowych u matek pszczelich w różnym wieku, uwzględniając obecność *Nosema* sp. i *V. destructor* zostały przedstawione na rycinach 22-25 w sposób spójny i czytelny. Jeszcze raz chcę podkreślić, że Doktorantka dobrze poradziła sobie z przedstawieniem uzyskanych danych i opracowaniem rozdziału Wyniki.

Rezultaty badań własnych zostały omówione i skonfrontowane z wynikami innych autorów w rozdziale Dyskusja. Wszechstronna dyskusja obejmuje 16 stron. Autorka na podstawie przemyśleń własnych oraz informacji zaczerpniętych z innych licznych publikacji opisała uzyskane wyniki swoich badań, pokazując różnice oraz podobieństwa z innymi badaniami prowadzonymi w kraju i na świecie. Podział tej części pracy na 5 podrozdziałów ułatwił lekturę oraz umożliwił Doktorantce chronologiczne i przejrzyste omówienie uzyskanych wyników. Doktorantka po kolei opisała rozpoznanie zakażeń wirusowych u pszczół, znaczenie kontroli w diagnostyce molekularnej chorób wirusowych pszczół, walidację metod, zakażenia wirusowe u matek pszczelich, wpływ czynników biotycznych i abiotycznych na występowanie infekcji wirusowych u matek pszczelich oraz krótkie podsumowanie. Doktorantka prowadziła dyskusję w sposób dojrzały, skupiając się na najważniejszych obserwacjach.

Mgr inż. Dagmara Zdańska z przeprowadzonych badań wyciągnęła aż 10 szczegółowych wniosków. Wszystkie są cenne i wynikają z przeprowadzonych badań. Dla lepszego odbioru można byłoby je przeredagować i część z nich połączyć.

Rozdział Piśmiennictwo obejmuje 263 pozycji, uszeregowanych alfabetycznie, którym dodatkowo została nadana numeracja. W związku z tym, że w tekście pracy przywoływane są nazwiska autorów publikacji, na które powołuje się Doktorantka, ta numeracja nie jest konieczna. Doktorantka mogłaby zmniejszyć liczbę cytowanych publikacji, skupiając się na artykułach z ostatnich 10 lat, chyba, że rys historyczny wymaga wspomnienia starszych publikacji.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest na bardzo dobrym poziomie naukowym, a wnoszone wcześniej drobne uwagi krytyczne mają charakter polemiczny i porządkowy. Zastosowana metodyka odpowiada standardom obowiązującym w tego typu badaniach. Doktoranta wykazała bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego, a uzyskane wyniki stanowią istotny wkład do dotychczasowej wiedzy na temat zakażeń wirusowych u pszczół. Jest to cenna praca pod względem dużych walorów aplikacyjnych i poznawczych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Dagmary Zduńskiej pt. „Identyfikacja zakażeń wirusowych u matek pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w Polsce”** odpowiada wymogom określonym w art. 187 ust. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i

nauce (Dz.U. 2023 poz. 742). Przedkładam zatem Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr inż. Dagmary Zdańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na dużą wartość poznawczą i aplikacyjną pracy wnioskuję o jej wyróżnienie.

dr hab. Maria Iller, prof. UWM

