

Olsztyn 29.11.2024 r.

prof. dr hab. Tomasz Stenzel  
Katedra Chorób Ptaków  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
w Olsztynie

### **Ocena rozprawy doktorskiej**

Pani lek. wet. mgr inż. Karoliny Piekarskiej pt. "Charakterystyka molekularna szczepów polyomawirusa i cirkowirusa gęsiego izolowanych od gęsi w Polsce" wykonanej w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

pod kierownictwem dr hab. Wojciecha Kozdrunia, prof. instytutu oraz

dr hab. Jowity Samanty Niczyporuk.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 17 października 2024 r. zgodne z uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, podjętą w dniu 26. 10. 2018 r oraz Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

Gęsi stanowią ważny element przemysłu drobiarskiego, są one bowiem źródłem bardzo cenionego przez konsumentów mięsa charakteryzującego się dużą kalorycznością i wysoką zawartością białka. Z kolei tłuszcz gęsi zawiera liczne nienasycone kwasy tłuszczowe. Chów gęsi dostarcza ponadto innych produktów, takich jak puch czy pierze, którego Polska jest eksporterem. Polska przy pogłowie gęsi wynoszącym około 10 mln sztuk jest ważnym graczem na światowym rynku gęsiny, o czym świadczą dane eksportowe – wraz z Węgrami jesteśmy

europjskim liderem oraz zajmujemy trzecie miejsce w świecie pod względem produkcji mięsa tego gatunku ptaków. Znakiem rozpoznawczym krajowej produkcji gęsiny, jest odchowywana w specjalnych warunkach tuczu tzw. polska gęś owsiana. Z powyższych względów ważne jest nie tylko zapewnienie ptakom wysokiego dobrostanu gwarantującego dobre wyniki produkcyjne, ale również poznanie etiopatogenezy chorób dotyczących tego gatunku ptaków, a w szczególności chorób zakaźnych prowadzących do dużych strat ekonomicznych. Uwzględniając powyższe oraz ważną rolę jaką w patologii drobiu odgrywają zakażenia wirusowe, w tym immunosupresyjne, wysoko oceniam tematykę podjętą przez Doktorantkę badań.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska przygotowana została w formie obszernej monografii i ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań. Zawarta została na 248 stronach (wliczając wykaz skrótów, ryciny, tabele i ich opisy oraz streszczenia). Pracę wzbogaca łącznie 36 rycin oraz 49 tabel, które zdecydowanie poprawiają jej odbiór. Dotyczy to w szczególności tabel 20-49, w których znajduje się klarowne zestawienie mutacji stwierdzonych w analizowanych fragmentach genów oraz substytucji aminokwasowych w kodowanych przez nie białkach.

Ewaluowane opracowanie rozpoczyna wykaz skrótów stosowanych w pracy, co oceniam pozytywnie. W wykazie tym znajdują się wyjaśnienia większości stosowanych w dysertacji skrótów. Zwracam uwagę jednak, że nie wszystkie z nich zostały prawidłowo rozwinięte. Dla przykładu znajdujące się na stronie dziewiątej rozwinięcie skrótu „SPF” wyjaśnione jest jako „wolne od patogenów”, gdzie w rzeczywistości skrót ten oznacza „wolne od specyficznych (konkretnych)” patogenów (Specific Pathogen Free).

Bardzo obszerny, ponieważ zawarty na 41 stronach, rozdział „Wstęp” stanowi dobre wprowadzenie czytelnika w problematykę pracy i podzielony został na podrozdziały, z których pierwszy charakteryzuje gęś domową jako gatunek drobiu, jej znaczenie kulturowe i historyczne oraz obecne znaczenie dla rynku drobiarskiego w kraju. Następnie Doktorantka przechodzi do charakterystyki opisu głównego celu badań jakim są dwa gatunki wirusów – polyomawirus gęsi oraz cirkowirus gęsi. W podrozdziałach tych Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje klasyfikację taksonomiczną wirusów, budowę ich genomu oraz rolę poszczególnych genów, a także występowanie badanych przez siebie patogenów u poszczególnych gatunków żywicieli. Doktorantka nie zapomniała w tym miejscu o opisie roli w/w wirusów w patologii gęsi, patogenezы zakażeń oraz obrazu klinicznego. Rozdział kończy wzmianka o możliwościach diagnostycznych oraz potencjalnej immunoprofilaktyce tychże

zakażeń. Podsumowując, rozdział „Wstęp” nie tylko stanowi wprowadzenie w tematykę pracy ale stanowi też swego rodzaju kompendium aktualnej wiedzy dotyczącej badanych wirusów. Uważam, że dobrym wzbogaceniem rozdziałów 1.13 oraz 1.2.3 opisujących strukturę genomu byłyby ryciny schematycznie ilustrujące genom każdego z wirusów. Śledzenie ryciny w oparciu o tekst zdecydowanie ułatwiłoby odbiór tej części pracy. W tym miejscu muszę wspomnieć, iż pomimo prawidłowo zaplanowanego „Wstępu” Doktorantka zredagowała go w sposób chaotyczny, a w tekście znajduje się sporo niepotrzebnych powtórzeń. Dla przykładu praktycznie identyczne informacje dotyczące produktów uzyskiwanych z gęsi (puch) i ich eksportu znajdują się zarówno na stronach 10 jak i 12. Podobne powtórzenia znajdują się dwukrotnie na stronie 26 i dotyczą informacji dotyczących roli kaczek jako bezobjawowych nosicieli GHPV (podrozdziały 1.1.6 i 1.1.7). We „Wstępie” Doktorantka niepotrzebnie też wielokrotnie używa obok siebie pełnych nazw oraz ich skrótów. Dla przykładu na stronie 39 w przypadku białek Rep i Cap GoCV skróty ich nazw powtarzają się kilkakrotnie, gdzie zwyczajowo skrót oraz jego rozwinięcie stosuje się tylko podczas pierwszego użycia. W dalszych partiach tekstu należy stosować jedną, wybraną formę, zazwyczaj jest to skrót. Powyższe nie umniejsza wprawdzie merytoryce tej części pracy jednak znacznie zaburza jej odbiór. Doktorantka nie uniknęła jednak w omawianym rozdziale drobnych błędów merytorycznych. Dla przykładu, na stronie 17, w dwu ostatnich akapitach opisując taksonomię polyomawirusów i powołując się na ICTV wskazuje, że rodzina *Polyomaviridae* została podzielona na sześć rodzajów (choć według najnowszej wiedzy jest ich 8), z czego wirusy infekujące ptaki należą do rodzaju *Gammapolyomavirus*, co jest prawdą. Jednakże już w kolejnym akapicie, wymieniając polyomawirusy występujące u poszczególnych ptasich żywicieli Doktorantka podaje, iż zaklasyfikowano je „do rodzaju *Polyomavirus*” tym samym wprowadzając niepotrzebny chaos w tej części „Wstępu”, gdyż zgodnie z ICTV taki rodzaj nie istnieje. Podobny (choć błahy) błąd można znaleźć w rzędzie pierwszym tabeli 1 charakteryzującej polyomawirusy ptaków, w którym to jedna z kolumn zatytułowana została „zmiany kliniczne”. Doktorantka jako lekarz weterynarii powinna wiedzieć, że w odniesieniu do obrazu klinicznego choroby mówimy o „objawach klinicznych” oraz o „zmianach anatomopatologicznych”, natomiast zhybrydowanie tych 2 pojęć w jeden neologizm zdecydowanie nie jest fortunnym rozwiązaniem. Ponadto omawiana kolumna tabeli 1 wymienia również zmiany mikroskopowe (histopatologiczne), których nie można sklasyfikować zarówno do objawów jak i zmian anatomopatologicznych. Kolejne merytorycznie niefortunne określenie znajduje się na stronie 47, gdzie Doktorantka wymienia m.in. „krwotoczne wybroczyny”. W tym miejscu przypominam, że wybroczyny to właśnie

zmiany krwotoczne, więc nie mogą być innego rodzaju zmianami, za to mogą mieć różny charakter (punkcikowe, rozległe wylewy krwawe itp.).

Pragnę również dodać, że znajdujący się na stronie 35 ostatni akapit rozdziału 1.1.14 dotyczącego diagnostyki GHPV uważam za całkowicie zbędny, bowiem znajduje się w nim wiele niejasnych sformułowań, wprowadzających chaos i znacznie zaburzających odbiór pracy. Kolejnym tego przykładem jest ostatni akapit ze strony 40 mówiący, że „*W przypadku bezobjawowego zakażenia u świń wywoływanego przez niepatogenny cirkowirus świń typu 1 ... (nazwa łac.)... mogą być przyczyną wielu poważnych objawów, jak w przypadku zakażenia cirkowirusem u świń typu 2 ... (łac.) ... czynnikiem etiologicznym poodsadzeniowego wieloukładowego wyniszczającego zespołu chorobowego (łac.) czy w przypadku ptaków chorobą dzioba i piór u papug (ang.)...*”.

Moje duże zastrzeżenie budzi także informacja ze strony 44 wskazująca, że CAV to cirkowirus, bowiem już w 2015 roku ICTV przeklasyfikował rodzaj *Gyrovirus*, którego reprezentantem jest CAV do innej rodziny – *Anelloviridae* reprezentującej rząd *Lefavirales*, podczas gdy rodzina *Circoviridae* należy do rzędu *Baphyvirales*. Przyczyną takiej klasyfikacji jest odmienna od cirkowirusów budowa genomu CAV. W roku 2022 komitet zaktualizował nazwę gatunkową tego wirusa, która aktualnie brzmi *Gyrovirus chickenanemia*.

Podobnych przykładów w pierwszym rozdziale ocenianej pracy jest więcej, i pomimo dobrego ogólnie planu na zredagowanie wstępu sposób w jaki zostało to zrobione pozostawia sporo do życzenia. Rozdział ten jest napisany chaotycznie i sprawia wrażenie utworzonego w pośpiechu i bez stosownych korekt.

Rozdział „Cel pracy” moim zdaniem mógłby być bardziej spójny i precyzyjniej zredagowany. Niepotrzebny jest całostronicowy wstęp do tego rozdziału, bowiem wszystkie w nim zawarte informacje zostały wymienione w rozdziale wcześniejszym. Same cele pracy są dosyć jasno sprecyzowane a były nimi: opracowanie metod molekularnych do wykrywania GHPV i GoCV, zastosowanie tychże metod do wykrywania materiału genetycznego wspomnianych wyżej wirusów, izolacja i charakterystyka szczepów klasycznymi metodami wirusologicznymi, charakterystyka molekularna szczepów oraz ocena sytuacji epizootycznej zakażeń GoCV i GHPV w Polsce. Ogólnie cele pracy wydają się zasadne a ich skuteczna realizacja może zwiększyć wiedzę (głównie) z zakresu zróżnicowania genetycznego tych wirusów oraz określenia ich znaczenia dla krajowej populacji gęsi. W tym miejscu moje wątpliwości budzi jednak cel nr 1 – opracowanie metod molekularnych służących do

wykrywania i identyfikacji zakażeń GHPV i GoCV. Sugeruje bowiem, że takich metod brak. Jednakże w literaturze są liczne dane wskazujące, że metody takie opracowano już dawno (doi: 10.1637/10513-021013-ResNote.1; 10.1016/j.mcp.2018.04.003; 10.1637/7435-090705R1.1), o czym zresztą wspomina sama Doktorantka na stronach 32 oraz 48-50. Tym samym uważam, że potrzeba tutaj wyjaśnienia co było powodem postawienia za pierwszy cel pracy opracowania metod molekularnych do badań przesiewowych próbek. Czy krajowe szczepy wirusów charakteryzują się aż tak wysoką zmiennością genetyczną, że dostępne w literaturze metody są niewystarczające i trzeba modyfikować je do sekwencji polskich szczepów? Czy był inny tego powód? Jeśli tak to jaki? Ponadto cel nr 3 („izolacja i charakterystyka szczepów ... z wykorzystaniem klasycznych metod wirusologicznych”) nie do końca koresponduje z tytułem pracy („Charakterystyka molekularna ...”), lub tytuł pracy został niewłaściwie dobrany do jej założeń.

W dziale „Materiał i Metody” Doktorantka szczegółowo opisuje metodykę prowadzonych przez siebie badań. Materiałem do badań były wycinki narządów wewnętrznych pochodzących z łącznie 185 stad gęsi o różnym profilu hodowlanym nadesłanych do Zakładu Chorób Drobiu PIWet-PIB w Puławach w latach 2007-2024. Moim zdaniem pomocne byłyby informacje dotyczące procentowego udziału w tej puli próbek pochodzących z konkretnych rejonów kraju. Takie zestawienie przygotowane np. w formie ryciny przedstawiającej mapę kraju z naniesionymi danymi dotyczącymi liczby próbek uczyniłoby tą część pracy bardziej transparentną. Rozumiem jednak, że stosunkowo długi czas ich kolekcjonowania (17 lat) mógł sprawić problemy techniczne w graficznym przedstawieniu materiału badanego.

Zastosowane klasyczne metody wirusologiczne nie budzą żadnych wątpliwości i uznać je trzeba za standardowe. Badania wirusologiczne przeprowadzono zarówno na zarodkach gęsich oraz na hodowlach fibroblastów zarodka gęsiego, a także komórek nerki zarodka gęsiego uzyskanych z inkubowanych zarodków standardowymi metodami. W podrozdziale 3.1.3 (str. 55) podano, iż zapłodnione jaja gęsie wykorzystywane w badaniach wirusologicznych pozyskano ze stad wolnych od zakażenia parwowirusem gęsim i „innych chorób zakaźnych”. Nie sprecyzowano tu jednak, czy stada te wolne były od zakażeń polyomawirusami i zakażeń cirkowirusowych, co może mieć przecież wpływ na efekt prowadzonych badań wirusologicznych. Chyba, że wspomniane zakażenia wirusowe mieszczą się w (jakże asekuracyjnej) ogólnej definicji „innych chorób zakaźnych”.

Jako metody molekularne przeznaczone do badań przesiewowych GHPV Doktorantka wybrała klasyczny PCR amplifikujący fragment genu kodującego białko VP1, a w końcowym

podrozdziale części opisującej metodykę jest jeszcze wzmianka o opracowaniu qPCR. W tym miejscu nie do końca zrozumiałe jest dla mnie w jakim celu wstępnie amplifikowano fragment genu kodującego białko kapsydu klasycznym PCR, by w końcowym etapie przeprowadzić qPCR. Real-time PCR, jako metoda bardziej czuła i szybsza w wykonaniu (pominięcie etapu elektroforezy) powinna być metodą użytą do badań przesiewowych próbek. Nie zrozumiałe jest więc dla mnie również dlaczego metodę qPCR zastosowano tylko w odniesieniu do GHPV, a nie zastosowano jej do wykrywania materiału genetycznego GoCV. Proszę zatem Doktorantkę o wyjaśnienie.

W części metodologicznej Doktorantka opisuje także sposób walidacji (optymalizacja stężeń reagentów i warunków reakcji, określenie czułości i specyficzności) zastosowanych metod molekularnych, co zdecydowanie przemawia na Jej korzyść i świadczy o poważnym podejściu do prowadzonych przez siebie badań. W podrozdziale 3.6 Doktorantka opisuje metody służące do analizy sekwencji fragmentów genomu badanych przez siebie wirusów. Do analizy sekwencji GHPV wybrano amplikony odpowiadające całej długości genu kodującego białko kapsydu – VP1. Pomimo, że do demarkacji gatunków polyomawirusów używa się sekwencji kodującej LTag, to wybór genu kodującego białko kapsydowe do oceny zmienności genetycznej wirusa należy w tym wypadku uznać za prawidłowy. Powyższe wynika z faktu, że to właśnie gen kodujący białko antygenowe poddawany jest głównej presji selekcyjnej i w nim możliwe jest wykrycie mutacji związanych z mechanizmami ewolucji wirusów. Doktorantka postanowiła poddać analizie kompletną sekwencję tego genu amplifikując produkt o wielkości 1232 nt. Polyomawirusy posiadają stosunkowo mały genom (około 5 tys. nt), wobec czego idealną metodą pozwalającą na rzeczywiste określenie ich zmienności genetycznej byłoby sekwencjonowanie kompletnego genomu. Zastosowane przez Doktorantkę sekwencjonowanie kompletnego genu kodującego główny antygen wirusa mogą jednak uznać za metodę alternatywną. W tym miejscu jednak dziwi mnie, że Doktorantka nie mogła postąpić w analogiczny sposób w przypadku GoCV. Cirkowirus gęsi jest wirusem o jeszcze mniejszym genomie (ok. 2 tys. nt). W tym jednak przypadku Doktorantka nie amplifikowała ani całego genomu, ani kompletnych sekwencji głównych genów, a jedynie ich fragmenty. W przypadku genu replikazy badany fragment był stosunkowo duży (976 nt), ale już w przypadku genu białka kapsydu (*cap* z ORF1) było to około 300 i 440 nt, a to zdecydowanie zbyt krótki fragment by scharakteryzować molekularnie GoCV. W tym miejscu chcę podkreślić, że cirkowirusy charakteryzują się bardzo dużą zmiennością genetyczną, występowaniem licznych mutacji punktowych w całym genomie oraz zdarzeń rekombinacyjnych w różnych częściach genomu,

zatem w ich przypadku tylko analiza pełnego genomu pozwala na określenie zmienności genetycznej! W obecnych czasach nie jest to ani technicznie trudne, ani kosztowne, a możliwe do wykonania nawet przy zastosowaniu sekwencjonowania metodą Sangera (konieczność w tym przypadku użycia kilku par starterów). Uważam, że zarówno w przypadku GoCV jak i w przypadku GHPV choć kilka wybranych szczepów powinno zostać poddanych sekwencjonowaniu pełnogenomowemu. Oczywiście jako alternatywę można zastosować analizę pełnych sekwencji poszczególnych ORF, jednak Doktorantka tego nie zrobiła. Tym samym nasuwa się pytanie, dlaczego w przypadku GHPV pełna sekwencja kodująca białko kapsydu została zaimplikowana, a w przypadku GoCV nie? To kolejny brak spójności w zastosowanej metodyce badań!

Do amplifikacji fragmentów genomu GoCV wykorzystano zarówno startery zaprojektowane przez Chen i wsp. (2006) jak również zaprojektowane w ramach badań Doktorantki startery własne. Moim zdaniem w tabeli 4 (str. 64) powinno być wyraźnie zaznaczone, które ze starterów zaczerpnięto z literatury, a które opracowano w ramach badań własnych.

Analizy bioinformatyczne przeprowadzono za pomocą znanych oprogramowań i można uznać je za podstawowe, jednak w przypadku badań w dyscyplinie weterynaria są one wystarczające. Analizę filogenetyczną przeprowadzono metodą NJ, w tym miejscu brak mi informacji dlaczego taki model substytucji wybrano. Ponadto opracowanie maczy podobieństwa nukleotydowego (co możliwe jest po zastosowaniu dedykowanego temu oprogramowania jakim jest np. SDT2) znacznie uatrakcyjniłoby pracę i ułatwiło interpretację oraz wizualizację wyników.

Najbardziej obszernym rozdziałem ewaluowanej dysertacji jest rozdział „Wyniki”, bowiem zawarto go na aż 134 stronach! Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wskazują na występowanie GHPV w 54,1 % przebadanych stadach gęsi, a obecność materiału genetycznego tego wirusa najczęściej wykrywano w próbkach nerek, jelit, wątroby oraz serca. Doktorantka wykazała, że badane szczepy polyomwirusa gęsiego są patogenne dla zarodków gęsich, a narządy bogato unaczynione zarodków są miejscem predylekcyjnym dla GHPV, co Kandydatka do stopnia naukowego doktora tłumaczy powinowactwem wirusa do endothelium małych naczyń krwionośnych. Z informacji zawartych na stronie 72 oraz z tabeli nr 6 wynika, że do badań wirusologicznych prowadzonych na zarodkach wybrano 10 szczepów, a do badań na hodowlach komórkowych 6 szczepów. W tym miejscu mam kolejne pytanie - co było kryterium wyboru szczepów użytych do inokulacji zarodków?

Badania molekularne przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały obecność licznych mutacji punktowych w genie VP1 GHPV oraz w badanych fragmentach genów GoCV w porównaniu z użytymi do analiz bioinformatycznych szczepami referencyjnymi. Część z tych mutacji nie została do tej pory opisana u badanych wirusów, co należy odbierać jako jedyny wartościowy element ocenianej dysertacji. Ważne jest również to, że większość wykrytych mutacji przełożyła się na zmianę sekwencji aminokwasów w kodowanym białku, czyli mają one potencjalne znaczenie dla ewolucji GHPV. Doktorantka podaje, że analiza VP1 GHPV pozwoliła na zidentyfikowanie sześciu podgrup/ genotypów. Niestety brak mi tutaj informacji jakie kryteria demarkacji genotypów były podstawą takiego podziału!

Badaniami molekularnymi Doktorantka wykazała odpowiednio 42 i 15 stad dodatnich dla *cap* i *rep* GoCV. Moim zdaniem dobrym wzbogaceniem pracy byłoby zestawienie tabelaryczne przedstawiające odsetki próbek dodatnich odpowiednio dla GHPV, GoCV oraz obu tych wirusów, bowiem Doktorantka nie podaje ile z badanych próbek było podwójnie pozytywnych. Analizy bioinformatyczne wykonane na uzyskanych sekwencjach GoCV wykazały olbrzymią liczbę mutacji punktowych, co jest bardzo charakterystyczną cechą cirkowirusów. Doktorantka sugeruje, że w krajowej populacji gęsi krąży wiele odmiennych genetycznie szczepów tych wirusów, co bez wątplenia jest prawdą, jednak jak wspomniałem wcześniej analizowane fragmenty genomu są zbyt małe by to określić. Tym samym ponownie podkreślam, że zastosowana metoda badawcza jest nieprawidłowa i niewystarczająca do wysnucia rzetelnych wniosków.

Mam kilka dodatkowych pytań oraz uwag do tego bardzo obszernego rozdziału. Dużą jego część zajmuje lista wymieniająca poszczególne szczepy wirusów, u których stwierdzano wybrane mutacje. Taki sposób zredagowania działu wyniki czyni go mało czytelnym i trudnym do śledzenia. Nie mniej jednak te same dane przedstawione są w formie tabelarycznej, która jest zdecydowanie bardziej klarowna w odczycie (np. tab. 7 i 9 oraz 13-15 oraz informacje na str. 73-74 i 82-83). Tym samym uważam, że przedstawienie tych akurat wyników w formie samych tabel byłoby zupełnie wystarczające. Ponadto w opisie wyników walidacji metody qPCR brakuje informacji dotyczących wydajności reakcji. Dodatkowo na stronie 98, rozdział 4.3.1 Doktorantka podaje, że po amplifikacji fragmentu genu VP1 (produkt 397 pz, klasyczny PCR) stwierdzono produkty „świadczące o dużej koncentracji wirusa”. Jak Doktorantka mogła to stwierdzić, skoro badanie klasycznym PCR jest analizą jakościową a nie ilościową? Na stronie 121 (wyniki qPCR) Doktorantka z kolei podaje, że niskie cq (14,3-28,5) świadczyło o dużej koncentracji wirusa (tylko częściowo jest to prawdą, ponieważ sam odczyt cq nie jest



pełną analizą ilościową) i pozwoliło zaklasyfikować próbki do sekwencjonowania. Powyższa niespójność sprawia, że czytając tę pracę ostatecznie nie wiem na jakiej podstawie badane szczepy kwalifikowano do sekwencjonowania. Z kolei na stronie 100 Doktorantka podaje, że szczepy, w których stwierdzono nowe mutacje zostaną umieszczone w bazie GenBank NCBI. Uważam, że szczepy te powinny zostać umieszczone w bazie danych i mieć nadane numery dostępne przed napisaniem pracy! Umożliwiłoby to weryfikację przeprowadzanych analiz.

Na stronie 105 Doktorantka opisuje wyniki analizy sekwencji aminokwasowej VP1. Nasuwa się więc tu kolejne pytanie – czy odnotowano korelację pomiędzy mutacjami w genie kodującym VP1 i sekwencją aminokwasową kodowanego białka a patogennością wirusa dla zarodków? Dane uzyskane z wywiadu nie sugerowały klinicznej postaci choroby. Z kolei na stronie 127 Doktorantka podaje, że po wirtualnej translacji produktu 308 pz uzyskano sekwencję aminokwasową o długości 105 aminokwasów. Powyższe wskazuje na błędy obliczeniowe lub edycyjne, ponieważ z definicji kodu genetycznego wynika, że jeden aminokwas jest kodowany przez trójkę nukleotydową, więc z produktu 308 nt można uzyskać maksymalnie 102 aminokwasowy fragment, aby otrzymać fragment długości 105 aminokwasów należałoby zsekwenjonować produkt długości 315 nukleotydów! Rozumiem, że to tylko małe niedopatrzenie redakcyjne ze strony Doktorantki, jednak przykuwa moją uwagę jako wnikliwego recenzenta.

Mam też szereg uwag w odniesieniu do samego zredagowania rozdziału „Wyniki”. Mianowicie znajdują się w nim, fragmenty dyskusji wyników, jak np. na stronie 133. Rozdział wyniki powinien w sposób zwięzły opisywać rezultaty przeprowadzonych badań i o ile nie jest połączony z rozdziałem „Dyskusja” nie powinno być w nim prób interpretacji wyników. Prowadzi to do niepotrzebnego zwiększania objętości pracy, utrudnia jej czytanie i ocenę oraz jest powodem występowania powtórzeń. Powtórzeń nie uniknęła Doktorantka i w tym rozdziale, czego przykładem są np. strony 98 i 99 oraz 124 i 125, w których znajdują się powtórzone opisy metodyki.

Rozdziałem, który Doktorantom zazwyczaj przysparza sporo problemów jest „Dyskusja”. Rozdział ten w ocenianej dysertacji jest stosunkowo obszerny, ponieważ zawarty na 19 stronach. „Dyskusję” napisała Doktorantka dosyć swobodnym językiem i w sposób płynny, co sprawia że nie przyczynia się ona do trudności w odbiorze. Sama dyskusja jest niestety stosunkowo płytka i zawiera liczne powtórzenia uzyskanych wyników, jak wylistowanie konkretnych szczepów lub mutacji bez wgłębiania się jaki mogą mieć one wpływ na samego wirusa i jego ewolucję. Rozumiem, że dane dostępne w literaturze mogą być

limitowane i nie zawsze możliwe jest odniesienie się do wyników innych badaczy w celu porównania własnych rezultatów. Oczywiście Doktorantka próbuje dokonywać porównań uzyskanych przez siebie wyników z danymi z literatury jednak to nieco zbyt mało na pełną dyskusję świadczącą o dojrzałości naukowej, bowiem poza analizą porównawczą z literaturą powinno się dołożyć wszelkich starań by wyniki odpowiednio zinterpretować.

Na stronie 226 Doktorantka formułuje 6 wniosków płynących z przeprowadzonych przez nią badań. Wnioski są zredagowane w formie krótkich, informacyjnych zdań, co oceniam dobrze. Jednakże nie wszystkie z nich można nazwać rzeczywistymi wnioskami płynącymi z przeprowadzonych badań. Przykładem powyższego jest wniosek 1, który raczej jest stwierdzeniem faktu (opracowanie testów i ich czułość oraz specyficzność) niż płynącym z badań wnioskiem. Ostatnie zdanie wniosku 1 po delikatnym przeredagowaniu może stanowić konkluzję. Po przeredagowaniu również wnioski 2-4 mogą stanowić konkluzje płynące z badań. Przy czym wniosek 4 należy przeredagować gruntownie, ponieważ wspomniane w nim „niska zmienność .... sekwencji ...., jak również wysoka homologia” oznaczają w zasadzie to samo. Wniosek 5 powinien być zdecydowanie przeredagowany z obecnej formy na np. „Preferowanym do namnażania GHPV materiałem są hodowle GEK”. Takie zredagowanie konkluzji będzie moim zdaniem o wiele bardziej klarowne niż deskryptywne ich ujęcie jak w ocenianej dysertacji.

Pracę wieńczą streszczenia odpowiednio w języku polskim oraz angielskim.

Wykaz piśmiennictwa wskazuje, że pracę napisano w oparciu o 141 pozycji literatury, z których 16 (ok. 11%) zostało opublikowanych w ciągu 3 ostatnich lat, co sugeruje ważność i aktualność podjętego przez Doktorantkę tematu.

Niestety w trakcie oceny monografii również i w tym rozdziale znalazłem liczne nieścisłości. W tekście brakuje cytowań ponad 6 pozycji piśmiennictwa ujętych w wykazie. Mianowicie nie są zacytowane następujące pozycje: 15 – Breitbart i wsp. (2017); 40 – Hailemariam i wsp. (2008); 48 – Hu i wsp. (2012); 76 i 77 – Mazanowski (2003 i 2012); 125 – Todd i wsp. (2007).

Z kolei część pozycji cytowanych w tekście nie znajduje się w wykazie piśmiennictwa. Są to publikacje cytowane jako: Jijang i wsp. 2009 (str. 14); Johne R. i wsp. 2001 (str. 15); Chen i wsp. 2018 (str. 17); Rodgers i Consigli 1996 (str. 22); Farsan i wsp. 2011 (str. 27); Allan i Ellis, 2020 (str. 41); Crowther i wsp. 2003 (str. 44); Yao i wsp. 2019 (str. 44); Hills i Bull, 1993 (str. 69); Xu i wsp. 2012 (str. 50, w wykazie piśmiennictwa są 2 nowsze prace autora o

takim nazwisku ale dotyczą innej tematyki); Harkins i wsp. 2014 (str. 223); Julian i wsp. 2003 (str. 223).

Ponadto następujące publikacje zacytowano w sposób niewłaściwy: Wang i wsp. 2022 zacytowano jako Wang 2022 (str. 17); Woźniakowski i wsp. 2012 zacytowano jako Woźniakowski i wsp. 2015 (str. 32); Shah, 1996 zacytowano jako Sha 1996 (str. 34); Kaszab i wsp. 2018 zacytowano jako Kaszab i wsp. 2020 (str. 39); w cytowanej pracy Johne i wsp. (2006) na stronie 41 nie dopisano, że chodzi o pozycję „a” z listy referencji; Smyth i wsp. 2005 (str. 46) podano w wykazie piśmiennictwa jako Smythe i wsp. 2005 (poz. 108); Ball, 2004 zacytowano jako Bell 2004 (str. 47); Chen, 2003 zacytowano jako Chan 2006 (str. 48); Stoll i wsp. 1994 zacytowano jako Stall i wsp. 1994 (str. 213); Ritchie i wsp. 1993 zacytowano jako Ritchie 1995 (str. 29). Na stronie 37, publikacja Johne i wsp. z 2006 – nie sprecyzowano czy to pozycja „a” czy „b” (w wykazie są 2 prace tego zespołu opublikowane w 2006 roku). Podobnie jest w przypadku pracy Todda z 2004 roku oraz Todda i wsp. z 2001 roku - w wykazie literatury są 2 prace opublikowane w tym samym roku przez tego samego autora, więc powinny mieć odpowiednie dopiski zarówno we wspomnianej liście jak i w tekście. Z kolei na stronie 43 zacytowano pracę Xu i wsp. 2024, a powinno być Xu S. i wsp. 2024, bowiem w wykazie piśmiennictwa znajdują się 2 prace opublikowane w tym samym roku przez 2 różnych autorów, ale o tym samym nazwisku (poz. 136 i 137 wykazu piśmiennictwa)! Jako ostatnią uwagę krytyczną wymieniam bardzo niestaranne przygotowanie samego wykazu piśmiennictwa - lista nie jest ustawiona dokładnie w systemie alfabetycznym i chronologicznym, co utrudnia ocenę pracy.

Poza wymienionymi wyżej licznymi poważnymi niedociągnięciami merytorycznymi oraz redakcyjnymi Doktorantka popełniła również sporo mniejszych błędów edycyjnych i merytorycznych, co podczas redagowania manuskryptów zdarza się często. Jednak z racji roli wnikliwego recenzenta zobligowany jestem je poniżej wymienić: str. 33 – zdanie zaczynające się od małej litery; str. 36 „cząsteczki VLP”; gdzie „P” tego skrótu oznacza cząsteczki (particles)!; str. 42 „cząsteczki” wirusa, zamiast „cząstki wirusa”; str. 56 „wirus GHPV”, gdzie „V” oznacza właśnie wirusa; str. 59 – niewłaściwa nazwa markera wielkości mas; str. 70 i 123 – „reakcja PCR”, gdzie „R” oznacza właśnie reakcję; str. 60 - „Sekwencje zsyntetyzowano w firmie ..” zamiast „startery zsyntetyzowano...”. Ponadto na tej samej stronie podane jest, że „...korzystano ze starterów własnych zaprojektowanych w oparciu o sekwencję całego białka...”, gdzie startery projektuje się na podstawie sekwencji nukleotydowej genu białko kodującego, jak zapewne było w tym przypadku! Podobny błąd znajduje się na str. 63, gdzie

Doktorantka pisze o „...metodzie PCR do wstępnej identyfikacji białka kapsydu GoCV”. Przecież metoda ta służyła do wykrywania fragmentu genu kodującego białko kapsydu tego wirusa a nie samego białka! Moim zdaniem Doktorantka powinna ujednoczyć skróty odnoszące się do par zasad. W większości tekstu używa polskiego skrótu – pz, jednak na str. 124 i 126 w opisach rycin 21 i 22 znajduje się skrót bp od angielskiego „base pairs”. Inne, mniejsze błędy jakie wychwyliłem oceniając tą pracę widoczne są np. na str. 128, gdzie jest wzmianka o „...sekwencji nukleotydowej dla białka ORFC1 oraz białka Rep”. Pomijając nie do końca fortunne sformułowanie dotyczące sekwencji i białek, Doktorantka powinna tutaj ujednoczyć nazewnictwo i odnieść się albo do sekwencji ORF (w tym wypadku będzie to C1 i V1) lub do genów (będzie to *rep* i *cap*). W tym miejscu przypominam, że nazwy genów w genomach wirusów piszemy z małej litery i kursywą, a białek wielką literą bez kursywy, co również nie jest konsekwentnie przestrzegane przez Doktorantkę. Ponadto na str. 130 w tytułach obu tabel wspomniano o „...zestawieniu ... mutacji punktowych w białku...”, gdzie wiadomo, że mutacje występują w genach białka kodujących. Sporo jest też zdań niefortunnie zredagowanych pod względem stylistycznym, jak np. na str. 21 początek podrozdziału 1.1.2 oraz na str. 74 – cały ostatni akapit, jak również na stronie 100 – pierwsze zdanie rozdziału 4.3.3. Dodatkowo na stronie 101 podane jest, że mutacje pełnią w ewolucji wirusów „ważną, znaczącą funkcję”, a na str. 119 Doktorantka pisze o drzewie filogenetycznym przedstawiającym „...zależności pomiędzy badanymi sekwencjami szczepów” oraz wspomina o szczepach pochodzących z wymazów z kloaki z 202 roku (tu chyba brakuje wzmianki jak Doktorantce udało się dotrzeć do tak archiwalnych próbek!). Kiepskie pod względem stylistycznym zdanie opisujące homologię sekwencji genu kodującego VP1 GHPV znajduje się również na str. 114 (ostatnie zdanie). Z kolei na str. 133 Doktorantka wspomina o „najbardziej zmiennej mutacji”, którą była tranzycja typu A>G. Skoro jest to określona tranzycja to jak mogła być zmienna? Trudno mi analizując całe zdanie (trzeci akapit od dołu strony) zrozumieć co Doktorantka miała na myśli je pisząc. To tylko wybrane błędy. W pracy ponadto znajduje się dużo błędów literowych, podwójnych spacji itp.

Powyższe może świadczyć o pośpiechu w redakcji tego manuskryptu lub swego rodzaju niedbalstwie edycyjnym i jednocześnie daje pewną konkluzję. Mianowicie skoro Art. 13, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) zezwala na redagowanie prac doktorskich w formie monografii lub kompilacji publikacji, to moim zdaniem ta druga wersja jest o wiele lepszym rozwiązaniem. Podpieram to faktem, że publikacje muszą przejść sito recenzenckie,

tym samym większość (jeśli nie wszystkie) większe i mniejsze błędy popełnione przez Doktorantkę wychwycone zostałyby przez recenzentów i poprawione w ramach recenzji. Pozwoliłoby to uniknąć licznych uwag krytycznych, jak w przypadku niniejszej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca posiada liczne niedociągnięcia zarówno na etapie planowania i przeprowadzenia badań, zastosowanej metodyki oraz redakcji monografii. Ponadto tytuł pracy nie w pełni koresponduje z charakterem przeprowadzonych badań. Moje największe zastrzeżenia budzi sposób przeprowadzenia analiz bioinformatycznych, które w przypadku omawianych wirusów powinny zostać wykonane na sekwencjach pełnego genomu. Doktorantka powinna nie tylko ujednolicić metodę uzyskania sekwencji do analiz dla obu badanych wirusów, ale spróbować uzyskać sekwencję pełnego genomu choć z wybranych próbek. Takie dane pozwoliłyby na przeprowadzenie bardziej obszernych analiz bioinformatycznych, pozwalających w pełni scharakteryzować molekularnie badane wirusy. Co więcej uzyskane w ten sposób dane z pewnością miałyby wyższy potencjał publikacyjny.

W tym miejscu zauważam jednak, że cel nr 4 pracy dotyczący charakterystyki molekularnej badanych wirusów nie precyzuje jasno czy Doktorantka zamierzała analizować pełnogenomowe sekwencje wirusa (jest jedynie wzmianka o pełnej analizie geograficznej), czy jedynie jego fragmenty. Tym samym można uznać, że zakładany przez Doktorantkę cel został w pewnym stopniu osiągnięty. W związku z powyższym wydaję pozytywną opinię rozprawie doktorskiej lek. wet. mgr inż. Karoliny Piekarskiej, bowiem podjęcie tego ważnego z punktu widzenia epizootologii tematu przyczynia się do poszerzenia wiedzy z zakresu występowania wybranych wirusów w krajowej populacji gęsi jak również wskazuje na istnienie nieopisanych do tej pory mutacji w genomach tychże wirusów, co zdecydowanie uważam za najbardziej wartościową część ewaluowanej dysertacji.

Tym samym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska w minimalnym stopniu spełnia warunki ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), więc przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. mgr inż. Karoliny Piekarskiej do publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie podtrzymuję wszystkie swoje uwagi krytyczne, a w trakcie obrony proszę o wyjaśnienie spraw dyskusyjnych.