Prof. dr hab. Łukasz Adaszek
Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej
lek. wet. Magdaleny Załęskiej-Wawro

„Ocena przydatności wybranych metod biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek"

Układ redakcyjny ocenianej dysertacji odpowiada wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 104 strony wydruku komputerowego, w tym spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, uzasadnienie i cele badań, materiał i metody, wyniki, omówienie, wnioski końcowe, piśmiennictwo, oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dokumentacja jest bogata i obejmuje 17 tabel i 11 rycin umiejętnie włączonych w tekst pracy.

Praca dotyczy istotnego problemu diagnostyki choroby aleuckiej u norek, obejmującej molekularną charakterystykę wirusa odpowiedzialnego za jej rozwój. AMDV będący czynnikiem etiologicznym choroby należy do rodziny *Parvoviridae*, podrodziny *Parvovirinae*. Wywołuje nieuleczalną chorobą, która przebiega najczęściej bezobjawowo i powoduje duże straty ekonomiczne w fermowej hodowli norek wynikające z zaburzeń w rozrodzie oraz upadków młodych osobników. Do tej pory metody diagnostyki AMD, zwłaszcza w warunkach terenowych, bazowały na stosunkowo prostych i nieswoistych testach.

W przesłanej do oceny pracy doktorskiej lek. wet. Magdalena Załęska-Wawro przedstawiła wyniki badań poświęconych wykorzystaniu różnych metod biologii molekularnej w rozpoznawaniu omawianej jednostki.

Stosunkowo niewielka ilość doniesień poświęconych tego typu badaniom w Polsce i na świecie stanowi wystarczający i uzasadniony powód podjęcia przez Doktorantkę badań. Decyzję o realizacji przedstawionych w pracy badań podjęła Ona z pełną świadomością spodziewanych trudności zwłaszcza związanych z nakładem pracy oraz interpretacją wyników badań PCR i sekwencjonowania, wynikających z labilnego genomu AMDV, w

którym często dochodzi do mutacji. W wyniku koncentracji i intensywnego rozwoju hodowli norek w Polsce wzrosło również znaczenie choroby aleuckiej. Hodowla i produkcja zwierząt futerkowych w naszym kraju jest ważną częścią gospodarki o dużym znaczeniu ekonomicznym. Jak podaje Doktorantka polskie gospodarstwa hodowli zwierząt futerkowych zapewniają pracę dla ok. 50 tys. pracowników, a roczne przychody polskich hodowców wynoszą ok. 400 mln €.

Dlatego również i z tego punktu widzenia podjęcie przez lek. wet. Magdalenę Załęską-Wawro badań dotyczących zagadnień zaprezentowanych w tytule pracy należy uznać za trafne i w pełni uzasadnione zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym.

Pracę rozpoczyna, czternastostronicowy wstęp, w którym Doktorantka scharakteryzowała hodowlę zwierząt futerkowych w Polsce, a także przedstawiła epidemiologię, etiologię, patogenezę i przebieg kliniczny choroby aleuckiej u norek. Szczegółowo opisała także metody rozpoznawania i zwalczania tej jednostki chorobowej. Wstęp, wskazuje na dobrą znajomość przez Doktorantkę badanej tematyki i piśmiennictwa. Jest on tak napisany, że uzasadnia celowość prowadzenia zaproponowanych przez Doktorantkę badań i pozwala na sformułowanie ich ostatecznego celu, który logicznie wypływa z przedstawionego we wstępie opisu.

Doktorantka postawiła sobie do realizacji sześć celów badawczych tj.: ocenę przydatności serologicznej metody CIEP dla określenia częstotliwości występowania zakażeń i oceny sytuacji epizootycznej AMD w Polsce; ocenę czułości klasycznego, nested i real-time PCR w diagnostyce AMDV; poszukiwanie nowych izolatów AMDV w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich oraz analizę filogenetyczną izolatów AMDV, w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich. Liczba celów badań w mojej opinii jest zbyt duża i powinna zostać zmniejszona. Doktorantka, mogła połączyć cele 2,3 i 4 w jeden, podobnie jak cele 5 i 6. Cel pierwszy pracy dotyczy oceny przydatności badań serologicznych w ocenie sytuacji epizootycznej choroby aleuckiej, natomiast tytuł pracy sugeruje, iż Autorka prowadziła jedynie badania molekularne. Dlatego też wydaje mi się, że tytuł pracy powinien brzmieć nieco inaczej np.: Monitoring serologiczny i ocena przydatności wybranych metod biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek".

W Rozdziale „Materiał i Metody", liczącym 18 stron Autorka opisała użyte w pracy materiały oraz metodyki badawcze. Przedstawiła charakterystykę grupy badanej, technikę pobierania materiału do badań serologicznych i molekularnych oraz szczegółową metodykę badań serologicznych i molekularnych, w tym PCR i sekwencjonowania. Metodyka badań

została dobrana poprawnie, a sam opis poszczególnych analiz jest niezwykle dokładny, pozwalający czytelnikowi pracy na łatwe powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów. Niezależnie od tego mam kilka uwag do tej części pracy.

- Doktorantka w Tabeli 2 w grupach badanych II i III podała płeć zwierząt, czego zabrakło w grupie I.

- Interesującym jest u ilu z 174 norek od których pobierano narządy wewnętrzne do badań molekularnych wystąpiły objawy nasuwające podejrzenie AMD.

- Czy wiadomo jaka była przyczyna upadków pozostałych zwierząt?

- W tabelach 4, 6, 7 i 9 wyraz „hartowanie" należałoby zastąpić terminem „przyłączanie starterów"

- Co stanowiło kontrolę ujemną w PCR?

Wyniki badań przedstawiono na 29 stronach maszynopisu, wzbogacając je starannie opracowanymi i czytelnymi tabelami i rycinami.

Lek wet. Magdalena Załęska-Wawro udowodniła ponad wszelką wątpliwość, iż uzyskane wyniki badań serologicznych wykonywanych w kierunku AMDV pozostają w ścisłej korelacji z prowadzonym programem monitorowania lub zwalczania AMD. W grupie norek pochodzących z ferm na których realizowano program zwalczania choroby aleuckiej, nie stwierdzano dodatnich seroreagentów, podczas gdy u zwierząt pochodzących z obiektów, w których nie był on stosowany swoiste przeciwciała dla wirusa wykrywano nawet u ponad 90% badanych osobników. Są to bardzo istotne spostrzeżenia wskazujące na to jak ważny jest monitoring i właściwe prowadzenie programów kontroli choroby dla ochrony stad przed zakażeniem AMDV.

Wyniki badań molekularnych wykazały natomiast, iż choroba aleucka występuje na fermach w Polsce, o czym świadczy potwierdzenie obecności materiału genetycznego wirusa w narządach wewnętrznych norek oraz, jak można było się spodziewać, że PCR w czasie rzeczywistym wykazuje najwyższą czułość w wykrywaniu DNA AMDV. Wszystkie uzyskane produkty PCR zostały poddane sekwencjonowaniu, a sekwencje analizie filogenetycznej, dzięki czemu Doktorantka była w stanie określić, że krajowe szczepy wirusa wykazują najwyższe podobieństwo ze szczepem ADV-Utah 1 VP2 gene USA

Także i w tej części pracy Autorka nie uniknęła pewnych nieścisłości. Na rycinie 7 przedstawiającej rozdział elektroforetyczny zaznaczone są ścieżki dla 10 próbek, podczas gdy w jej opisie znajduje się informacja o tym, że badanych było 12 próbek. Podobna niezgodność dotyczy ryciny 8.

W liczącym 18 stron rozdziale „Omówienie" Doktorantka podkreśliła, wagę i unikalność prowadzonych badań. Wyniki badań własnych umiejętnie skonfrontowała z analogicznymi danymi zamieszczonymi w dostępnym piśmiennictwie. W tej części pracy Doktorantka w zasadzie przedyskutowała każdy aspekt prowadzonych badań. Lek. wet. Magdalena Załęska-Wawro w sposób jednoznaczny udowodniła, że monitoring serologiczny i molekularny odgrywają istotną rolę w ocenie sytuacji epizootycznej choroby aleuckiej norek oraz że stanowią one cenną oręż w identyfikacji ognisk choroby i opracowaniu strategii jej zwalczania. Jest to tym bardziej istotne, że AMV może stanowić zagrożenie dla ludzi i innych gatunków zwierząt.

Bardzo interesującymi wydają się być spostrzeżenia dotyczące sekwencji badanych genów wirusa. Analiza filogenetycznej różnych patogenów umożliwia ustalenie ich pochodzenia. Jednakże w przypadku AMDV nie zawsze jest to możliwe. Jak wskazała Doktorantka często w obrębie jednego obszaru geograficznego od norek izolowane są róże warianty wirusa, nierzadko znacznie oddalone od siebie filogenetycznie. Ze względu na znaczną zmienność genetyczną AMDV nie do końca można także określić, które mutacje, czy też zmiany sekwencji nukleotydowej odpowiadają za pojawienie się szczepów wirulentnych wirusa. Te kwestie powinny być poddane dalszym badaniom.

Praca zakończona jest siedmioma wnioskami, które logicznie wynikają z kontekstu doktoratu. Wniosek nr 2 jest powtórzeniem wyników i powinien zostać usunięty, natomiast wnioski 4 i 5 oraz 6 i 7 mogłyby zostać połączone w jeden.

Wykaz piśmiennictwa jest bogaty, co świadczy o zdolności doboru właściwych materiałów źródłowych do analizy wyników i dyskusji w ramach tematyki będącej przedmiotem badań.

Reasumując stwierdzam, ze przedstawione w pracy zagadnienia stanowią ważne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej epidemiologii i diagnostyki choroby aleuckiej u norek. Uzyskane wyniki są w mojej ocenie wartościowe zwłaszcza z uwagi na fakt, iż jest to jedno z niewielu tego typu opracowań przedstawiających szerokie zastosowanie metod biologii molekularnej do rozpoznawania choroby i identyfikowania szczepów AMDV. Praca zawiera elementy nowatorskie, została wykonana metodycznie poprawnie, a wyniki badań mają duże znaczenie poznawcze.

Oczywiście szczegółowa analiza rozprawy ujawnia pewne niedociągnięcia. Obok uwag zawartych w recenzji sugeruję, aby w przyszłości Doktorantka bardziej precyzyjnie

podchodziła do stylistycznej strony własnych publikacji. W wielu miejscach tekst wymaga korekty np.:

- Str. 16. Sporadycznie występują smoliste biegunki, charakterystyczne dla krwi w płynnym kale.

- Str. 24 Zgodnie z wymogami hodowli dla norek zapewniono im stały dostęp do wody w ciągu doby **oraz i** karmiono 2-3 krotnie w ciągu dnia mieszanką pokarmową przez cały tydzień.

- Str. 24 Pobierano od nich krew do heparynizowanych rurek hematokrytowych w celu szybkiego wykonania badania serologiczne.

- Str. 76 Dotychczas za główną drogę zakażenia uważano drogę **erogenną**,

Tego typu błędy stylistyczne i edytorskie powinny zostać wychwycone przed oddaniem pracy do druku.

Przedstawione uwagi mają w większości charakter porządkowy i nie wpływają na pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy. Doktorantka włożyła wiele pracy w wykonanie badań, wywiązując się w pełni z zadań określonych w celach badawczych.

W konkluzji stwierdzam, ze praca doktorska pt.: "**Ocena przydatności wybranych metod biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek"** odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Magdaleny Załęskiej-Wawro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 08 września 2023

Prof. dr hab. Łukasz Adaszek,