UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 16 września 2025

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Ewy Łukaszuk

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została sporządzona w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, prof. dr hab. Tomasza Maślanki, z dnia 16 lipca 2025 roku. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Ocena zależności pomiędzy składem wiromu przewodu pokarmowego a występowaniem enteropatii u młodych gołębi sportowych" została przygotowana przez lek. wet Ewę Łukaszczuk pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Stenzla. Badania zostały przeprowadzone w Katedrze Chorób Ptaków Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa doktorska lek. wet. Ewy Łukaszczuk została przygotowana w języku polskim, obejmuje 61 stron opisu po polsku oraz zestaw artykułów wchodzących w skład rozprawy. W skład pracy wchodzi artykuł pt. „Recombinant viruses from the *picornaviridae* family occurring in racing pigeons" opublikowanego w czasopiśmie Viruses (MDPI); artykuł pt.„Occurrence of astrovirus in young racing pigeons and genome characterization of 2 new astrovirus genomes representing 2 new species" opublikowany w czasopiśmie Poultry Science (Poultry Science Association), artykuł pt. „Rotaviruses in pigeons with diarrhea: recovery of three complete pigeon rotavirus A genomes and the first case of pigeon rotavirus G in Europe" , opublikowany w czasopiśmie Transboundary and Emerging Diseases (Wiley), artykuł pt. „Characterization, phylogeny and prevalence of aviadenoviruses and siadenoviruses in young racing pigeons" , opublikowany w czasopiśmie Virology (Elsevier), artykuł pt. „Known and novel parvoviruses identified in domestic pigeons", opublikowany w czasopiśmie BMC Veterinary Research (BMC), oraz artykuł pt. „Coronaviruses in

prof. dr hab. Krzysztof Pyrć
Małopolskie Centrum Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków
e-mail: k.a.pyrc@uj.edu.pl
Tel.kom.: +48 692 696 863

diarrheic pigeons and the first determination of the complete genome of a new pigeon gammacoronavirus" opublikowany w czasopiśmie Scientific Reports (NPG). Integralną część rozprawy stanowi również zestaw oświadczeń współautorów. Należy podkreślić, że we wszystkich wymienionych pracach doktorantka występuje jako pierwsza autorka.

Część wstępna rozprawy obejmuje listę artykułów składających się na dysertację, wykaz skrótów, dwujęzyczne streszczenie, wstęp w języku polskim, sformułowaną hipotezę i cele badawcze, opis zastosowanej metodyki, prezentację wyników, dyskusję, wnioski, bibliografię oraz spis tabel i rycin.

Ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska opiera się na spójnym zestawie publikacji naukowych, skupiających się na zmienności genetycznej wirusów występujących w odchodach gołębi sportowych. Zgromadzone dane obejmują analizy genomowe próbek pobranych od ptaków z objawami chorób układu pokarmowego oraz osobników klinicznie zdrowych. Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną częstość występowania poszczególnych wirusów w obu grupach, a na podstawie uzyskanych wyników autorka wskazuje na możliwe korelacje pomiędzy obrazem klinicznym a obecnością określonych patogenów. Część opisowa w sposób przejrzysty i spójny przedstawia zarówno zastosowaną metodykę, uzyskane rezultaty, jak i dyskusję wraz z wnioskami. Kluczowym elementem rozprawy pozostają jednak załączone publikacje naukowe, które pozwolę sobie pokrótce omówić.

W pierwszej pracy autorka skoncentrowała się na częstości występowania oraz ewolucji wirusów z rodziny *Picornaviridae* u gołębi sportowych. Opisano przypadki rekombinacji megrivirusa B oraz gołębiego pikornawirusa B, których fragmenty genomu stanowiły odpowiednio 25,5% i 10,9% sekwencji referencyjnych. Analizy filogenetyczne wykazały, że zidentyfikowane wirusy są swoiste dla gołębi i nie wykazują bezpośredniego pokrewieństwa z wirusami drobiu. Badania ilościowe z zastosowaniem qPCR i ddPCR ujawniły częste występowanie obu wirusów zarówno u ptaków z objawami enteropatii, jak i u osobników bezobjawowych, przy czym u ptaków chorych obserwowano wyższe miano wirusa. Wyniki te sugerują, że rola opisanych patogenów w patogenezie biegunek u gołębi pozostaje niejednoznaczna.

Ograniczeniem pracy jest brak pełnych sekwencji genomowych, co utrudniło jednoznaczne przypisanie części izolatów do określonych gatunków oraz ograniczyło możliwości pogłębionej analizy filogenetycznej. Dodatkowo, choć wykazano różnice w poziomie replikacji wirusów między grupami, korelacje statystyczne ze stanem klinicznym były słabe lub nieistotne, co nie pozwala na jednoznaczne określenie ich roli chorobotwórczej. Niejasne pozostaje również, jakie inne czynniki mogły uczestniczyć w etiologii obserwowanych objawów.

W drugiej pracy autorka przedstawiła kompleksowe badania nad występowaniem astrowirusów u gołębi sportowych z objawami enteropatii oraz u osobników zdrowych, łącząc analizy ilościowe qPCR i ddPCR z charakterystyką genomową. Wyniki wykazały, że choć częstość występowania wirusów w obu grupach była podobna, u ptaków z objawami klinicznymi obserwowano wyższe miano wirusa, co autorka interpretuje jako potencjalny związek przyczynowo-skutkowy z chorobą. Sekwencjonowanie genomowe pozwoliło uzyskać dwa kompletne genomy astrowirusów, które wykazały wyraźną odrębność od dotychczas znanych gatunków i sugerują istnienie nowych jednostek taksonomicznych. Ograniczeniem pracy jest brak eksperymentalnego potwierdzenia patogenności opisanych wirusów. Ponadto obserwowane różnice w poziomie replikacji mogą mieć charakter jedynie korelacyjny i wynikać z innych czynników, takich jak obniżona odporność gospodarza czy indywidualne różnice w wydalaniu wirusa.

W trzeciej pracy autorka przedstawiła badania nad zakażeniami rotawirusami u gołębi. Przeprowadzone badania umożliwiły uzyskanie kompletnych sekwencji genomów rotawirusa A oraz pierwszą w Europie identyfikację rotawirusa G u tego gatunku. Analizy ilościowe z zastosowaniem qPCR i ddPCR wykazały istotnie wyższą częstość występowania oraz znacznie wyższe miano wirusa u ptaków z objawami klinicznymi w porównaniu z osobnikami bezobjawowymi, co silnie sugeruje związek zakażenia z występowaniem objawów chorobowych. Analiza filogenetyczna potwierdziła pokrewieństwo badanych szczepów z innymi rotawirusami izolowanymi od gołębi. Podobnie jak w poprzednich pracach, obserwacje mają jednak charakter korelacyjny, a w przypadku rotawirusa G - wykrytego jedynie u jednego ptaka - znaczenie kliniczne pozostaje ograniczone. Dodatkowo brak badań

histopatologicznych istotnie ogranicza możliwość pełniejszej interpretacji wyników. Niezależnie od tego, praca wprost, w warunkach polowych pokazuje korelację pomiędzy zakażeniem a chorobą, co jest niezwykle ważne z punktu widzenia chorób ptaków.

W czwartej pracy autorka zaprezentowała pełne sekwencje genomowe adenowirusów wyizolowanych z próbek pochodzących od gołębi, obejmujące dwa przypadki *Aviadenovirus columbidae* oraz jeden przypadek siadenowirusa, dla którego zaproponowano nowy gatunek *Siadenovirus columbae*. Analizy filogenetyczne wykazały, że aviadenowirusy są blisko spokrewnione z wcześniej opisanymi szczepami, natomiast siadenowirus okazał się genetycznie odmienny od znanych gatunków i najbliżej spokrewniony z wirusem wykrytym u alk zwyczajnych, co potwierdza dużą różnorodność ewolucyjną tej grupy. Badania ilościowe z zastosowaniem qPCR i ddPCR wykazały, że miano i częstość występowania adenowirusów były podobne u gołębi chorych i zdrowych, co sugeruje, że wirusy te nie stanowią samodzielnego czynnika etiologicznego enteropatii.

W piątej pracy autorka przedstawiła badania dotyczące występowania parwowirusów u gołębi w Europie i Ameryce Północnej (cztery próbki). Zastosowane metody ilościowe qPCR i ddPCR pozwoliły ocenić częstość zakażeń w populacjach ptaków zdrowych i z objawami enteropatii, jednak analiza ilościowa nie wykazała istotnych różnic między tymi grupami, a materiał wirusowy częściej wykrywano u osobników bezobjawowych. Równolegle uzyskano pełne sekwencje genomowe parwowirusów, w tym dwa izolaty z Polski oraz dwa ze Stanów Zjednoczonych, obejmujące sekwencję podobną do raportowanej wcześniej dla gatunku *Aveparvovirus columbid* oraz nowy wariant należący do rodzaju *Chaphamaparvovirus*. Wyniki te istotnie poszerzają dotychczasową wiedzę na temat różnorodności parwowirusów gołębi, przy czym warto podkreślić, że wszystkie dane genomowe pochodziły z próbek uzyskanych od ptaków klinicznie zdrowych.

W szóstej pracy autorka przedstawiła wyniki sekwencjonowania gammakoronawirusa wyizolowanego z próbki pochodzącej od gołębia, którego analiza potwierdziła typową organizację genomu oraz pokrewieństwo z innymi

izolatami pochodzącymi z Polski, Hiszpanii, Finlandii i Chin. Badania jakościowe i ilościowe wykazały obecność wirusa u 12,2% ptaków z objawami biegunki oraz u 11,1% osobników zdrowych, przy czym różnice te nie były statystycznie istotne; podobnie brak istotności stwierdzono w przypadku porównania miana wirusa między grupami. Wyniki te wskazują na brak jednoznacznej korelacji pomiędzy występowaniem objawów klinicznych a zakażeniem. Na podstawie danych genomowych autorka sugeruje, że analizowany izolat może stanowić nową jednostkę taksonomiczną w obrębie gammakoronawirusów.

Jak wspomniałem, zaprezentowane prace wnoszą wartość merytoryczną do dziedziny i są wartościowe; co więcej, opublikowano je w renomowanych czasopismach. Wszystkie prace bazują na warsztacie badawczym opierającym się na ilościowym PCR oraz sekwencjonowaniu. Chociaż gama zastosowanych technik nie jest imponująca, można jasno stwierdzić, że metody te zostały dobrze wybrane, opracowane i zastosowane, co pozwoliło osiągnąć zakładane efekty.

Chociaż bardzo pozytywnie oceniam przedstawioną pracę, zarówno jeżeli chodzi o wstęp, który dostarcza nam wprowadzenie do tematu, jak i same prace naukowe, mam kilka pytań dotyczących kwestii merytorycznych.

1. W swojej pracy autorka wykorzystała serwer BLAST jako metodą identyfikacji danych genomowych pochodzących od blisko spokrewnionych gatunków do badań filogenetycznych. Należy jednak podkreślić, że algorytm BLAST nie służy do kompleksowych analiz filogenetycznych, a jedynie do oceny podobieństwa sekwencji do danych dostępnych w bazie GenBank. Niestety, charakter tego algorytmu sprawia, że często pomija on konkretne dane lub sprawia, że inne są nadreprezentowane. Powstaje zatem pytanie, w jakim stopniu dane włączone do analizy rzeczywiście odzwierciedlały zróżnicowanie genetyczne poszczególnych rodzin. Standardowym podejściem w tego typu badaniach jest analiza sekwencji wszystkich dostępnych członków grupy spokrewnionej z badaną sekwencją i na tej podstawie określanie jej podobieństwa oraz unikalności. Choć autorka wspomina, że uzupełniała

dane z bazy GenBank na podstawie wyników analizy BLAST, nie jest jasne, jak wyglądały pełne zestawy danych i czy rzeczywiście były one kompletne. Bardzo proszę o krytyczną analizę tego tematu.

2. W pierwszej części pracy autorka prezentuje skład mieszanin reakcyjnych. Nieco niejasne jest dla mnie, z czego wynikają różnice stężenia mastermix w mieszaninie. W każdym przypadku w tabeli 2 mieszanina zawierała 10 μl odczynnika, jednak końcowa objętość mieszaniny w pkt. 1 i 3 to 18,2 μl a pkt. 2 to 20 μl. Co więcej mieszanina w tabeli 3 zawierała 11 μl odczynnika, a finalna objętość wynosiła 19,02 μl. Proszę o informację o powodach, dla których zdecydowano się na użycie odczynnika w różnych stężeniach.

3. W pracy wykorzystano analizę ilościową DNA w oparciu o ddPCR, co umożliwia ocenę liczby kopii kwasów nukleinowych bez konieczności stosowania krzywych standardowych. Jednakże, czy w przypadku wirusów RNA autorka przeprowadziła korektę ilości cDNA z uwzględnieniem ograniczonej wydajności reakcji odwrotnej transkrypcji?

4. Autorka przedstawia dane dla gołębi z jednego punktu czasowego, co wyklucza ocenę zmiany procesu w czasie. Biorąc uwagę sezonowość poszczególnych jednostek chorobowych oraz obecność kwasu nukleinowego po zakażeniu przed długi czas od powrotu do zdrowia, w szczególności w kale, czy przeprowadzone analizy pozwalają realnie określić lub wykluczyć zależność przyczynowo skutkową pomiędzy zakażeniem a objawami klinicznymi bez pełnej analizy eksperymentalnej?

5. Autorka w swojej pracy traktuje wszystkie patogeny należące do jednej rodziny jako pojedynczą jednostkę chorobotwórczą. Uwzględniając, jak duże różnice w patogenności występują pomiędzy bardzo blisko spokrewnionymi gatunkami a nawet izolatami, na ile przedstawione dane pozwalają na wysnuwanie wniosków dotyczących związku przyczynowo skutkowego pomiędzy zakażeniem oraz chorobą?

6. Czy dostępne są modele tkankowe lub komórkowe odwzorowujące układ pokarmowy ptaków, które mogłyby umożliwić analizę związku przyczynowego między zakażeniem a rozwojem choroby, bez konieczności korzystania ze zwierzętarni zakaźnej?

Ocena edytorska

Praca została napisana poprawnym językiem naukowym i w sposób przyjemny wprowadza czytelnika w zagadnienie. Grafiki zostały przygotowane w sposób profesjonalny i klarownie opisane. Konstrukcja pracy prawidłowa, bibliografia obszerna i aktualna. Jedyny zarzut, który mógłby się z mojej strony pojawić to brak szczegółowego wprowadzenia teoretycznego w polskiej wersji, jednak brak ten jest kompensowany poprzez treść zawartą w artykułach.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska lek. wet. Ewy Łukaszczuk stanowi wartościowy wkład w rozwój dyscypliny, a przeprowadzone badania są wysokiej jakości i mają charakter aplikacyjny. Autorka wykazała się zarówno kompetencjami eksperymentalnymi, jak i dobrą znajomością literatury naukowej.

Na podstawie przeprowadzonej oceny stwierdzam, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnioskuję o dopuszczenie lek. wet. Ewy Łukaszczuk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Z uwagi na jakość samych wyników, jak i dobry dorobek publikacyjny, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy.

Z wyrazami szacunku,

Signed by /
Podpisano przez:

Krzysztof Antoni
Pyrć

Date / Data:
2025-09-24 23:35

Krzysztof Pyrć