UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Prof. dr hab. Grzegorz Woźniakowski
Katedra Chorób Zakaźnych, Inwazyjnych
i Administracji Weterynaryjnej,
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 3-09-2025

Recenzja cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską lek. wet. Ewy Łukaszuk pt: „*Ocena zależności pomiędzy składem wiromu przewodu pokarmowego a występowaniem enteropatii u młodych gołębi sportowych*" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Stenzla.

Podstawę formalną wykonanej recenzji stanowi uchwała rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie z dnia 4 lipca 2025 roku na podstawie, której powołano mnie na recenzenta cyklu publikacji lekarz weterynarii Ewy Łukaszuk.

Gołębie domowe (*Columba livia*) są jednymi z najwcześniej udomowionych przez człowieka zwierząt. Zwierzęta te wykorzystywane są zarówno jako ptaki ozdobne, sportowe oraz mięsne. Hodowla gołębi stanowi często zainteresowania hobbystyczne hodowców z całego świata, co można stwierdzić na podstawie organizowanych licznych wystaw i targów międzynarodowych. Organizowane konkursy związane z wyścigami gołębi sportowych są powodem zainteresowania wielu hodowców gołębi a ptaki te często posiadają wysoką wartość. Jednocześnie choroby zakaźne gołębi mogą być niekiedy przyczyną utraty cennych osobników. Zakażenia wirusowe powodujące enteropatie u gołębi stanowią poważne wyzwanie dla lekarzy weterynarii, ponieważ bardzo często mieszana etiologia powoduje, że ciężko jest ustalić ostateczną przyczynę objawów chorobowych. Wirusy powodujące enteropatie u gołębi są jedynie częściowo poznane, natomiast z uwagi na częste występowanie zakażeń subklinicznych, ciężko jest określić ich jednoznaczną rolę. Dodatkowym ograniczeniem w spełnieniu triady Kocha, w przypadku wirusów powodujących enteropatie u gołębi jest brak możliwości ich namnażania w warunkach *in vitro*. Z tego względu podjęte przed Doktorantkę badania z użyciem narzędzi metagenomicznych, takich jak sekwencjonowanie Ilumina (Next

Generation Sequencing - NGS), czy też sekwencjonowanie nanoporowe a następnie projektowanie specyficznych reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR) z użyciem sond *Taqman*, czy też ilościowej metody ang. digital droplet PCR (ddPCR) wydaje się być najbardziej słusznym rozwiązaniem zmierzającym do wyjaśnienia jak dotąd niewyjaśnionych zagadnień związanych z enteropatiami u gołębi.

Cykl prac stanowi 6 publikacji naukowych umieszczonych w bazie Journal of Citation Reports (JCR). Współczynnik wpływu (ang. impact factor - IF) prac naukowych wynosił of 2,4 (*Virology*) do 4,2 (*Poultry Science*) oraz o punktacji od 100 do aż 200 pkt (*Transboundary and Emerging Diseases*) zgodnie z aktualną listą punktowanych czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW). Sumaryczny IF cyklu publikacji, wynosi 19,6 oraz 820 pkt. MNISW. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich pracach cyklu.

Pierwsza z prac cyklu opublikowana w *Viruses* (IF=3,5, 100 pkt. MNiSW) dotyczyła stwierdzenia rekombinowanych pikornawirusów u młodych gołębi sportowych. Pikornawirusy występują powszechnie u drobiu, jednakże dane dotyczące ich prewalencji oraz patogenności są ograniczone. Badania podjęte przez Doktorantkę dotyczyły określenia prewalencji megriwirusa B oraz pikornawirusa wirusa B oraz analizy filogenetycznej, ustalenia pokrewieństwa z innymi pikornawirusami ptaków, jak również ich możliwej roli w eneteropatiach u gołębi sportowych. Badania przeprowadzono przy użyciu sekwencjonowania nanoporowego i stwierdzono, iż pięć kompletnych sekwencji genomu pikornawirusów posiadało strukturę charakterystyczną dla poznanych megriwirusów, natomiast dwa pozostałe (PL_Pigeon_23/2023 i P_Pigeon_114/2023) należały do dotychczas niezaklasyfikowanych do rodzaju pikornawirusów gołębi typu B. Sekwencje te odpowiadały od 78,7 – 90,7% długości genomu wzorcowej (referencyjnej) sekwencji pikornawirusa gołębi B. Na licznych rycinach przedstawiono w sposób przejrzysty strukturę genomu pikornawirusów, drzewa filogenetyczne z histogramami podobieństwa genomowego, jak również miejsca rekombinacji genetycznej. Analiza rekombinacji wykazała, iż dwie sekwencje wirusów z rodzaju *Megrivirus* oraz jedna sekwencja wirusa spokrewnionego z pikornawirusem gołębi B są prawdopodobnie rekombinantami. Wszystkie „wstawki" rekombinacyjne były zlokalizowane w obrębie 5' końca ORF w przypadku megriwirusów oraz w połowie długości sekwencji ORF dla pikornawirusa B. Wstawki sekwencji stanowiły średnio 25,5% oraz 10,9% długości wzorcowych (referencyjnych) sekwencji z bazy danych GenBank. Dodatkowo badania przeprowadzone przy użyciu techniki *Taqman* qPCR dla pikornawirusa gołębi B oraz digital droplet PCR (ddPCR) dla pikornawirusa gołębi B oraz megriwirusa B wykazały

znacznie wyższą liczbę kopii genomu pikornawirusów u gołębi niewykazujących objawów klinicznych niż u ptaków z objawami enteropatii. Uzyskane wyniki analizy ilościowej pikornawirusów nie pozwalają na ustalenie jednoznacznej roli pikornawirusów w przebiegu enteropatii u gołębi. Praca dostarcza zupełnie nowych i nieznanych dotąd informacji dotyczących różnorodności genetycznej pikornawirusów ptaków, ich podatności na zjawiska rekombinacji oraz nadal ich nie do końca wyjaśnionej roli w enteropatiach gołębi. Druga z prac cyklu została opublikowana w renomowanym czasopiśmie drobiarskim *Poultry science* (IF=4,2, 140 pkt MNiSW). Praca dotyczyła analizy wstępowania astrowirusów u młodych gołębi sportowych oraz charakterystyki 2 nowych genomów reprezentujących dwa całkiem nowe gatunki. Astrowirusy mogą powodować choroby układu pokarmowego u ludzi i innych gatunków zwierząt włączając ptaki. W przypadku gołębi niewiele jest danych literaturowych dotyczących ich występowania oraz patogenności. Podjęte badania miały na celu określenie prewalencji astrowirusów w 2 grupach młodych gołębi sportowych: wykazujących objawy kliniczne oraz klinicznie zdrowych. Do badań wykorzystano wymazy kloakalne. Badania wykonano metodą *Taqman* qPCR oraz ddPCR. Dodatkowo użyto NGS w celu określenia podobieństwa genomowego astrowirusów do wariantów występujących u innych gatunków ptaków. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano 2 sekwencje genomowe o organizacji typowej dla innych przedstawicieli *Astroviridae*. Sekwencje te były najbliżej spokrewnione z innymi sekwencjami gołębi oraz kurcząt. Podobieństwo ich sekwencji nukleotydowej genomu wynosiło średnio 75,8% i 57,6% oraz 64,6% w przypadku białka kapsydu z innymi niesklasyfikowanymi astrowirusami w bazie danych GenBank. Co ważne, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w prewalencji astrowirusów pomiędzy grupą kontrolną oraz badaną, jednakże stwierdzono istotnie statystyczne różnice w liczbie kopii genomu. Może to wskazywać na zwiększone siewstwo wirusa u ptaków wykazujących objawy kliniczne ze względu na upośledzenie działania układu odpornościowego ptaków. Jednakże, nadal rola astrowirusów w przebiegu chorób układu pokarmowego gołębi pozostaje niewyjaśniona.

Kolejna, trzecia z prac dotyczyła wpływu rotawirusów gołębi jako czynników odpowiedzialnych za enteropatie. Pracę opublikowano w renomowanym czasopiśmie *Transboundary and Emerging Diseases* (IF=3,0, 200 pkt. MNiSW). Dotychczasowe badania wykazały wiodącą rolę rotawirusów w wirusowej chorobie młodych gołębi (YPD). Jak dotąd nie prowadzono jednak badań nad rotawirusami należącymi do innych grup, które mogą być przyczyną enteropatii. Badania zostały przeprowadzone przy użyciu sekwencjonowania nanoporowego. Dodatkowo przeprowadzono ilościową analizę kopii genomu rotawirusa A

metodą ddPCR. Doktorantka zidentyfikowała sekwencje 44 segmentów genomu 4 odrębnych wirusów z rodzaju *Rotavirus*. Trzy z sekwencji genomu wykazywało największe podobieństwo do gatunku *Rotavirus alphagastroenteritidis* (rotawirusa A), natomiast jedna do sekwencji wirusów z gatunku *Rotawirus gammagastroenteritidis* czyli rotawirusa G. Prewalencja rotawirusa gołębi A wynosiła 37,8% w grupie badanej gołębi, wskazując na jego wiodącą rolę w występowaniu enteropatii. Ponadto wyniki te potwierdza przeprowadzona analiza ilościowa liczby kopii genomu metodami *Taqman* qPCR oraz ddPCR. Przeprowadzone testy statystyczne wykazały istotnie statystycznie różnice w prewalencji p=0,0001 i liczbie kopii materiału genetycznego p=0,0050 pomiędzy grupą badaną oraz kontrolną. Stwierdzenie rotawirusa G u gołębi w Polsce jest pierwszym tego typu przypadkiem poza Azją (Hong-Kong, Chiny i Tajlandia), co potwierdza wysoką innowacyjność oraz przydatność uzyskanych przez Doktorantkę danych z punktu widzenia poznania najważniejszych czynników wirusowych odpowiedzialnych za enteropatie u gołębi.

Czwarta z prac cyklu dotyczyła charakterystyki, analizy filogenetycznej oraz prewalencji aviadenowirusów i siadenowirusów u młodych gołębi sportowych. Pracę opublikowano w czasopiśmie *Virology* (IF=2,4, 100 pkt MNiSW). Adenowirusy stanowią poważny problem w hodowli gołębi. Pomimo, wielu badań związanych z adenowirusami, trwających od ponad pół wieku, nadal niewiele jest dostępnych kompletnych sekwencji genomowych tych wirusów. Badania podjęte przez Doktorantkę przy użyciu techniki NGS oraz ilościowej analizie liczby kopii genomu przy użyciu metod *Taqman* PCR i ddPCR pozwoliły na uzyskanie, nowych przełomowych w tym zakresie wyników badań. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano 3 sekwencje genomowe adenowirusów, z których 2 posiadały budowę typową dla rodzaju *Aviadenovirus*, natomiast trzecia wykazywała największe podobieństwo sekwencji nukleotydowej do wirusów z rodzaju *Siadenovirus*. Ponadto uzyskane wyniki badań analizy ilościowej wykazały, iż adenowirusy gołębi typu 2 występują zarówno u gołębi wykazujących objawy kliniczne, jak również zdrowych. Wskazuje to, że nie można jednoznacznie stwierdzić wiodącej roli adenowirusów jako czynnika wywołującego enteropatie u gołębi.

Przedostatnia, piąta praca cyklu dotyczyła badań nad parwowirusami występującymi u gołębi. Pracę opublikowano w czasopiśmie *BMC Veterinary Research* (IF=2,6, 140 pkt. MNiSW). Parwowirusy stanowią zróżnicowaną grupę DNA-wirusów, występujących zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców, powodując choroby wieloukładowe z przewagą zakażeń i schorzeń układu pokarmowego. W przypadku drobiu parwowirusy mogą być przyczyną biegunek, jak również wywoływać zakażenia subkliniczne. Dotychczasowe dane dotyczące

prewalencji oraz patogenezy zakażeń parwowirusami u gołębi były ograniczone. Przeprowadzone badania z użyciem NGS, oraz *Taqman* PCR i ddPCR pozwoliły na określenie roli parwowirusów w przebiegu enteropatii u gołębi. Doktorantka zidentyfikowała 2 kompletne sekwencje genomu parwowirusów gołębi pochodzących z Polski i 2 genomy z terenu Stanów Zjednoczonych Ameryki (USA). Jeden z uzyskanych genomów parwowirusa krajowego (PL_pigeon_11a/2023) oraz jeden z USA (K18.2.AV/2021) posiadały strukturę zbliżoną do przedstawicieli gatunku *Aveparvovirus columbid 1*, podczas gdy genom parwowirusa PL_pigeon_15a/2023 prawdopodobnie reprezentował nowy gatunek parwowirusa. Czwarty genom parwowirusa amerykańskiego USA_pigeon_K18.1.AV/2021 był zbliżony do izolatu PLK23 parwowirusa zidentyfikowanego na terenie Tajlandii i reprezentował rodzaj *Chaphamaparvovirus* w obrębie podrodziny *Hamaparvovirinae*. Z kolei wyniki badań analiz ilościowych metodami *Taqman* PCR i ddPCR nie wykazały, aby parwowirusy odgrywały wiodącą rolę w enteropatiach u gołębi.

Ostania, ale nie mniej istotna praca cyklu dotyczyła roli koronawirusów w przebiegu enteropatii u gołębi oraz otrzymaniu pierwszej kompletnej sekwencji genomu nowego gammakoronawirusa. Pracę opublikowano w czasopiśmie *Scientific Reports* (IF=3,9, 140 pkt. MNiSW). Wirusy należące do podrodziny *Orthocoronavirinae* są powszechnymi czynnikami patogennymi występującymi u drobiu. Dotychczasowa wiedza dotycząca ich różnorodności oraz patogenności dla gołębi była jak dotąd słabo poznana. Doktorantka po raz pierwszy przeprowadziła określenie kompletnej sekwencji genomowej przedstawiciela *Gammmacoronavirus* u gołębi, reprezentującego nowy gatunek koronawirusa w obrębie podrodzaju *Igacovirus*. Otrzymana sekwencja genomowa wydaje się być blisko spokrewniona z innymi gammakoronawirusami gołębi pochodzącymi z Polski, Hiszpanii, Finlandii i Chin, świadcząc o szerokim rozpowszechnieniu geograficznym tych wirusów. Wyniki analizy ilościowej liczby genomu koronawirusa pomiędzy grupą badaną a kontrolną nie wykazały istotnie statystycznie różnicy. Badania przeprowadzone łącznie z użyciem 153 wymazów kloakalnych od gołębi sugerują, że obecność koronawirusów nie odgrywa wiodącej roli w enteropatiach u gołębi.

Oceniany przeze mnie cykl publikacji lek. wet. Ewy Łukaszuk stanowi oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej. Cykl prac ma bardzo duży wkład w zrozumienie etiologii zakażeń wirusowych mających wiodący wpływ w występowanie enteropatii u młodych gołębi sportowych. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne a uzyskane wyniki bardzo wiarygodne i wyczerpujące. Na uwagę zasługuje wykrycie nowych gatunków wirusów oraz zjawisk

rekombinacji genetycznej pomiędzy nimi. Przedstawiona cykl prac ukazuje również bardzo dobrze opanowany warsztat badawczy Doktorantki w zakresie diagnostyki oraz analiz molekularnych i bioinformatycznych w odniesieniu do wirusów patogennych dla ptaków. **Wniosek końcowy.** Stwierdzam, że cykl prac stanowiących rozprawę doktorską lek. wet. Ewy Łukaszuk spełnia wymagania określone w art. 187 ust 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2024 poz. 1571), wobec czego wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do publicznej obrony.

Zwracam się również z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie o nagrodzenie cyklu prac stosowną nagrodą. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią bardzo duży wkład merytoryczny do aktualnego stanu wiedzy związanego z szeroko rozumianą kolumbopatologią. Przedłożony cykl prac stanowiących rozprawę wyróżnia się nie tylko na arenie krajowej, ale również międzynarodowej w obszarze medycyny weterynaryjnej oraz użytych technik metagenomiki.

Prof. dr hab. Grzegorz Jan Woźniakowski