

Prof. dr hab. Olga Szeleszczuk  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Koffątaja w Krakowie  
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt  
Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pana mgr inż. Marka Kowalczyka  
pt. „**Polimorfizm molekularny wirusa choroby aleuckiej w populacji norki amerykańskiej  
(*Neovison vison*) oraz w jej środowisku hodowlanym w Polsce**”

wykonanej w Katedrze Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Nauk o  
Zwierzętach i Biogospodarki Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Jakubczaka, prof. uczelni Uniwersytetu Przyrodniczego w  
Lublinie  
oraz promotora pomocniczego dr Beaty Horeckiej Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzję przygotowano na zlecenie Pani prof. dr hab. Brygidy Ślaska, Przewodniczącej Rady  
Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 7 lutego  
2020r.

W recenzji, jako kryteria oceny, przyjęto przepisy Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach  
naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz.  
1789 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z  
dnia 30 października 2015 r. w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.- przepisy  
wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2017 r. poz.1842 ze  
zmianami w Dz. U. z 22 marca 2019 r. poz. 534).

### 1. Ogólna charakterystyka pracy

Rozprawę doktorską stanowi cykl 7 publikacji opublikowanych w latach 2015-2019. Są to  
następujące pozycje:

1. **Kowalczyk M.**, Jakubczak A. 2015. Możliwość wykorzystania technik biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek, *Wiadomości Zootechniczne*, 53(3), 70-77
2. Jakubczak A., **Kowalczyk M.**, Kostro K., Horecka B., Jeżewska-Witkowska G. 2016. High molecular polymorphism of the hypervariable region in the VP2 gene of Aleutian mink disease virus. *Acta Virologica*, 60(4), 354-360, doi: 10.4149/av\_2016\_04\_354
3. Jakubczak A., **Kowalczyk M.**, Kostro K., Jeżewska-Witkowska G. 2017. Comparative molecular analysis of strains of the Aleutian Disease Virus isolated from farmed and wild mink. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24 (3), 366-371, doi: 10.26444/aaem/75688

4. **Kowalczyk M.**, Jakubczak A., Horecka B., Kostro K. 2018. A comparative molecular characterization of AMDV strains isolated from cases of clinical and subclinical infection. *Virus Genes*, 54(4), 561-569, doi.org/10.1007/s11262-018-1576-x
5. **Kowalczyk M.**, Jakubczak A., Gryzińska M. 2019. Duplex PCR for detection of Aleutian Disease Virus from biological and environmental samples. *Acta Veterinaria–Beograd*, 69 (4), 402-413, doi: 10.2478/acve-2019-0034
6. **Kowalczyk M.**, Horecka B., Jakubczak A. 2019. Aleutian Mink Disease Virus in the breeding environment in Poland and its place in the global epidemiology of AMDV, *Virus Research*, 270, 197665, doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197665
7. **Kowalczyk M.**, Gąsiorek B., Kostro K., Borzym E., Jakubczak A. 2019. Breeding parameters on a mink farm infected with the AMD virus following the use of methisoprinol, *Archives of Virology*, 164 (11), 2691-2698, doi.org/10.1007/s00705-019-04375-x

Wszystkie te publikacje spełniają kryterium Art. 13.2. Ustawy, czyli warunku włączenia do zbioru artykułów spójnych tematycznie.

Liczba publikacji i ranga naukowa wszystkich czasopism naukowych, w których opublikowano prace, jest imponująca. Suma punktów za przedstawiony cykl według aktualnych list MNiSW wynosi 251 pkt., a sumaryczny IF - 9,058. 6 prac opublikowano w czasopismach z listy A o IF powyżej 2: *Virus Research* IF`2018 = 2,736 oraz *Archives of Virology* IF`2018 = 2,261). Dwie kolejne prace opublikowano w czasopismach o IF powyżej 1: *Virus Genes* 2018 = 1,616 *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* IF`2017 = 1,116.

Znając stosunek „Editorial Office” do prac wykonanych na fermowych *Canidae* czy *Mustelidae* wyżej wymienione publikacje musiały reprezentować bardzo wysoki poziom i równie wysoką wartość naukową.

Na podkreślenie, zdaniem Recenzenta, zasługuje też dołączenie do cyklu wysoko punktowanych czasopism, publikacji w naszym popularno-naukowym branżowym zootechnicznym czasopiśmie *Wiadomości Zootechniczne*, dostępnym dla praktyków i hodowców norek.

Warto też podkreślić, że w pięciu pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a Jego wkład w poszczególnych pozycjach wahał się od 37 do 80%: średni udział Doktoranta został wyceniony na 55%.

Przedstawiona do oceny praca jest napisana starannie, strona graficzna i edytorska nie budzą większych zastrzeżeń. Układ redakcyjny pracy jest klasyczny, zgodny z przyjętymi dla tego typu opracowań z podziałem na odpowiednie rozdziały. Praca obejmuje łącznie 40 stron znormalizowanego wydruku komputerowego i 38 pozycji literaturowych. Wyniki badań przedstawione w formie opisowej, natomiast w załączonych pracach, stanowiących podstawę

ocenianej rozprawy doktorskiej, można zapoznać się z ich zestawieniem tabelarycznym i graficznym. Dodatkowo zamieszczono w pracy streszczenia w języku polskim i angielskim.

## **2. Ocena oryginalności tematu badań**

Przedstawiony do oceny cykl publikacji dotyczy rozwoju wiedzy na temat diagnostyki i epizootologii choroby aleuckiej (plazmocytozę) na polskich fermach nerek. Choroba aleucka została po raz pierwszy opisana w latach 50 przez dr Gordona i wsp. na fermach amerykańskich u odmiany aleuckiej nerek. W Polsce w latach osiemdziesiątych rozpoczęto diagnostyka choroby aleuckiej nerek nieswoistymi testami tymolowym i jodowym. Trzeba było bardzo długo czekać na swoistą, specyficzną i czułą metodę z wykorzystaniem technik molekularnych. Bowiem, co też podkreśla Doktorant, cyt. „Wykrycie wirusowego materiału genetycznego w badanych tkankach jednoznacznie wskazuje na infekcję, podczas gdy pojawienie się przeciwciał przeciw wirusowi, może oznaczać bezobjawowy kontakt z patogenem. Metody serologiczne są dodatkowo ograniczone przez okienko serologiczne, tj. okres, który mija od zakażenia do pojawienia się przeciwciał, podczas którego zwierzę może zakażać inne osobniki, samemu dając wynik ujemny w testach serologicznych. Wreszcie, metody serologiczne często nie uwzględniają analizy stanu sanitarnego środowiska, które również może być rezerwuarem wirusa”.

***Tytuł pracy znajduje odbicie w celu i treści pracy. Jednoznacznie określa podjętą problematykę badawczą, a spójny tematycznie cykl publikacji przedstawiono w kolejności opisywanej w pracy.***

Wstęp stanowi przegląd doniesień naukowych oraz zwięzły opis tematyki dotyczącej etiologii, patogenezы oraz obrazu klinicznego choroby aleuckiej u nerek. Ze szczególną uwagą Doktorant odniósł się do diagnostyki molekularnej wirusa tej choroby. W odróżnieniu do klasycznych metod diagnostycznych metody molekularne pozwalają na wczesną i czułą „detekcję” patogenu nie tylko w próbkach pobranych od zwierząt, ale również ze środowiska ferm czy tzw. „mediów” związanych z chowem zwierząt futerkowych.

Do najbardziej oryginalnych aspektów dysertacji doktorskiej zaliczam wielokierunkowość badań molekularnej diagnostyki obejmujących populację fermową nerek i środowisko hodowlane oraz porównawcze badania z wykorzystaniem metodą powszechnie stosowanych w praktyce fermowej czyli CIEP czy ELISA.

Wartościowym elementem rozprawy jest również próba immunostymulacji nerek fermowych. W przebiegu AMD określanej również jako plazmocytoza dochodzi do hypergammaglobulinemii oraz depozycji kompleksów antygen – przeciwciało w tkankach, czego efektem są między innymi *glomerulonephritis*.

***W podsumowaniu kryterium stwierdzam, że tematyka dysertacji doktorskiej jest oryginalna i wyjątkowo aktualna, czego dowodem jest opublikowanie wszystkich wyników w czasopiśmie z listy JRC o bardzo wysokim IF.***

### **3. Ocena umiejętności sformułowania problemu badawczego oraz sposobu jego rozwiązania**

Na podstawie zamieszczonych w publikacjach uzasadnienia celów podjętych prac cząstkowych oraz dokonanej we wstępie przeglądu badań nad wirusem i diagnostyką choroby aleuckiej, Doktorant określił następujące tezy dysertacji doktorskiej:

- ☒ Wirus AMD może być obecny nie tylko w organizmach zwierząt, ale także w środowisku hodowlanym zakażonych ferm, które może stanowić rezerwuuar wirusa.
- ☒ Zasilanie polskiej hodowli nerek, zwierzętami z różnych źródeł mogło spowodować wysokie zróżnicowanie molekularne wirusa w populacji hodowlanej.
- ☒ Puła wirusa AMD w Polsce składa się zarówno z wariantów endemicznych, jak i wariantów biorących udział w globalnym krążeniu patogenu.
- ☒ Zmienność molekularna wirusa może wpływać na obraz kliniczny choroby.
- ☒ Immunostymulacja może poprawić parametry hodowlane na fermie trwale zakażonej AMDV.

W celu rozwiązania tych hipotez wskazał 6 celów szczegółowych:

1. Optymalizacja metod opartych na reakcji PCR, duplex PCR i qPCR pozwalających na detekcję materiału genetycznego wirusa AMD w próbach biologicznych i środowiskowych oraz jego późniejszą charakterystykę molekularną.
2. Ocena częstości występowania AMDV na polskich fermach oraz określenie ładunku wirusowego w tkankach i środowisku hodowlanym norki amerykańskiej.
3. Analiza epidemiologii molekularnej patogenu na badanych fermach oraz określenie relacji polskich izolatów z zasobami baz bioinformatycznych w oparciu o polimorfizm w sekwencji kodującej białko NS1.
4. Charakterystyka molekularna wirusa na fermach, na których choroba przyjmuje przebieg kliniczny i subkliniczny.
5. Ocena czułości i specyficzności metody duplex PCR, jako techniki ograniczającej występowanie wyników fałszywie ujemnych.
6. Zbadanie wpływu preparatu immunostymulującego – methisoprinolu na parametry hodowlane na fermie trwale zakażonej wirusem AMD.

*Uważam, że wszystkie cele są spójne z przedstawionymi problemami badawczymi, świadczą też, że Doktorant posiada solidne przygotowanie do najnowszych technik molekularnych. Realizacja tak sformułowanych celów szczegółowych wymagała od Doktoranta wielu godzin spędzonych w laboratoriach. Nie chciałabym przypominać całych procedur analiz*

*molekularnych, rozpoczynające się od pozyskiwania materiału badawczego kończąc na analizie bioinformatycznej.*

Doktorant wraz z zespołem rozpoczął swoje doświadczenie od badań pilotażowych – od monitoringu AMDV na dwóch fermach leżących od siebie na dwóch krańcach Polski. Wyniki tych wstępnych badań potwierdziły obecność wirusa, co chyba nie wywołało zdziwienia zespołu badawczego, ale pozwoliło już na ukierunkowanie dalszych szczegółowych celów badawczych.

***Uważam, że zastosowane procedury postępowania są poprawnie metodycznie a wykorzystane najnowsze i aktualne metody badawcze adekwatne do zaplanowanych zadań badawczych.***

Uzyskane przez Doktoranta wyniki badań stały się podstawą do poprawnie sformułowania 7 szczegółowych wniosków, które odpowiadają na postawione zadania badawcze. Doktorant wykazał, że na polskich fermach występuje duże zróżnicowanie wirusa AMD. Przyczyna tego zróżnicowania wynika z bioróżnorodności ogniska epizootycznego. Efektem jego badań było wykazanie, że jest możliwe zmniejszenie, strat ponoszonych przez hodowcę na skutek choroby aleuckiej. W skali 1000 lub 5 000 samic stada podstawowego to bardzo istotne wzrost opłacalności niszowej obecnie hodowli.

#### **4. Pozostałe uwagi do rozprawy**

Praca napisana poprawnym językiem oraz jest odpowiednio udokumentowana, Z obowiązku recenzenta chcę jednak zwrócić uwagę na kilka niedociągnięć redakcyjnych oraz uproszczeń merytorycznych czyli tzw. skrótów myślowych.

str. 12

- Co Doktorant rozumie pod pojęciem „zamykanie dróg krążenia wirusa ...” mam nadzieję, że dobrze zrozumiałam, że chodzi o przerwanie łańcucha epidemiologicznego/epizootycznego

- Proszę o wyjaśnienie pojęcia „skala epidemiologii wirusa AMD”

Str. 16

Proszę o wyjaśnienie użytego przez Doktoranta określenia „infekcja postępująca”

Str. 17

Okrutnie brzmi słowo „padnięcia” zwłaszcza w aktualnej nagonce na zakaz hodowli norki czy lisów. Powszechnie stosuje się – upadki

**5. Podsumowanie oceny pracy i wniosek końcowy** Powyższe uwagi w większości mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają one mojej pozytywnej opinii o wysokiej wartości merytorycznej przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. Problematyka, którą zajmuje się

w swojej dysertacji mgr inż. Marek Kowalczyk, jest przede wszystkim istotna pod względem naukowym i praktycznym. Jest również zgodna z aktualnymi kierunkami badań w zakresie ochrony zdrowia zwierząt. Tego typu kompleksowe badania są innowacyjne i wnoszą istotny wkład naukowy oraz praktyczny w obszarze diagnostyki i zwalczania choroby aleuckiej. Włączenie metod molekularnych oraz opartych o analizy bioinformatyczne badań epidemiologii molekularnych do diagnostyki AMD pozwoli na eliminację wirusa nie tylko z ferm ale i z otaczającego środowiska. Pozwala jednocześnie na monitorowanie skuteczności prowadzonych zabiegów dezynfekcyjnych, co jest szczególnie istotne przy braku możliwości stosowania szczepień ochronnych i możliwości leczenia przyczynowego a nawet objawowego. Takie interdyscyplinarne i utylitarne podejście uważam za najważniejsze osiągnięcie Doktoranta. Uwzględniając jednocześnie dorobek publikacyjny mgr inż. Marka Kowalczyka **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przedłożonej mi do recenzji.**

Pod względem merytorycznym pracę oceniam bardzo dobrze. Dysertacja napisana jest językiem poprawnym, typowym dla rozpraw o charakterze naukowym. Wspomniane wcześniej błędy językowe czy niefortunne sformułowania mają wyłącznie charakter redakcyjny i nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Wskazanie w recenzji drobnych redakcyjnych uchybień powinno pozwolić Doktorantowi uniknąć podobnych błędów w dalszej pracy publikacyjnej.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą doktorską mgr Marka Kowalczyka stwierdzam, że spełnia ona wymogi formalne stawiane tego typu opracowaniom zgodnie z przepisami Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r. w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.- przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2017 r. poz.1842 ze zmianami w Dz. U. z 22 marca 2019 r. poz. 534.

***W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr Marka Kowalczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.***



Prof. dr hab. Olga Szeleszczuk

Kraków, 21 luty 2020