

Dr hab. Agnieszka Marek profesor uczelni
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 01.12.2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Lek. wet. Joanny Turniak
zatytułowanej „Epidemiologia zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w
stadach kur w Polsce w latach 2010-2019” wykonanej w Instytucie Medycyny Weterynaryjnej
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
pod kierunkiem Promotorów prof. dr hab. Piotra Szeleszczuka oraz dr hab. Beaty Dolki**

Podstawą formalną recenzji jest uchwała nr 58/WET-2024/2025 Rady Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 24 września 2025 r. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została zrealizowana w Katedrze Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Piotra Szeleszczuka. Promotorem pomocniczym pracy była dr hab. Beata Dolka.

Rozprawę doktorską Pani lek. wet. Joanny Turniak stanowi, według załączonej dokumentacji, starannie przygotowana monografia naukowa licząca łącznie 165 ponumerowanych stron wydruku. Składa się z 9 głównych rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Założenia i cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Omówienie wyników i dyskusja, Wnioski, Załącznik, Piśmiennictwo, Spis tabel i rycin. W dokumentacji znajdują się również streszczenia w j. polskim i angielskim oraz oświadczenia Promotora i Autora rozprawy. W skład w/w rozdziałów głównych wchodzi podrozdziały. Taki podział na rozdziały i podrozdziały jest typowy dla tego typu opracowań naukowych.

Znaczenie podjętej tematyki

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja jest monografią naukową charakteryzującą problematykę występowania zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków należącym do gatunku *Avihepevirus magniiecur* (aHEV), z rodziny *Hepeviridae* i rodzaju *Avihepevirus* w stadach drobiu gatunku kura (*Gallus gallus domesticus*) w Polsce w latach 2010 – 2019. Dotychczas opisano różne objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne wywoływane przez avian Hepatitis E Virus zarówno w stadach reprodukcyjnych kur jak również u niosek jaj konsumpcyjnych w różnych rejonach świata. Analiza obserwowanych zmian patologicznych w zakażonych stadach pozwoliła na wyodrębnienie kilku zespołów chorobowych, jak choroba dużej wątroby i śledziony -BLS (big liver and spleen disease), zespół martwicowo-krwotocznego



zapalenia wątroby i powiększenia śledziony - HSS (hepatitis –splenomegaly syndrome), oraz zespół krwotoczny z pęknięciem wątroby -HRHS (hepatic rupture hemorrhage syndrome). Pomimo, że chorobę w innym rejonie świata (Australia) rozpoznano już w 1980 roku to w Polsce pierwsze (niepotwierdzone) przypadki syndromu BLS były obserwowane przez praktykujących lekarzy w 2007 roku. W 2011 roku pierwsze doniesienie naukowe dotyczące przypadku klinicznego BLS w Polsce przedstawił profesor Piotr Szeleszczuk. Choroba w postaci klinicznej może się pojawiać u ptaków w każdym wieku i chociaż zachorowalność i upadki spowodowane zakażeniem avian Hepatitis E Virus są relatywnie niskie to zarówno w zakażonych stadach rodzicielskich brojlerów kurzych jak i w stadach niosek jaj konsumpcyjnych obserwowano znaczne spadki w produkcji nieśnej (nawet do 45%). Zakażenia subkliniczne są również dość powszechne w terenie. Co więcej, potwierdzono, że wirus może szerzyć się drogą pionową, przez co długo utrzymuje się w kurnikach. Stwierdzono także, że może dochodzić do transmisji międzygatunkowej wirusa aHEV i chociaż do tej pory nie stwierdzono ryzyka transmisji wirusa z drobiu na człowieka, to istnieją już potwierdzone przypadki zakażenia indyków szczepami pochodzącymi od kur. Mimo upływu kilkudziesięciu lat od odkrycia czynnika etiologicznego BLS, choroba nadal powszechnie występuje i stanowi przyczynę znaczących strat ekonomicznych w stadach kur. Zastosowanie tylko diagnostyki serologicznej nie jest wiarygodne w wykrywaniu ostrych zakażeń aHEV, gdyż wiremia i siewstwo wirusa z kałem następuje znacznie wcześniej niż pojawienie się przeciwciał. Zatem seronegatywne ptaki mogą być zakażone. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, że za pomocą badań serologicznych nie można różnicować HEV pochodzących od ptaków, ludzi i świń, gdyż dochodzi do reakcji krzyżowych pomiędzy białkami ich kapsydów. Do wykrywania materiału genetycznego wirusa stosuje się techniki biologii molekularnej, np. RT-PCR.

W świetle przedstawionych faktów istnieje potrzeba dokładniejszego rozpoznania problemu a przede wszystkim opracowania schematów diagnostycznych i oceny zagrożeń epidemiologicznych. W tym kontekście, przedstawiona mi do recenzji dysertacja Pani lek. wet. Joanny Turniak, której celem była nie tylko ocena seroprewalencji, epidemiologia molekularna zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w wybranych stadach rodzicielskich kurcząt rzeźnych oraz stadach niosek towarowych w Polsce, ale również ocena przydatności różnych rodzajów próbek oraz różnych technik w diagnostyce molekularnej BLS, stanowi ważne osiągnięcie naukowe o dużym potencjale aplikacyjnym.

Streszczenie

Streszczenie zwięzłe, ale logicznie rekapitułuje całość rozprawy doktorskiej oraz uzasadnia celowość prowadzenia badań nad występowaniem zakażenia aHEV w stadach drobiu gatunku kura (*Gallus gallus domesticus*) w Polsce. Doktorantka scharakteryzowała cel pracy, badany materiał, zastosowane metody oraz uzyskane wyniki. Chciałabym jednak zwrócić uwagę na fragment streszczenia dotyczący prezentacji uzyskanych wyników, w którym Doktorantka wskazuje, że częściej wykrywano wirusa aHEV



w pęcherzyku żółciowym niż w wątrobie, śledzionie i żółci. Określenie „w pęcherzyku żółciowym” wydaje się tutaj dość nieprecyzyjne, skoro w opisie zgromadzonego materiału do badań (podrozdział 1.2) można przeczytać, że oddzielne próbki stanowiła żółć i ściana pęcherzyka żółciowego. W związku z tym w moim przekonaniu należałoby doprecyzować, czy chodzi o ścianę pęcherzyka żółciowego czy o cały narząd.

Wstęp

Podzielony na 12 podrozdziałów wstęp prezentuje najważniejsze informacje obejmujące zarówno rys historyczny zakażeń aHEV w stadach drobiu na świecie, synonimy używane na określenie infekcji ptasim wirusem zapalenia wątroby typu E na przestrzeni lat, jak również taksonomię rodziny *Hepeviridae* z uwzględnieniem genotypów aHEV oraz nowo odkrytych jeszcze nieprzypisanych gatunków wirusa. Na podstawie danych piśmiennictwa, Doktorantka stworzyła rycinę ilustrującą podział dotychczas opisanych izolatów aHEV. W kolejnych podrozdziałach, Doktorantka dokładnie scharakteryzowała budowę genomu wirusa zapalenia wątroby typu E, epidemiologię, patogenezę zakażeń u drobiu oraz diagnostykę molekularną i serologiczną aHEV. W tabeli nr 3, na podstawie analizowanej literatury, Doktorantka przedstawiła zestawianie sekwencji starterów stosowanych w celu wykrycia materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków. Nie zabrakło też rozdziałów, w których Doktorantka wyszczególniła dotychczas obserwowane objawy kliniczne, zmiany anatomo- i histopatologiczne w przebiegu zapalenia wątroby typu E u kur. Ostatni podrozdział wstępu dotyczy metod profilaktyki zapalenia wątroby typu E u kur i zawiera najnowsze dane na temat opracowanej przez chińskich naukowców w oparciu o białko ORF3 wirusa, szczepionki podjednostkowej, która skutecznie redukuje siewstwo zarazka z kałem. Taki układ wstępu świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki, opartym na dogłębnym studiowaniu dotychczas zgromadzonych danych w dostępnej literaturze naukowej.

Geneza i cel rozprawy doktorskiej

Pani lek. wet. Joanna Turniak podjęła się przeprowadzenia badania dotyczącego istotnego z punktu widzenia klinicznego zagadnienia z obszaru zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w wybranych krajowych stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnej, nieśnej, niosek jaj konsumpcyjnych (w latach 2010 – 2018) i jednodniowych brojlerów kurzych (w latach 2010, 2014, 2019). Wybór obszaru badań wydaje się szczególnie aktualny wobec faktu, że w czasie, w którym pobierano ze stad próbki do badań nie było żadnych danych na temat zakażeń aHEV w naszym kraju. Natomiast badania nad oceną seroprewalencji i analizą obecności materiału genetycznego aHEV w stadach reprodukcyjnych brojlerów i kur niosek na terenie zachodniej i południowej Polski w latach 2015-2018 prowadził zespół naukowców z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Ponadto, Doktorantka po raz pierwszy podjęła próbę analizy korelacji między badaniami serologicznymi a molekularnymi w diagnostyce zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków.



Zakładane przez Doktorantkę cele pracy dotyczyły:

- w punkcie pierwszym, oceny seroprewalencji oraz analizy zależności między seroprewalencją a efektywnością produkcji (EWW) w badanych stadach brojlerów kurzych z uwzględnieniem podziału na regiony w Polsce.
- w punkcie drugim, epidemiologii molekularnej zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w wybranych stadach rodzicielskich kurcząt rzeźnych oraz stadach niosek towarowych w Polsce w latach 2011 – 2019.
- w punkcie trzecim, oceny przydatności różnych rodzajów próbek oraz różnych technik w diagnostyce molekularnej BLS.
- oraz w punkcie czwartym, charakterystyki zmienności genetycznej krajowych izolatów wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) uzyskanych w latach 2011 – 2019.

Material

Do osiągnięcia założonego celu badań, Doktorantka wykorzystała do badania serologicznego (testem ELISA wykrywającym przeciwciała skierowane przeciwko aHEV), próbki krwi od 23 losowo wybranych ptaków z 230 stad kur w różnym wieku, w tym od 222 stad rodzicielskich brojlerów kurzych - BB co stanowiło 96,52% wszystkich pobranych próbek; od 2 stad rodzicielskich niosek - LB, które stanowiły 0,87% wszystkich pobranych próbek oraz z 6 stad niosek jaj konsumpcyjnych CL, które stanowiły 2,61% wszystkich pobranych próbek krwi. W tabeli nr 5, Doktorantka przedstawiła zestawienie zbiorcze próbek pobranych w latach 2010 – 2018, z uwzględnieniem roku pobrania, typu produkcyjnego i wieku ptaków, liczby stad i ilości pobranych próbek. Łącznie Doktorantka zgromadziła 5 272 próbki krwi. Słusznie doktorantka użyła sformułowania: „*standardowo pobierano 23 próbki krwi*” ponieważ jak wynika z zestawienia ilości surowic w tabeli 5, nie w każdym z badanych stad pobrano 23 próbki krwi lub nie zawsze możliwe było uzyskanie 23 próbek surowic z pobranych próbek krwi. W tym zestawieniu brakuje informacji na temat lokalizacji ferm, z których pobierano próbki w poszczególnych latach. Doktorantka wskazała, że były to stada „*z różnych obszarów Polski*”.

Materiał do oceny dynamiki specyficznej odpowiedzi serologicznej (serokonwersji), stanowiły próbki krwi pobrane pięciokrotnie w odstępach 5 do 7 tygodni od ptaków z dwóch kurników w jednej fermie, w której zdiagnozowano ognisko BLS w 2011 roku (tabela nr 6). Tutaj również brakuje informacji na temat lokalizacji fermy.

Materiał do monitoringowych badań seroepidemiologicznych (ocena częstości występowania przeciwciał matczynych przeciwko zapaleniu wątroby typu E), stanowiły próbki krwi pobrane z 92 stad jednodniowych piskląt brojlerów kurzych w latach 2010, 2014 i 2019. Doktorantka w tabelach nr 6 i 7 wyszczególniła liczbę stad, datę i ilość pobranych próbek, ale również lokalizację tych stad (województwo). Wydaje się, że w przyszłości, przygotowując materiały do publikacji wskazane byłoby

ujednolicenie sposobu prezentacji zgromadzonego materiału.

Materiał do badań metodami reakcja łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) oraz Real-Time RT-PCR stanowiły pobrane ze świeżych zwłok ptaków w latach 2011 – 2019, próbki narządów wewnętrznych z 45 stad rodzicielskich brojlerów kurzych oraz 3 stad niosek jaj konsumpcyjnych. Z zestawienia w tabeli nr 8, wynika, że Doktorantka pobrała 156 próbek żółci, 166 próbek śledziony, 172 próbki wątroby oraz 22 próbki pęcherzyka żółciowego. Próbki poszczególnych narządów były pulowane w obrębie stada. Tutaj również brakuje informacji o lokalizacji stad, z których pobierano próbki. Próbki wątroby oraz pęcherzyka żółciowego pobierano również od zarodków kurzych (SPF), zakażonych eksperymentalnie zawiesiną tkanek pobranych ze stada BB, w którym stwierdzono materiał genetyczny wirusa BLS. W tabeli nr 9, Doktorantka wyszczególniła materiał użyty do inokulacji zarodków.

Ponadto w 2012 roku, Doktorantka pobrała wymazy z kloaki oraz tchawicy od 7 żywych ptaków ze stada rodzicielskiego brojlerów kurzych (BB), w zdiagnozowanym ognisku BLS. Brakuje informacji na temat lokalizacji stada.

Metody

Doktorantka szczegółowo opisała testy, procedury, wzory (współczynnik serokonwersji; Europejski Współczynnik Wydajności), oraz sprzęt użyte w badaniach serologicznych. W celu określenia zależności między różnymi parametrami serologicznymi, Doktorantka w przemyślny sposób podzieliła zebrany w latach 2010 -2018 materiał do badań serologicznych na 4 grupy wiekowe oznaczone jako odchów-ptaki w wieku do 24 tygodnia życia; wczesny okres nieśności - od 25 do 34 tygodnia życia, środkowy okres nieśności - od 35 do 49 tygodnia życia i końcowy okres nieśności - powyżej 50 tygodnia życia. Do celów analizy statystycznej wyników ELISA dla anty-aHEV, próbki pobrane ze stad brojlerów kurzych Doktorantka podzieliła na 5 regionów polski (północno-zachodni, północno-wschodni, centralny, południowo-wschodni i południowo-zachodni), zależnie od lokalizacji badanych stad.

Podobnie, szczegółowo Doktorantka opisała zastosowane procedury, testy, odczynniki oraz aparaturę użytą do przygotowania próbek, ekstrakcji RNA, przygotowania mieszaniny i reakcji odwrotnej transkrypcji, RT-PCR dla genu kodującego helikazę (fragment ORF1), oraz genu kodującego białko kapsydu (ORF2). W tabeli nr 11, Doktorantka wyszczególniła dobrane na podstawie analizowanej literatury sekwencje nukleotydowe użytych par starterów z zaznaczoną własną modyfikacją oraz warunki amplifikacji genu kodującego helikazę. Doktorantka szczegółowo opisała również przygotowanie standardów, mieszaniny reakcyjnej oraz warunki amplifikacji jakościowej reakcji Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu (ORF2). Produkty reakcji RT-PCR oraz Real Time RT-PCR, które uzyskały wyniki pozytywne (dla fragmentu genu kodującego helikazę i białko kapsydu) zostały poddane sekwencjonowaniu przez Genomed S.A., Warszawa, Polska. Zastosowane metody należą do najbardziej czułych i zdolnych do



wykrywania niewielkich ilości cząsteczek RNA w próbce. Dzięki RT-PCR możliwe jest określenie ilości cząsteczek RNA między różnymi próbkami, określenie poziomu ekspresji oraz analizy struktury RNA PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). Oznaczanie próbek Real-Time PCR wykonuje się w oparciu o analizę względną - jednocześnie z próbą referencyjną, a następnie do niej odnosi wyniki. Doktorantka jako kontrolę pozytywną użyła RNA wirusa pozyskane z antygeny z dostępnego komercyjnego testu AGID (Big Liver & Spleen disease). Uzyskane wyniki Doktorantka analizowała z wykorzystaniem metod statystycznych: Tukeya (HSD), jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), współczynnika korelacji Pearsona, współczynnika korelacji rang Spearmana, współczynnika kappa Cohena, testu chi-kwadrat Pearsona w programie Statistica 13.

Wyniki

Rezultatem przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz są przedstawione w różnych ujęciach, wartościowe, dobrze udokumentowane tabelami, wykresami i rycinami wyniki badań.

W przejrzystym opisie wyników badań serologicznych oraz w tabelach nr 12 - 15, Doktorantka podaje procentowy udział wyników dodatnich (na obecność przeciwciał przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu E ptaków), w poszczególnych rodzajach stad z uwzględnieniem grup wiekowych ptaków, oraz liczbowe i procentowe dane odnośnie analizowanych próbek surowic (średnie, minimalne i maksymalne wartości mian, średnie miana geometryczne oraz współczynniki zmienności). Doktorantka wykazała, że we wszystkich badanych stadach niosek towarowych (CL) i aż w 83,33% stadach rodzicielskich brojlerów kurzych (BB), stwierdzono przeciwciała anti-aHEV. Natomiast nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami wiekowymi ptaków w obrębie stad BB oraz zbiorczo w stadach BB, LB i CL. W tabeli nr 51 znajdującej się w rozdziale VII. Zatytułowanym: Załącznik, Doktorantka zamieściła również „surowe dane” dotyczące wartości dla poszczególnych stad z przeprowadzonych badań serologicznych ELISA. Wyniki badań wykonane w dwóch stadach BB fermy monitorowanej w 2011 roku, które Doktorantka prezentuje w tabeli nr 16 oraz na rycinie nr 9, potwierdziły serokonwersję a tym samym obecność i rozwój zakażenia. Analiza próbek pochodzących od jednodniowych piskląt brojlerów kurzych wykazała, że aż w 54,35% badanych stadach Doktorantka uzyskuje wyniki pozytywne w kierunku obecności przeciwciał przeciwko aHEV. W tabelach nr 17 - 22, Doktorantka przedstawiła zbiorcze wyniki ELISA z liczbą i procentem stad oraz surowic pozytywnych jak również dane produkcyjne (EWW), z uwzględnieniem podziału według województw, regionów i czasu pobrania próbek do badań. W ostatnim podrozdziale (1.4) wyników monitoringu serologicznego, Doktorantka zaprezentowała wyniki badań przeprowadzonych w wybranych stadach rodzicielskich w różnym wieku oraz w stadach broilerów pochodzących z tych stad rodzicielskich, z których wynika, że we wszystkich stadach BB otrzymano wyniki pozytywne w kierunku obecności przeciwciał przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu E ptaków, natomiast w 2/6 stadach CB, Doktorantka otrzymała wyniki



pozytywne u ptaków w 1 dnia życia.

Dość nieprecyzyjnie sformułowane wydaje się zdanie w podrozdziale 1.1 na stronie 57: „*Spośród zbadanych 230 stad BB, LB i CL w Polsce, w latach 2010-2018 łącznie w 96,96% uzyskano wyniki pozytywne w kierunku aHEV*” W tym zdaniu należałoby jasno zaznaczyć, że chodzi o obecność przeciwciał przeciwko wirusowi aHEV (anty-aHEV). Podobna uwaga dotyczy nagłówka i treści podrozdziału 1.4. na stronie nr. 65: „*Zestawienie wyników badań ELISA w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków...*”, „*We wszystkich stadach BB otrzymano wyniki pozytywne w kierunku zapalenia wątroby typu E ptaków...*”

W tabelach 24-26 oraz na rycinie nr 10, Doktorantka przedstawiła wyniki badań molekularnych dla genu kodującego helikazę wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w tkankach oraz żółci w wybranych stadach rodzicielskich kurcząt rzeźnych i stadach niosek towarowych w Polsce w latach 2011 – 2019. W opisie uzyskanych wyników Doktorantka wskazuje, że największy odsetek (33,33%), wyników pozytywnych uzyskała w próbkach ze ściany pęcherzyka żółciowego, a następnie żółci (29,54%), śledziony (18,18%) oraz wątroby (15,28%). W wymienionych tabelach, Doktorantka w sposób zbiorczy oraz szczegółowy zaprezentowała wyniki z uwzględnieniem roku pobrania próbek, typu produkcyjnego ptaków, wieku ptaków, ilości stad oraz rodzaju i ilości próbek, z których uzyskała wyniki pozytywne. Na podstawie analizy statystycznej, Doktorantka stwierdziła istotne statystycznie zróżnicowanie w poszczególnych latach pod względem odsetka pozytywnych wyników, jednak bez istotnego statystycznie trendu w kolejnych latach ani trendu zależnego od wieku ptaków. Podobnie, w tabelach 27-29 oraz na rycinie nr 11, Doktorantka zaprezentowała wyniki RT-PCR w celu wykrycia genu kodującego białko kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w próbkach pobranych z 45 stad BB i 3 stad CL. Wyniki pozytywne zostały potwierdzone w 30,07% badanych stad. Natomiast najwyższy odsetek próbek pozytywnych (66,67%) Doktorantka uzyskała ze ściany pęcherzyka żółciowego, a następnie z wątroby (34,78%), żółci (29,54%) oraz śledziony (18,18%). Na podstawie analizy statystycznej, Doktorantka stwierdziła istotne statystycznie zróżnicowanie w poszczególnych latach pod względem odsetka pozytywnych wyników w RT-PCR z istotnym, ujemnym trendem w kolejnych latach, ale bez istotnego statystycznie trendu zależnego od wieku ptaków. Wyniki Real-Time RT-PCR w celu wykrycia genu kodującego białko kapsydu, Doktorantka zgromadziła w tabelach 30-32 oraz na rycinie nr 12. Spośród przebadanych próbek pochodzących od 45 stad BB i 3 CL w 32,87% Doktorantka uzyskała wyniki pozytywne a najwyższy odsetek pozytywnych wyników uzyskała w próbkach ze ściany pęcherzyka żółciowego (66,67%), następnie wątroby (34,78%), żółci (34,09%) oraz śledziony (22,73%). Choć w tabelach nr 24, 27, 30, 42, 43 i 44, Doktorantka wskazuje, że pozytywne próbki uzyskała z pęcherzyka żółciowego a nie ze ściany pęcherzyka żółciowego. Na podstawie analizy statystycznej Doktorantka stwierdziła istotne statystycznie zróżnicowanie w poszczególnych latach pod względem odsetka



pozytywnych wyników w RT-PCR z istotnym, ujemnym trendem w kolejnych latach, ale bez istotnego statystycznie trendu zależnego od wieku ptaków.

Wyniki obecności genu kodującego białko kapsydu, uzyskane przez Doktorantkę w obu badaniach RT-PCR oraz Real-Time PCR były zgodne w 93,01%, a wyliczony współczynnik kappa Cohena wyniósł 0,838 co oznacza bardzo dobrą zgodność obu metod. Natomiast analiza zgodności metody RT-PCR w badaniu obecności genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu wykazała 74,83% zgodności, co po wyliczeniu współczynnika kappa Cohena wyniosło 0,350 i świadczy o słabej zgodności metod. W nagłówku na stronie 76 oraz w nagłówku w podrozdziale 2.5 (strona 79), Doktorantka używa sformułowania: „Ocena zgodności metod RT-PCR w badaniu obecności genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu. Ponieważ jest to jedna metoda użyta do badania obecności dwóch różnych genów to proponuje korektę z: *ocena zgodności metod...* na *ocena zgodności metody....*

Z 18 próbek pochodzących od 9 zarodków badanych w kierunku genu kodującego helikazę (przy użyciu RT-PCR), oraz białka kapsydu (przy użyciu RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR), w 2/18 (11,11%) próbkach Doktorantka otrzymała wyniki pozytywne jedynie dla genu kodującego białko kapsydu aHEV przy wykorzystaniu Real-Time RT-PCR. W tym badaniu nie było możliwe określenie zgodności między metodami badania, gdyż Doktorantka nie uzyskała wyników pozytywnych przy wykorzystaniu metody RT-PCR. Natomiast zgodność wyników badania w kierunku obecności genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu przy użyciu RT-PCR, wobec braku wyników pozytywnych wynosiła 100%. Zestawienie uzyskanych wyników Doktorantka zaprezentowała w mało intuicyjny sposób w tabelach nr 36 i 37. W przyszłości, przygotowując wyniki do publikacji proponuję również korektę nagłówka tabeli nr 37. Zamiast „Zestawienie wyników pozytywnych otrzymanych metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę...” wobec braku wyników pozytywnych proponuję „Zestawieni wyników otrzymanych metodą RT-PCR dla genu kodującego helikazę...”

W badaniu próbek wymazów z kloaki i tchawicy pochodzących z 2012 roku ze stada BB z ogniska BLS przy użyciu RT-PCR, Doktorantka wykazała w 2/14 (14,28%) próbek pozytywnych kierunku genu kodującego helikazę aHEV i 1/14 (7,14%) próbkę pozytywną w kierunku genu kodującego białko kapsydu aHEV. W obu badaniach Doktorantka stwierdziła 11 zgodnych wyników co stanowi 78,57%. Natomiast współczynnik kappa Cohena wyniósł - 0,105, co odpowiada za brak zgodności.

Współczynnik zgodności (kappa Cohena) metod RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w całości badanego materiału wyniósł 0,818, co odpowiada za bardzo dobrą zgodność. Natomiast współczynnik zgodności (kappa Cohena), metody RT-PCR stosowanej w celu wykrycia genu kodującego helikazę oraz genu kodującego białko kapsydu w całości badanego materiału wyniósł 0,354, co odpowiada za słabą zgodność.

W podrozdziale 2.6 prezentowanych wyników, Doktorantka przy użyciu testu statystycznego (chi-kwadrat



Pearsona), wykazała statystycznie istotne zależności pomiędzy rodzajem badanej tkanki, a odsetkiem wyników pozytywnych w kierunku wykrycia genu kodującego helikazę (przy użyciu metody RT-PCR) oraz genu kodującego białko kapsydu wirusa (przy użyciu metod RT-PCR oraz Real-Time RT-PCR).

Doktorantka przeprowadziła również analizę filogenetyczną na podstawie własnych sekwencji nukleotydów kodujących helikazę (fragment ORF1) aHEV oraz izolatów zdeponowanych w GenBank, która wykazała przynależność otrzymanych sekwencji do trzech znanych genotypów: genotyp 1 (11 uzyskanych sekwencji), genotyp 3 (11 sekwencji), genotyp 2 (6 sekwencji), natomiast 2 sekwencje nie przynależały do żadnego z czterech znanych genotypów i zostały przez Doktorantkę przypisane do domniemanego nowego genotypu (Rycina nr 14).

W załączniku (rozdział VII) w Tabelach 53 – 55, Doktorantka zgromadziła nieprzetworzone wyniki pierwotne, zebrane bezpośrednio za pomocą narzędzi badawczych, zanim poddano je analizie i obróbce.

Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza korelacji między wynikami pozytywnymi badań serologicznych i molekularnych RT-PCR dla genu kodującego helikazę oraz białko kapsydu i Real-Time RT-PCR dla genu kodującego białko kapsydu w stadach BB i CL w kilku przypadkach wykazała statystycznie istotną zależność.

Na szczególne uznanie zasługuje skrupulatność Doktorantki w analizowaniu tak dużej ilości zgromadzonych danych (wyników), w różnych ujęciach, jak również umiejętność wykorzystania metod statystycznych, przydatnych w procesie weryfikacji zakładanych hipotez badawczych.

Omówienie wyników i dyskusja

W tej części pracy, Doktorantka zestawia i analizuje wyniki swoich badań z danymi dostępnymi w literaturze naukowej. W mojej ocenie dobrze wywiązując się z tego zadania. Rozdział jest podzielony na logiczne części i każdy z aspektów badanych wyników omawiany jest w sposób możliwie najlepiej wyczerpujący temat. Doktorantka (na podstawie obszernie zebranej literatury), odnosi wartości uzyskanych wyników badań serologicznych w stadach BB, LB i CL uwzględniając wiek ptaków, oceny specyficznej serokonwersji w ognisku BLS oraz analizy transmisji przeciwciał anty-aHEV ze stad BB do pochodzących od nich stad piskląt CB, do danych z różnych rejonów świata oraz z Polski zebranych w zbliżonym okresie czasowym i wykonanych za pomocą takich samych metod badawczych. Podobnie, szczegółowo omówione zostały przez Doktorantkę wyniki badań molekularnych dla genów kodujących białko kapsydu i helikazy w stadach BB i CL, zarówno w czasie i pod względem wieku ptaków oraz z uwzględnieniem rodzaju badanych próbek. W przypadku trendów obecnych w literaturze o innym charakterze niż zaobserwowane w badaniu, Doktorantka podaje możliwe przyczyny rozbieżności. W tym rozdziale moje uwagi dotyczą wspomnianej już wcześniej, konieczności ujednolicenia w nazewnictwie próbek pozytywnych pod względem obecności genów aHEV. W podrozdziale 1.2.1 Materiał i metody, Doktorantka wskazuje, że pobierano próbki ściany pęcherzyka żółciowego i żółci, natomiast na stronie 97 i



98 omówienia wyników i dyskusji wskazuje, że w pozytywnych próbkach, helikazę lub wyniki dodatnie dla kapsydu wykrywano w żółci i w pęcherzyku żółciowym. Mam również uwagę dotyczącą wniosków sformułowanych przez Doktorantkę w tym rozdziale rozprawy. Na przykład na stronie nr. 92 w części „Ocena występowania zakażeń aHEV (BLS) w badaniach serologicznych w stadach BB, LB i CL”, akapit zaczynający się zdaniem: „Uzyskane rezultaty badań serologicznych pozwalają na wysnucie wniosku, że...” lub na stronie 97, drugi akapit, zdanie: „Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że wirus pozostaje dłużej w ścianie pęcherzyka żółciowego i dlatego jest większa szansa na jego wykrycie w tej próbce”. Wnioski w rozprawie doktorskiej powinny stanowić kluczową, odrębną część podsumowującą całą pracę, zazwyczaj przedstawianą w oddzielnym rozdziale pracy doktorskiej, w której doktorant przedstawia swoje odkrycia, rozwijając wcześniejszą dyskusję naukową.

Wnioski

Prezentując wnioski z wykonanych badań, Doktorantka skupiła na czterech aspektach przedstawionych w formie wylistowanych punktów. Dotyczą one:

1. Badań serologicznych, które wykazały bardzo powszechne (96,96%) występowanie zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków w stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnej, nieśnej oraz niosek jaj konsumpcyjnych w Polsce w latach 2010 – 2018. Przy czym najwyższa seroprewalencja występowała w stadach niosek jaj konsumpcyjnych, natomiast najwięcej osobników serododatnich odnotowano w stadach reprodukcyjnych kur linii mięsnej. Kury powyżej 35 tygodnia życia były częściej seropozytywne. Badania serologiczne jednodniowych brojlerów kurzych w latach 2010, 2014 oraz 2019, potwierdziły powszechne (54,35%) występowanie zakażeń aHEV w stadach rodzicielskich. Obecność przeciwciał matczynych nie wpływała na efektywność produkcji (EWW), niezależnie od badanego regionu kraju.
2. Badań molekularnych, które wykazały powszechne (60,42%) występowanie zakażeń aHEV w stadach rodzicielskich kurcząt rzeźnych oraz stadach niosek towarowych w Polsce w latach 2011 – 2019. Obecność materiału genetycznego wirusa częściej wykrywano w stadach rodzicielskich kur linii mięsnej. Liczba stad zakażonych obniżała się istotnie w kolejnych badanych latach względem obecności genu kodującego białko kapsydu aHEV.
3. Oceny przydatności próbek do badania obecności materiału genetycznego wirusa aHEV za pomocą technik biologii molekularnej, w którym Doktorantka wskazuje, że ściana pęcherzyka żółciowego stanowi najbardziej miarodajny rodzaj próbki oraz, że najwłaściwsze jest badanie w kierunku detekcji dwóch genów, zarówno genu kodującego helikazę jak i genu kodującego białko kapsydu.
4. Analizy filogenetycznej wirusów aHEV uzyskanych w Polsce w latach 2011 – 2019, która wykazała szeroką zmienność genetyczną w oparciu o sekwencje genu helikazy (genotypy 1, 2, 3 oraz tzw. domniemany nowy genotyp) oraz kapsydu (genotyp 2 i 3).



Tworzenie wniosków z badań jest kluczowym etapem każdej pracy naukowej. To właśnie w tym fragmencie dokumentu zawarte są najważniejsze konkluzje, wyniki oraz refleksje badacza. Wnioski powinny być jasne, zwięzłe oraz wyróżniać kluczowe obserwacje, które wskazują na odpowiedzi na postawione wcześniej pytania badawcze. Mając na uwadze powyższe stwierdzenie, sugeruję skrócenie wniosku numer 1, który jest zbyt rozbudowany, i w którym Doktorantka zawarła zbyt dużo danych. Ponadto w oparciu o fragment zawarty w pierwszym akapicie, na stronie 99 omówienia wyników: „Według najlepszej wiedzy, w pracy własnej po raz pierwszy potwierdzono obecność materiału genetycznego aHEV w wymazach z tchawicy u kur, co wskazuje na możliwość siewstwa i transmisji wirusa wraz z wydzieliną z dróg oddechowych. Dotychczas tylko po zakażeniu eksperymentalnym 60 tyg. kur SPF wirus reizolowano z płuc (16, 20, 56 dpi) [13]. Otrzymane wyniki własne wskazują, że wirus może szerzyć się również drogą kropelkową, dotychczas droga ta nie była opisywana w epidemiologii zakażenia aHEV”, sugeruję również uzupełnienie tego rozdziału rozprawy o stosowny wniosek.

Piśmiennictwo

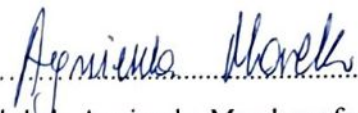
Należy podkreślić, iż znaczna liczba cytowanych pozycji pochodzi z okresu, w którym Doktorantka pozyskiwała próbki do badań i obejmuje aktualną wiedzę na temat badawczy. Ilość cytowanej literatury wskazuje na niezwykle zaangażowanie naukowe Pani lek. wet. Joanny Turniak w badanym temacie i czyni ją specjalistką w tym obszarze wiedzy, co zasługuje na podkreślenie i uznanie.

Podsumowanie

Na zakończenie chciałabym serdecznie pogratulować Doktorantce wyboru tematu oraz jakości przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników. Zarówno badania serologiczne jak i molekularne przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej udowodniły, że problem zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków występuje powszechnie w stadach kur utrzymywanych w gospodarstwach komercyjnych w Polsce. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wykonane przez Doktorantkę badania nad BLS są pierwszymi przeprowadzonymi na tak szeroką skalę w naszym kraju. Z tego punktu widzenia uważam za bardzo wartościowy wkład tej pracy w obszar naukowy zajmujący się występowaniem, diagnostyką zakażeń oraz patogennością wirusa zapalenia wątroby typu E ptaków w komercyjnych stadach kur. Moje powyższe uwagi do poszczególnych rozdziałów pracy wynikają przede wszystkim z obowiązku recenzenta, nie mają natomiast na celu umniejszenia jakości dysertacji, a szczególnie jej wysokiej wartości merytorycznej. Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy a tematyka przedłożonej mi do oceny Jej dysertacji doktorskiej stanowi istotny wkład w rozwój nauki. Rozprawa doktorska Pani lek. wet. Joanny Turniak zatytułowana „Epidemiologia zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E ptaków (aHEV) w stadach kur w Polsce w latach 2010-2019” spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (jt. Dz. U. 2024 r. poz. 1571 ze zm.) i zawiera obszerny



material o dużej wartości naukowej. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie lek. wet. Joanny Turniak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.


.....
dr hab. Agnieszka Marek profesor uczelni



T PRZYRODNICZY W LUBLINIE
Medycyny Weterynaryjnej
Kliniki Weterynaryjnej
Chorób Ptaków
Lublin, ul. Głęboka 30
45-60-43, 81-445-60-80

DD: 24164

R

(00)659007734484694822



Poczta Polska

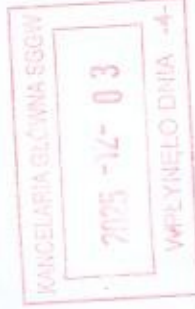
Oplata pobrana _____ zł _____ gr

2024



OPŁATA POBRANA
TAXE PERÇUE - POLOGNE
Umowa z Poczta Polska S.A.
ID nr 569650/L

POLECONY
Potwierdzenie odbioru
PRIORITARIE



Instytut Medycyny Weterynaryjnej- Sekretariat
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa



RPL/34946/2025 N
Data: 2025-12-03