

Olsztyn, 12.11.2015 r.

dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj, prof. UWM

Katedra Epizootiologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

w Olsztynie

OCENA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Krzysztofa Kwita**

pt. „**Patogeneza zakażenia próchnych loszek wirusem grypy świń**”

wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Iwony Markowskiej-Daniel

w Zakładzie Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu

Badawczego. Promotorem pomocniczym jest

Pani dr hab. Małgorzata Pomorska-Mól, prof. nadzw.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 4 listopada 2015 r. powołujące się na uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 24. 04. 2013 r.

Jednym z poważniejszych problemów w chowie każdego gatunku zwierząt są zaburzenia rozrodu. W hodowli wielkostadnej świń prawidłowa reprodukcja zwierząt determinuje opłacalność hodowli. Wśród przyczyn zaburzeń rozrodu świń na pierwszym miejscu zwykle wymieniane są czynniki wirusowe. Niektóre z nich, jak np. parwowirus świń (PPV) czy wirus zespołu rozrodczo-oddechowego (PRRS) mają szczególne powinowactwo do układu rozrodczego, inne, jak cirkowirus (CPV2), wirus klasycznego pomoru świń (CSFV), wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (EMCV), czy wirus choroby Aujeszkiego (ADV) wykazują predylekcję do innych układów, w tym również do układu rozrodczego.

Zaburzenia w przebiegu ciąży u wielu gatunków zwierząt oraz u ludzi zaobserwowano również w przypadkach zakażeń wirusem grypy. Mechanizmy patogenetyczne odpowiedzialne za ten proces nie zostały dokładnie poznane. U świń influenza jest jednostką chorobową z reguły wymienianą jako jedna z przyczyn zaburzeń rozrodu, chociaż wirus grypy (SIV) wykazuje predylekcję do komórek nabłonkowych układu oddechowego, z której wynika większość objawów. Jednakże niejednokrotnie opisywane były ronienia lub rodzenie martwych prosiąt w stadach, w których wystąpiła grypa świń. Wiadomo też, że liczne warianty genetyczne poszczególnych podtypów SIV mogą różnić się od siebie nie tylko zjadliwością, lecz również tropizmem do poszczególnych układów

w zakażonym organizmie, niewykluczone, że również do układu rozrodczego. Wyniki dotychczasowych badań są niejednoznaczne i nie wyjaśniają dokładnie wpływu zakażenia SIV na przebieg ciąży w poszczególnych jej etapach. Dlatego też podjęcie przez lek. wet. Krzysztofa Kwita badań mających na celu zbadanie w jakim stopniu SIV odgrywa rolę w zaburzeniach rozrodu świń i jakie mechanizmy rządzą tym procesem jest w pełni uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór czterech publikacji poprzedzony zwięzłym opracowaniem przeprowadzonych badań. Opracowanie liczy 34 strony i składa się z 8 rozdziałów, takich jak Wstęp, Cele i zakres pracy, Metody badań i oceniane parametry, Omówienie głównych wyników badań, Wnioski, Streszczenia w językach polskim i angielskim oraz Piśmiennictwo. Na końcu pracy zamieszczono publikacje stanowiące rozprawę doktorską.

We wstępie, poprzedzonym wykazem publikacji stanowiących rozprawę doktorską oraz wykazem stosowanych w opracowaniu skrótów, Doktorant szczegółowo opisał przyczyny zaburzeń rozrodu świń, na które składają się czynniki wirusowe, bakteryjne oraz niezakaźne. Następnie odniósł się do wyników badań prowadzonych w kraju i na świecie oraz do wcześniejszych badań własnych i dokonał analizy opisanych w literaturze przypadków klinicznych dotyczących zaburzeń rozrodu świń związanych z zakażeniem SIV. Wstęp dowodzi dobrej znajomości badanej problematyki i piśmiennictwa, stanowi też uzasadnienie podjętych badań.

Cele pracy zostały jasno sformułowane w trzech punktach i obejmowały: ustalenie w warunkach eksperymentalnych, czy SIV powoduje zaburzenia w rozrodzie, poznanie mechanizmu zakażenia poprzez wykonanie wielokierunkowych badań laboratoryjnych oraz analizę swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej oraz odpowiedzi ostrej fazy po eksperymentalnym zakażeniu loszek SIV.

Przedstawiony zakres badań obejmował przeprowadzenie serii zakażeń ciężarnych loszek, z uwzględnieniem określenia wpływu drogi podania, okresu prośności w czasie zakażenia eksperymentalnego, dawki wirusa oraz jego podtypu na ewentualne wystąpienie zaburzeń w rozrodzie oraz wybrane parametry produkcyjne.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Metody badań i oceniane parametry” zostały wyszczególnione zastosowane w przeprowadzonych doświadczeniach metody badawcze z krótką charakterystyką celu ich wykorzystania. Na uznanie zasługuje zastosowanie, oprócz badań klinicznych, również metody real time PCR do ilościowej oceny występowania SIV w wymazach z nosa zakażonych loch, łożysku i płucach prosiąt. Przedstawiono też parametry oceny wyników rozrodu, takie jak czas trwania ciąży, liczba żywo i martwo urodzonych prosiąt w miocie, liczba płodów zмумifikowanych, masy ciała miotu i liczba prosiąt padłych w pierwszym tygodniu życia.

W osobnych podrozdziałach przedstawiony został układ doświadczeń i zastosowane metody analizy statystycznej.

Rozdział zatytułowany „Omówienie głównych wyników badań” zawiera skondensowane opisy przebiegu i wyników doświadczeń będących tematem trzech prac oryginalnych wchodzących w skład przedstawionej pracy doktorskiej. Uzyskane przez Doktoranta rezultaty są ciekawe i wnoszą nowe wartości do obecnego stanu wiedzy na temat przebiegu zakażenia prośnych loszek SIV.

Następnie Doktorant przedstawił 3 wnioski dowodzące osiągnięcia założonych celów. Moim zdaniem wniosek pierwszy jest trochę za daleko idący. Na podstawie uzyskanych przez Doktoranta wyników nie można stwierdzić, że tylko inne terenowe czynniki są odpowiedzialne za zaburzenia rozrodu u świń, ponieważ innych czynników nie badano.

Ostatni rozdział zatytułowany „Piśmiennictwo zawarte we wstępie pracy oraz w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską” zawiera 133 pozycje odpowiednio dobrane, głównie anglojęzycznego piśmiennictwa, wskazującego na umiejętność wyboru materiałów źródłowych koniecznych do analizy i dyskusji uzyskanych wyników. Na końcu rozprawy umieszczono kopie czterech spójnych tematycznie prac, w tym trzech prac oryginalnych i jednej przeglądowej, opublikowanych w czasopismach znajdujących się na liście czasopism punktowanych przez MNiSW, takich jak: Medycyna Weterynaryjna, BMC Veterinary Research, Archives of Virology, których Impact Factor mieści się między 0,203 a 2, 39. Uzyskany sumaryczny IF wynosi 4,671, a liczba punktów w/g MNiSW - 90.. Prace zostały opublikowane w latach 2013-2015:

I. Prace oryginalne:

1. Kwit K., Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I.: Przebieg ciąży u loszek zakażonych donosowo w I miesiącu ciąży szczepem H1N2 wirusa grypy świń. Medycyna Weterynaryjna 2013, **10**, 641.

(15 pkt. MNiSW; IF 0,203)

2. Kwit K., Pomorska-Mol M., Markowska-Daniel I.: The influence of experimental infection of gilts with swine H1N2 influenza A virus during the second month of gestation on the course of pregnancy, reproduction parameters and clinical status. BMC Veterinary Research 2014, **10**, 123.

(40 pkt. MNiSW; IF 1,86)

3. Kwit K., Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I.: Pregnancy outcome and clinical status of gilts following experimental infection by H1N2, H3N2 and H1N1pdm09 influenza A viruses during the last month of gestation. Arch. Virol. 2015, **160** (10), 2415.

(20 pkt. MNiSW; IF 2,39)

II. Praca przeglądowa

1. Kwit K., Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I.: Czynniki zakaźne powodujące zaburzenia w rozrodzie świń. Medycyna Weterynaryjna. Praca przyjęta do druku, 2016

W pracach oryginalnych zostały zawarte szczegółowe opisy doświadczeń wraz z wynikami i dyskusją. Tematyka tych prac jest spójna i dotyczy wpływu zakażenia SIV na przebieg ciąży svin w poszczególnych jej fazach. Artykuł przeglądowy natomiast stanowi zwarte opracowanie etiologii zaburzeń w rozrodzie svin.

We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, co zasługuje na uznanie i nie pozostawia wątpliwości o jego głównym wkładzie w powstawaniu wymienionych prac, o czym dodatkowo świadczą załączone oświadczenia współautorów.

Reasumując, przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi wartościowy materiał będący uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy na temat mechanizmów patogenetycznych przebiegających podczas zakażenia SIV u ciężarnych loszek. Ważnym wnioskiem jest wykazanie braku wewnątrzmacicznej transmisji SIV do płodów, niezależnie od drogi zakażenia i fazy ciąży, w której to zakażenie nastąpiło oraz podtypu wirusa. Przedstawione w opracowaniu badania dostarczyły interesujących i wartościowych wyników poznawczych i aplikacyjnych, tym samym stanowią szczególny wkład lek. wet. Krzysztofa Kwita w rozwój nauk weterynaryjnych i zasługują na wysoką ocenę.

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak, że autor nie ustrzegł się pewnych nieścisłości, które z obowiązku recenzenta zmuszona jestem przedstawić w formie uwag krytycznych.

- Bardzo przydatny wykaz skrótów poprzedzający wstęp mógłby zawierać również skróty wirusów wymienionych we wstępie: PPV, PRRSV, PCV2, EMCV, ADV, CSFV (str. 3).
- Zabrakło również w wykazie skrótów TCID₅₀ – Tissue Culture Infection Dose – dawka wirusa dająca efekt cytopatyczny w 50% zakażonej hodowli komórkowej (str. 10, 11, 13).
- Dla oceny nieswoistej odpowiedzi humoralnej Doktorant określał stężenia CRP i Hp. Warto byłoby wyjaśnić dlaczego dokonano takiego wyboru. Surowiczy amyloid A (SAA) oraz główne białko ostrej fazy svin (pig-Map) to również białka ostrej fazy, których poziomy stanowią obraz nieswoistej odpowiedzi immunologicznej u svin.
- str. 4, określenie „brak apetytu” – w weterynarii określane jest jako „brak łaknienia”.
- str. 4, słowo „nieuodpornionych” pisane jest łącznie, nie rozdzielnie.
- str. 4, zamieszczone jest następujące zdanie „W odniesieniu do trzody chlewnej dostępne są jedynie fragmentaryczne dane dotyczące zaburzeń w sektorze rozrodu”, sędzę, że lepiej zastąpić innym lub pominąć słowo „sektor”, ponieważ nie wiadomo, czy w zdaniu chodzi o część chlewni, czy po prostu o rozród lub problemy rozrodcze.
- str. 5, „straty w stawce warchlaków” - w dysertacji lepiej użyć określenia w grupie warchlaków.
- str. 10 i 11, zamiast „podano 2, 3, 6 ml wirusa” - „podano 2, 3, 6 ml inokulatu lub *inoculum*”.
- Dawki wirusa wyrażane są w logarytmach dziesiętnych TCID₅₀.
- W pracy znalazły się pewne nieścisłości związane z przebiegiem opisywanych doświadczeń. Na str. 9 w podrozdziale „Układ doświadczeń” podano, że w I miesiącu ciąży loszki zostały

zakażone donosowo i dotchawiczo podtypem H1N2, podczas gdy na str. 10, w omówieniu głównych wyników badań znajduje się informacja wyłącznie o zakażeniu donosowym.

- Pewne zastrzeżenia budzi niejednorodność poszczególnych doświadczeń polegająca na zastosowaniu różnych dawek wirusa. W I miesiącu ciąży zakażono loszki donosowo dawką $4 \times 10^{5,4}$ TCID₅₀/ml, w II miesiącu ciąży podano $6 \times 10^{7,34}$ TCID₅₀/ml, natomiast w III podano $7 \times 10^{7,54}$ TCID₅₀/ml podtypu H1N2. Podawano też różne objętości inokulatu donosowo, 2 ml w I miesiącu, 3 ml w II a w III nie podano objętości. Dodatkowo w II i III miesiącu, jak wynika z opisu, dodatkowo loszki zakażono również dotchawiczo. To zróżnicowanie procedur nieco utrudnia porównanie wyników otrzymanych w poszczególnych grupach doświadczalnych. Myślę, że istnieje uzasadnienie takiej decyzji, którego chętnie wysłucham podczas obrony rozprawy doktorskiej.
- W wykazie piśmiennictwa brakuje 13 pozycji, na które Doktorant powoływał się w opracowaniu i w opublikowanych artykułach. Są to:
Acs i wsp., 2005 z publikacji I; Brown i wsp., 1993 z publikacji I; Carman i wsp., 1999 z publikacji I; Castrucci i wsp., 2004 z publikacji I; Easterday i wsp., 1999 z publikacji I; Gu i wsp., 2007 z publikacji I i II; Kaiser i wsp., 2001 z publikacji III; Kaden i wsp., 2008 z publikacji IV; Kwit i wsp., 2014 z publikacji III; Kwit i wsp., 2015 z publikacji IV Rasmussen i wsp., 2008 z publikacji I; Tamura i Kuraba, 2004 z publikacji I; Korniyushenko i Maximovich, 1957, cyt na str. R (zapewne chodziło o zamieszczoną w wykazie pracę z 1977).

Przedstawione uwagi, mające w większości charakter porządkowy nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej i nie mają wpływu na jej pozytywną i wysoką ocenę.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Krzysztofa Kwita pt. „**Patogeneza zakażenia prośnych loszek wirusem grypy świń**” odpowiada warunkom określonym w Art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz warunkom określonym w § 6. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego wnioski o dopuszczenie lek. wet. Krzysztofa Kwita do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 12.11. 2015 r.

dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj. prof. UWM