

Prof. dr hab. Wojciech Szweda

Olsztyn, 26.07.2015 r.

Katedra Epizootiologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Kingi Urbaniak**

pt. „Replikacja wirusa grypy ptaków w organizmie świni”

wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Iwony Markowskiej-Daniel (promotor) i dr Andrzeja Kowalczyka (promotor pomocniczy) w Zakładzie Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Komisji Doktorskiej Rady Naukowej z dnia 21.07.2015 r. (BRN – 410/6/15), zgodnie z uchwałą Rady Naukowej PIWet – PIB w Puławach podjętą w dniu 26.09.2012 r.

Grypa jako zakaźna i bardzo zaraźliwa choroba ludzi i różnych gatunków zwierząt stanowi ciągle przedmiot dużego zainteresowania nauki i praktyki lekarsko-weterynaryjnej, w tym zwłaszcza Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) i Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE). Zainteresowanie i obawy związane z tą chorobą wynikają z corocznie obserwowanej dużej zachorowalności i historycznych przekazów dotyczących potencjalnie wysokiej śmiertelności – przykład tzw. „grypa hiszpanka”, na którą w latach 1918-1919 zachorowało około 500 mln osób (1/3 populacji), a zmarło co najmniej 50 mln.

Z uwagi na bardzo dużą zmienność wirusa grypy stale pojawiają się nowe warianty antygenowe, mutanty, czy reasortanty, co wymaga ciągłej kontroli epidemiologicznej i molekularnej, również w kontekście immunoprofilaktyki swoistej. Duża napastliwość wirusa oraz migracje dzikiego ptactwa wodnego, będącego naturalnym jego rezerwuarem, sprzyjają jego rozprzestrzenianiu na dalekie odległości i rozwojowi epidemii lub pandemii. Szczególne emocje wzbudziły pandemie grypy ptasiej i tzw grypy świńskiej, które na początku XXI wieku przybrały zasięg ogólnoswiatowy.

Populacja świń odgrywa w epidemiologii grypy rolę szczególną, ponieważ stanowi rezerwuar, w którym następuje mieszanie szczepów ludzkich, ptasich i świńskich, z dużą możliwością powstawania nowych wariantów stanowiących potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Wyjątkowe właściwości wirusa grypy powodują, że szereg zagadnień dotyczących patogenezы i epidemiologii zakażeń oraz transmisji międzygatunkowej jest słabo poznanych. Dlatego podjęcie przez doktorantkę tematu oceny replikacji wirusa grypy ptaków w organizmie świni należy uznać za bardzo trafne i aktualne, o dużym znaczeniu przede wszystkim poznawczym, ale również aplikacyjnym.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 147 stron wydruku komputerowego i ma układ typowy dla opracowań tego typu, który obejmuje Wstęp, Uzasadnienie i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenia w językach polskim i angielskim oraz Piśmiennictwo. Wstęp został poprzedzony wykazem używanych w tekście licznych skrótów. Dokumentację stanowi 12 tabel i 30 rycin, które zostały umiejętnie wkomponowane w tekst rozprawy.

W obszernym, liczącym 20 stron tekstu „Wstępie”, podzielonym na 5 podrozdziałów, doktorantka scharakteryzowała typy A, B, C wirusa grypy i wrażliwość gatunkową na zakażenie, bardzo szczegółowo opisała budowę wirusa typu A, rolę poszczególnych białek podstawowych i dodatkowych oraz

cykl replikacyjny. Następnie omówiła międzygatunkową transmisję wirusa, zwracając uwagę na skomplikowane, nie w pełni poznane, mechanizmy przekraczania bariery gatunkowej i adaptacji do nowego gatunku gospodarza. Przedstawiła zmienność wirusa grypy podkreślając znaczenie przesunięcia antygenowego i skoku antygenowego w powstawaniu nowych wariantów, stanowiących zagrożenie dla człowieka. Wstęp kończy omówienie grypy świń jako zoonozy z zaznaczeniem, że szczepy SIV stanowią potencjalne i ciągłe zagrożenie dla człowieka, aczkolwiek dotychczasowa liczba przypadków zakażeń ludzi SIV w świecie jest niewspółmierna do zakażeń szczepami ptasimi, a zwłaszcza ludzkimi.

Cel główny pracy został sformułowany jako próba określenia faktycznej roli świń w międzygatunkowej transmisji AIV. Zdaniem recenzenta cel ten ma wyraźne nachylenie epidemiologiczne, podczas gdy tytuł rozprawy nachylenie patogenetyczne. Pozostaje to oczywiście kwestią dyskusyjną, ponieważ w dalszych pięciu celach szczegółowych doktorantka precyzuje zakres badań, obejmujący ocenę adaptacji AIV do organizmu świni w wyniku seryjnych pasażów *in vivo*, określenie możliwości i mechanizmów transmisji AIV od świń zakażonych eksperymentalnie do świń kontaktowych oraz ocenę zjawiska reasortacji w wyniku równoczesnego zakażenia AIV i SIV.

W rozdziale „Materiały i metody” doktorantka bardzo szczegółowo opisała użyte w badaniach szczepy wirusa grypy, zwierzęta doświadczalne, plan doświadczeń, w tym metodykę zakażeń eksperymentalnych, badań klinicznych i anatomopatologicznych, zasady pobierania próbek od zwierząt, przygotowania szczepów i przeprowadzenia zakażeń oraz wykonania badań wirusologicznych, molekularnych i serologicznych. Tak szczegółowe opisy można uznać za zaletę w przypadku zamiaru powtórzenia badań, ale w niektórych miejscach są one może zbyt szczegółowe.

Badania zostały wykonane w postaci trzech doświadczeń. W pierwszym, dotyczącym oceny adaptacji AIV do organizmu świni, do badań użyto 50

warchlaków, z których po dwa zakażano donosowo kolejnymi 25 (od 0 do 24) pasażami wirusa w hodowli MDCK. W wymazach z nosa i tkankach układu oddechowego wykrywano materiał genetyczny wirusa testem RRT-PCR, który następnie poddano sekwencjonowaniu i analizie. Określano miano wirusa testem HA i poziom przeciwciał testem HI. W doświadczeniu drugim, dotyczącym określenia transmisji AIV od świń zakażonych do kontaktowych użyto 20 warchlaków. Świnie kontaktowe umieszczano z zakażonymi AIV, również z kolejnych pasaży (5, 10, 15 i 20) i przez 5 kolejnych dni badano siewstwo wirusa. Badania serologiczne wykonywano testami HI i IPMA. Doświadczenie trzecie, dotyczące oceny reasortacji AIV i SIV, wykonano na 12 warchlakach, które zakażono donosowo równocześnie oboma wirusami. Materiał genetyczny w wymazach z nosa i tkankach wykrywano testem RRT-PCR, a pojedyncze izolaty uzyskiwano metodą łyśinkową. Po zróżnicowaniu obu wirusów testem RT-PCR dokonywano analizy długości fragmentów restrykcyjnych i sekwencjonowania. Badania serologiczne wykonywano również testami HI i IPMA. We wszystkich doświadczeniach prowadzono ponadto badania kliniczne w kierunku objawów oddechowych i badania anatomopatologiczne świń poddawanych eutanazji w kolejnych etapach badań.

Obszerny, liczący 32 strony rozdział „Wyniki”, obejmuje opisową prezentację uzyskanych wyników badań, kolejno zgodnie z przyjętymi celami badawczymi oraz etapami badań w kolejnych doświadczeniach. Opis bardzo licznych wyników został udokumentowany graficznie w 12 tabelach i 30 rycinach, czytelnych i starannie opracowanych, przedstawiających konsekwentnie w sposób jasny i zrozumiały rezultaty uzyskiwane w ramach poszczególnych eksperymentów.

Rozdział „Dyskusja”, liczący 27 stron, stanowi bardzo umiejętną próbę analitycznej i jednocześnie krytycznej oceny wyników badań własnych w kontekście wyników uzyskanych przez innych autorów w trakcie wyjątkowo licznych badań prowadzonych w innych ośrodkach naukowych. W tym bardzo

dobrze napisanym rozdziale doktorantka dowiodła gruntownej znajomości badanej problematyki, umiejętności wyboru odpowiednich pozycji z ogromnie bogatego, światowego piśmiennictwa z tego zakresu, jak również prowadzenia naukowej dyskusji i konfrontacji uzyskanych wyników własnych z wynikami innych badaczy.

Rozprawę kończy 8 syntetycznych wniosków, dowodzących pełnego osiągnięcia zaplanowanych celów badawczych, po których zamieszczono dwa streszczenia w językach polskim i angielskim oraz obszerny wykaz 203 starannie dobranych pozycji piśmiennictwa zagranicznego i krajowego.

Przeprowadzone przez doktorantkę w ramach recenzowanej rozprawy wielowątkowe, bardzo obszerne, wyjątkowo praco- i czasochłonne badania pozwoliły na uzyskanie wielu interesujących, wartościowych, oryginalnych i unikalnych wyników, stanowiących uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej patogenezы i epidemiologii zakażeń AIV w organizmie świni. Wyniki te są cenne zwłaszcza pod względem poznawczym, ale mogą również znaleźć zastosowanie praktyczne. Badania potwierdziły możliwość replikacji AIV w drogach oddechowych świń, aczkolwiek zakażenie, poza krótkotrwałą gorączką, przebiega zwykle subklinicznie, co sprzyja rozprzestrzenianiu się wirusa. Podkreślenia wymaga wykazanie, że adaptacja szczepów ptasich do organizmu świni jest procesem złożonym i długotrwałym, wymagającym kilkunastu pasaży oraz jednoczesnego wystąpienia pewnych mutacji zmieniających sekwencje aminokwasów w HA. Cennym rezultatem badań jest również określenie, jakie zmiany genomowe mają, a jakie nie mają wpływu na adaptację i transmisję szczepów ptasich w populacji świń, co stanowi pewnego rodzaju barierę gatunkową. Potwierdzono i określono także warunki zachodzenia procesu reasortacji genów u szczepów AIV i SIV, podkreślono jego znaczenie w powstawaniu nowych szczepów wirusa, z zaznaczeniem, że wiele elementów tego procesu pozostaje dalej niejasnych. Ważnym praktycznym dla badań monitoringowych rezultatem badań było wykazanie większej

przydatności testu IPMA w stosunku do testu HI w ocenie serokonwersji przy zakażeniach szczepami AIV.

Rozprawa zawiera szereg elementów nowatorskich, wnoszących nową jakość do nauki i praktyki lekarsko-weterynaryjnej, zwłaszcza w zakresie badań laboratoryjnych, została wykonana bardzo poprawnie metodycznie, z zastosowaniem kompletu zarówno tradycyjnych metod wirusologicznych i serologicznych, jak i najnowszych metod molekularnych, a uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat zakażeń AIV u świń i usprawniają diagnostykę laboratoryjną w tym obszarze badawczym.

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak pewne usterki lub niedociągnięcia, niektóre o charakterze dyskusyjnym, na które z obowiązku wnikliwego recenzenta zmuszony jestem zwrócić uwagę:

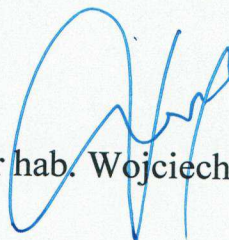
- W przypadku wyjaśnienia stosowanych skrótów w wykazie nie ma potrzeby ich ponownego wyjaśniania w tekście pracy.
- W rozdziale „Materiały i metody” należało:
 - zamiast obr./min. zastosować oznaczenie x g;
 - zastosować skróty np. godz., min., s zamiast pełnych nazw;
 - ujednoczyć stosowanie lub nie słowa „temperatura”;
 - przechowywanie materiału w temp. $-20\pm 7^{\circ}\text{C}$ wydaje się zbyt dużym zakresem (14-27°C).
- W przypadku opisu zmian w płucach i użycia określeń np. „zmiany niewielkie” lub „zmiany duże i wyraźnie widoczne” można było zastosować system punktowy np. Goodwina i Whittlestone`a (1973), stosowany przy mykoplazmowym zapaleniu płuc świń, wówczas porównanie zmian byłoby bardziej czytelne.
- Wyniki badań serologicznych podano jedynie opisowo, a można je było przedstawić w formie tabel lub rycin.

- W streszczeniach należało zaznaczyć, że u zakażonych świń nie stwierdzono objawów klinicznych grypy, z wyjątkiem podwyższenia wewnętrznej ciepłoty ciała.
- W przypadku podawania w tekście nazwisk autorów cytowanych publikacji numeracja pozycji piśmiennictwa jest niepotrzebna.
- Przypominam, że w przypadku cytowania pracy dwóch autorów podaje się oba nazwiska, natomiast przy większej liczbie autorów nazwisko pierwszego autora z dopiskiem „i wsp.”.
- Sugeruję zmianę niektórych określeń:
 - „infekcja”, „zainfekowane” na „zakażenie”, „zakażone”;
 - „ko-infekcja” na „zakażenie mieszane lub równoczesne”;
 - „szczep o podtypie H1N1” na „szczep podtypu H1N1”.

Przedstawione uwagi krytyczne, mające generalnie charakter porządkowy, uzupełniający lub wręcz polemiczny nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy i nie mają wpływu na jej jednoznacznie pozytywną i bardzo wysoką ocenę.

We wniosku końcowym stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Replikacja wirusa grypy ptaków w organizmie świni” w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), dlatego przedkładam wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wnioski o dopuszczenie mgr Kingi Urbaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wyjątkową wartość poznawczą wykonanych perfekcyjnie pracochłonnych badań, poprawiającą znajomość patogenezы i epidemiologii grypy świń, jak również wartość aplikacyjną zastosowanych metod

laboratoryjnych usprawniających diagnostykę zakażeń wirusem grypy,
wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy stosowną nagrodą.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'W' followed by a series of loops and a final vertical stroke.

Prof. dr hab. Wojciech Szweda