

Prof. dr hab. Wojciech Szweda
Katedra Epizootiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 01.08.2017 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Iwony Kozyry**

pt. „Molekularna charakterystyka zoonotycznych szczepów rotawirusa świń”

wykonanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Artura Rzeżutki, prof. nadzw. w Zakładzie Wirusologii Żywności i Środowiska Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Komisji Doktorskiej Rady Naukowej z dnia 03.07.2017 r. (BRN-410/8/17), zgodnie z uchwałą Rady Naukowej PIWet – BIP w Puławach podjętą w dniu 26.09.2012 r.

Rotawirusy (RV) są bardzo rozpowszechnione w populacjach człowieka i różnych gatunków zwierząt na całym świecie. Jako wirusy enteropatogenne wywołują, zwłaszcza u młodych osobników, zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego o różnym nasileniu, mogące nawet kończyć się śmiercią.

Zakażenia rotawirusowe mogą powodować duże straty ekonomiczne w hodowli trzody chlewnej, jak również stanowią poważny problem epidemiologiczny u ludzi w skali świata, z liczbą ponad 140 mln zachorowań i 450 tys. zejść śmiertelnych rocznie. Opracowanie i stosowanie w ostatniej dekadzie szczepionek, zwłaszcza u dzieci, spowodowało poprawę tej sytuacji, ale generalna ocena wyników szczepień nie jest w pełni zadowalająca. Jedną z przyczyn trudności, czy niepowodzeń immunoprofilaktycznych jest specyficzna, segmentowa budowa genomu RV, która powoduje duże zróżnicowanie genotypowe oraz sprzyja znacznej zmienności w wyniku mutacji, a także reasortacji, czyli wymiany całych segmentów genomu między szczepami RV danego gatunku zwierząt, czy

człowieka. Zjawisko reasortacji może również zachodzić między szczepami ludzkimi i zwierzęcymi prowadząc do powstawania szczepów zoonotycznych. Występowanie oraz molekularna charakterystyka zoonotycznych szczepów RV występujących u świń i ludzi są jeszcze słabo poznane, zwłaszcza w naszym kraju, dlatego podjęcie przez doktorantkę tego tematu należy uznać za właściwe i bardzo aktualne, o dużym znaczeniu, zarówno o charakterze poznawczym, jak i możliwym aplikacyjnym.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska liczy 205 stron wydruku komputerowego i ma układ typowy dla tego typu opracowań, obejmujący: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenia w językach polskim i angielskim oraz Piśmiennictwo. Wstęp został poprzedzony wykazem używanych w tekście skrótów. Dokumentację stanowi 20 tabel i 40 rycin, wkomponowanych w tekst rozprawy, na końcu której zamieszczono również 29 załączników.

W liczącym 17 stron „Wstępie”, podzielonym na 9 podrozdziałów, doktorantka omówiła występowanie RV u zwierząt i człowieka oraz ich znaczenie kliniczne, epidemiologiczne i ekonomiczne. Przedstawiła ich systematykę, budowę i cykl replikacyjny, zwracając uwagę na znaczenie zmienności, reasortacji i potencjał zoonotyczny szczepów świńskich RV grupy A (RVA). Szczegółowo scharakteryzowała molekularną klasyfikację genotypów RVA oraz genotypy krążące w populacjach świń i ludzi. Wstęp kończy omówienie rodzajów i właściwości szczepionek oraz schematów szczepień profilaktycznych przeciw zakażeniom rotawirusowym u ludzi i świń w świecie i w Polsce, ich zalet i wad oraz wpływu szczepień na występowanie zakażeń i zmienność profili genotypowych szczepów RVA krążących w populacji ludzi.

Cel, a właściwie cele pracy, których doktorantka wymienia sześć, zostały generalnie jasno sformułowane i określiły kolejność wykonywania badań, które obejmowały:

- ocenę występowania zakażeń RV w stadach świń w Polsce,
- identyfikację genotypów G i P RVA świń na bazie analizy sekwencji nukleotydowych kodujących białka VP7 i VP4,
- poszukiwanie i ocenę rozpowszechnienia zoonotycznych szczepów RVA w krajowej populacji świń,
- identyfikację genotypów RVA człowieka z przypadków klinicznych w regionach, w których stwierdzono u świń RVA o genotypie zoonotycznym,
- ocenę pokrewieństwa filogenetycznego między szczepami RVA krążącymi w populacjach świń i ludzi w Polsce,

- określenie roli świń jako rezerwuaru RVA stanowiących zagrożenie dla człowieka.

W rozdziale „Materiał i metody” doktorantka opisała wykorzystywane materiały odniesienia, liczby i procedury pobierania próbek kału od świń i ludzi, szczegółowe metodyki wykonania testu ELISA do wykrywania antygenu RVA świń i człowieka oraz amplifikacji genów kodujących białka strukturalne i niestrukturalne RVA. Szczegółowo przedstawiła również procedury analizy sekwencyjnej, izolacji szczepów RVA świń w hodowli komórkowej, określania zgodności sekwencji nukleotydowych oraz pokrewieństwa filogenetycznego szczepów RVA świń i człowieka, a także identyfikacji potencjalnie zoonotycznych i zoonotycznych szczepów RVA. Rozdział ten kończy opis zastosowanych metod i programów statystycznych.

Wyjątkowo obszerny, bo liczący aż 50 stron rozdział „Wyniki” obejmuje opisową prezentację uzyskanych wyników, kolejno w podrozdziałach zgodnych z przyjętymi celami badawczymi. Opis bardzo licznych wyników został starannie udokumentowany w postaci 20 tabel i 40 rycin umieszczonych w tekście rozprawy oraz uzupełniony dalszymi licznymi tabelami na końcu rozprawy, przedstawiającymi szczegółowe wyniki badań zakażeń RVA u świń w Polsce w poszczególnych grupach wiekowych i województwach (Zał. 1-9) oraz wartości podobieństwa pomiędzy sekwencjami nukleotydowymi szczepów RVA świń i człowieka pochodzących z różnych województw (Zał. 10-29).

W liczącym 12 stron rozdziale „Dyskusja” doktorantka, może w sposób zbyt syntetyczny, dokonała zarówno analitycznej, jak i krytycznej oceny wyników uzyskanych w badaniach własnych, w porównaniu do wyników badań innych autorów. Rozdział ten stanowi pewne podsumowanie oraz dowód bardzo dobrej znajomości badanej problematyki, prowadzenia naukowej dyskusji w kontekście licznych badań realizowanych w innych krajach, jak również umiejętności wyboru odpowiednich pozycji piśmiennictwa.

Rozprawę kończy 8 syntetycznych wniosków, które dowodzą osiągnięcia zaplanowanych celów badawczych. Po wnioskach zamieszczono dwa streszczenia – w językach polskim i angielskim oraz obszerny wykaz 214 odpowiednio dobranych pozycji piśmiennictwa, w większości najnowszego zagranicznego oraz nielicznego krajowego.

Badania przeprowadzone przez doktorantkę w ramach recenzowanej rozprawy - wielowątkowe, bardzo obszerne oraz praco- i czasochłonne umożliwiły uzyskanie szeregu interesujących, cennych i oryginalnych wyników, które w znacznym stopniu poszerzyły dotychczasową wiedzę w zakresie epidemiologii zakażeń rotawirusowych w populacjach świń i ludzi, ze szczególnym uwzględnieniem elementów zoonotycznych. Wyniki te są

wartościowe zarówno w aspekcie poznawczym, jak również aplikacyjnym, umożliwiającym poprawę w zakresie profilaktyki ogólnej oraz immunoprofilaktyki swoistej.

Badania potwierdziły powszechne występowanie zakażeń RVA w krajowej populacji świń oraz wyższą ich prewalencję u zwierząt młodych. Wykazano, że u świń w Polsce, podobnie jak w innych krajach, dominują szczepy RVA o genotypach G5 i P[6], natomiast u ludzi G1 i P[8]. Stwierdzono natomiast znacznie większe rozprzestrzenienie genotypów G1 i P[13], rzadko wykrywanych u świń w innych regionach świata.

Do szczególnych osiągnięć doktorantki w wyniku realizacji tych badań należy zaliczyć wykazanie zmian struktury genotypów P RVA świń uznanych za dominujące w Polsce, która nastąpiła w ostatnich 15 latach, jak również identyfikacja po raz pierwszy u świń w Polsce bydlęcego reasortanta RVA o genotypie G6, dotychczas rzadko wykrywanego w świecie, a także szczepów o genotypach P[34] i P[14] łączonych dotychczas z zakażeniami przeżuwaczy i królików. Zaobserwowano ponadto regionalne zróżnicowanie występowania genotypów RVA u świń w Polsce. Ważnym odkryciem było zidentyfikowanie nowych szczepów o genotypach G1P[8], G5P[34] i G9P[34], dotychczas nie stwierdzanych u trzody chlewnej. Z epidemiologicznego punktu widzenia istotne było potwierdzenie dużej zmienności oraz występowanie zjawiska reasortacji pomiędzy szczepami RVA świń i człowieka, czego dowodem było wykrycie zoonotycznych czy potencjalnie zoonotycznych szczepów o genotypach G4P[6], G5P[6] oraz G9P[6].

Recenzowana rozprawa, z uwagi na tematykę badawczą oraz metodologię badań, wnosi nową jakość do nauki i praktyki lekarsko-weterynaryjnej, została wykonana metodycznie poprawnie, z zastosowaniem różnego typu metod i technik badawczych – epidemiologicznych, immunoenzymatycznych, wirusologicznych i molekularnych, w tym analiz sekwencyjnej i filogenetycznej, niekiedy trudnych do realizacji i interpretacji, a uzyskane wyniki uzupełniają wiedzę na temat występowania i rozprzestrzenienia zakażeń RVA u świń i ludzi w Polsce, molekularnej charakterystyki RVA świń oraz roli tego gatunku zwierząt jako rezerwuaru RVA dla ludzi.

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak pewne niedociągnięcia, również takie o charakterze dyskusyjnym, które z pozycji recenzenta zobowiązany jestem przedstawić:

- Tytuł rozprawy jest zawężony i sugeruje, że dokonano jedynie molekularnej charakterystyki zoonotycznych szczepów RV świń, podczas gdy oceniono również występowanie zakażeń RV w stadach świń w Polsce, dlatego tytuł można było poszerzyć o ten element,

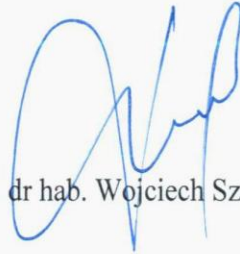
- str. 9 i 13 – określenie „toksyna wirusowa” czy „enterotoksyna” dla białka NSP4 wirusa nie wydaje się właściwe – sugeruję zmianę na „białko NSP4 o właściwościach enterotoksyny”,
- str. 10 – właściwa nazwa to „Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny” (patrz poz. piśm. 126),
- str. 17 i 101 – występuje niezgodność podanej liczby dotychczas zidentyfikowanych genotypów P RVA – 37 czy 35 ?
- str. 20 – szczepionki zawierające szczepy RVA o genotypach najczęściej stwierdzanych u świń to szczepionki wieloważne lub poliwalentne, a nie skojarzone, które zawierają antygeny różnych zarazków (na str. 23 określenie prawidłowe – szczepionka pentawalentna),
- str. 26 – stwierdzenie, że próbki przechowywano w temp. poniżej -18°C jest mało precyzyjne,
- str. 27 – dlaczego z woj. zachodniopomorskiego, o niskim pogłowie świń, pobrano próbki aż z 19 ferm, skoro na str. 26 podano, że liczba ferm objętych badaniami była proporcjonalna do pogłowia trzody chlewnej w danym województwie ?
- w rozdziale „Wyniki” należało w sposób bardziej dokładny i czytelny przedstawić rezultaty oceny występowania RV oraz różnice między powiatami, fermami i zwierzętami bez objawów i z objawami biegunki, zgodnie z Tab. 1 i 2,
- str. 38 – wykrywanie obecności antygeny RV w próbkach kału nie jest badaniem serologicznym (tytuł Tab. 6), mimo że w teście ELISA są wykorzystywane swoiste przeciwciała. Tytuł podrozdziału 4.1 powinien brzmieć „Ocena prewalencji zakażeń RV” bez słowa „Serologiczna”,
- str. 48 oraz zał. 6 i 7 – stwierdzono pewne niezgodności w wyliczeniach procentowych, które wymagałyby sprawdzenia przed oddaniem pracy do druku,
- str. 91 – podano, że w poszczególnych fermach odsetek świń zakażonych G9 RVA wynosił od 19,3% do 42,8% - w wynikach zabrakło danych o współczynnikach zakażenia stad,
- str. 100 – wniosek 6 – należałoby podać do jakich genotypów G należały szczepy RVA, a nie że należały do wszystkich genotypów, z wyjątkiem trzech,
- istotność różnic należałoby zaznaczyć w tabelach,

- w piśmiennictwie występują nieliczne usterki dotyczące skrótów czasopism oraz ujednolicenia prezentacji poszczególnych pozycji. W przypadku podawania w tekście nazwisk autorów cytowanych prac nie ma potrzeby ich numeracji w spisie,
- w tekście cytowanych jest 5 prac, których brak w spisie – Jackowska i wsp. 2008 (str. 10), Więcek i wsp. 2008 (str. 10), Gomez i wsp. 2014 (str. 91), Medici i wsp. 2008 (str. 93), Zeller i wsp. 2012 (str. 98). W spisie z kolei znajduje się 1 praca, której brak w tekście – Maes i wsp. 2009 (poz. 94). W cytowanej na str. 19 pracy Amimo i wsp. 2013 powinien być rok 2015, a nie 2013, ponieważ praca ta dotyczy pñ. Afryki, a nie USA. W przypadku prac Parashar i wsp. 2006 i 2006a (poz. 138 i 140) powinno być 2006a i 2006b. Dla pracy Mathijnsens i wsp. 2008, cytowanej na str. 32 i 88, powinno być oznaczenie a czy b. W przypadku pracy Collins 2010, cytowanej na str. 89, powinno być Collins i wsp. 2010.
- Sugeruję zmiany niektórych określeñ:
 - str. 8 – „rozpowszechnione u człowieka” na „rozpowszechnione w populacji człowieka”,
 - str. 8 i dalsze – „infekcja” na „zakażenie”,
 - str. 25 – „w krajowej populacji świñ w Polsce” na „w krajowej populacji świñ” lub „w populacji świñ w Polsce”,
 - str. 38 – „próbek kałów” na „próbek kału”,
 - str. 89 i inne – proponuję ujednolicenie zamiennie używanych zwrotów „prewalencja zakażeń RVA”, „częstość infekcji RVA”, „odsetek infekcji RVA”,
 - wymieniając większą liczbę np. genotypów, czy województw należy używać liczby mnogiej np. genotypy 4, 5 i 9, a nie genotyp 4, 5 i 9.

Wyszczególnione uwagi o charakterze krytycznym, porządkowym lub polemicznym nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy i nie wpływają w istotny sposób na jej pozytywną, bardzo wysoką ocenę.

We wniosku końcowym stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Molekularna charakterystyka zoonotycznych szczepów rotawirusa świñ” 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 (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i przedkładam Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego –

Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Iwony
Kozyry do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

Prof. dr hab. Wojciech Szweda