

Prof. dr hab. Wojciech Szweda

Olsztyn, 15.09.2015 r.

Katedra Epizootiologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Aleksandry Kutry**

pt. „Występowanie oraz charakterystyka molekularna szczepów wirusa
biegunki bydła w Polsce”

wykonanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Mirosława Polaka, prof. nadzw. (promotor) i dr hab. Magdaleny Larskiej (promotor pomocniczy) w Zakładzie Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Komisji Doktorskiej Rady Naukowej z dnia 13.08.2015 r. (BRN-410/7/15), zgodnie z Uchwałą nr 40/2013 Rady Naukowej PIWet-PIB podjętą w dniu 24.04.2013 r.

Wirusowa biegunka bydła i choroba błon śluzowych (BVD-MD) stanowi aktualnie poważny, narastający problem epizootyczny i ekonomiczny w hodowli bydła, zwłaszcza mlecznego, w skali świata. Badania monitoringowe wykazały szerokie rozprzestrzenienie zakażeń wirusem BVD-MD w wielu krajach, w tym również w Polsce, z seroprewalencją przekraczającą często 80%. Duże straty gospodarcze i narastanie problemów w międzynarodowym obrocie zwierzętami były powodem opracowania i wdrożenia programów uwalniania populacji bydła od wirusa BVD-MD, m. in. z wykorzystaniem szczepionek znakowanych. Łatwość utrzymywania się i szerzenia zakażeń wynika ze specyfiki samego wirusa, jego zróżnicowania biotypowego, genotypowego i podtypowego, w większości bezobjawowego przebiegu zakażeń, zdolności zakażenia płodów we wczesnym okresie ciąży i powodowania stanu tolerancji immunologicznej, a zwłaszcza wywoływania zakażeń

przetrwających, połączonych z brakiem produkcji przeciwciał i ciągłym siewstwem wirusa. Wyrazem zróżnicowania wirusa BVD-MD są również odmienne postacie kliniczne – wirusowa biegunka bydła, choroba błon śluzowych, zaburzenia rozrodu oraz przypadki tzw. syndromu krwotocznego. Zmienność tego wirusa znajduje także odzwierciedlenie w rosnącej liczbie podtypów w obrębie typów BVDV-1 i BVDV-2 oraz stanowiących coraz większe zagrożenie dla hodowli bydła i stwarzających problemy diagnostyczne atypowych pestiwirusów, zaliczanych do typu BVDV-3. Zatem potrzebne jest prowadzenie stałej oceny występowania wirusa BVD-MD w populacji bydła, opracowywanie i doskonalenie technik diagnostycznych oraz bieżąca charakterystyka samego wirusa, zwłaszcza przy pomocy metod molekularnych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się doskonale w ten nurt badawczy i zapotrzebowanie praktyki terenowej, ponieważ podjęto w niej i rozwiązano szereg zagadnień mających istotną wartość w zakresie etiologii i epidemiologii zakażeń, a zwłaszcza charakterystyki molekularnej szczepów wirusa BVD-MD oraz duże znaczenie praktyczne dla diagnostyki i zwalczania choroby.

Rozprawę doktorską mgr inż. Aleksandry Kuty stanowi spójny tematycznie cykl sześciu publikacji opatrzony wspólnym tytułem „Występowanie oraz charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła w Polsce”.

W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

I. Praca przeglądowa

1. **Kuta A.**, Larska M., Polak M.P., Żmudziński J.F.: Atypical pestiviruses – risk for cattle breeding and importance for the control of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Med. Weter.* 2012, **68**, 84-87. (15 pkt; IF 0,196)

II. Prace oryginalne

1. Larska M., **Kuta A.**, Polak M.P.: Evaluation of diagnostic methods to distinguish between calves persistently and transiently infected with bovine viral diarrhoea virus in respect to the presence of maternal antibodies. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2013, **57**, 311-317. (15 pkt; IF 0,365)
2. **Kuta A.**, Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Predominance of bovine viral diarrhoea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. *Vet. Microbiol.* 2013, **166**, 639-644. (40 pkt; IF 2,726)
3. Polak M.P., **Kuta A.**, Rybałtowski W., Rola J., Larska M., Żmudziński J.F.: First report of Bovine Viral Diarrhoea Virus- 2 infection in cattle in Poland. *Vet. J.* 2014, **202**, 643-645. (45 pkt; IF 2,165)

4. **Kuta A.**, Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and identification of a new subtype in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2015, **59**, 19-22. (15 pkt; IF 0,365)
5. **Kuta A.**, Woźniakowski G., Polak M.P.: Cross-priming amplification for detection of bovine viral diarrhoea virus species 1 and 2. *J. Appl. Microbiol.* 2015, 06/2015; DOI: 10.1111/jam.12859. (30 pkt; IF 2,386)

W przedstawionym cyklu, opublikowanym w latach 2012-2015, pierwszą pracę stanowi artykuł przeglądowy w języku polskim w czasopiśmie *Medycyna Weterynaryjna*, a pozostałe pięć prac to prace oryginalne, opublikowane w języku angielskim w czasopismach znajdujących się w bazie JCR – *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* – 2 prace i po jednej pracy w *Veterinary Microbiology*, *The Veterinary Journal* i *Journal of Applied Microbiology*. Sumaryczny IF prac tego cyklu wynosi 8,203, a łączna liczba punktów według MNiSzW – 160. Wszystkie prace są opracowaniami zbiorowymi, w czterech doktorantka jest pierwszym i w dwóch drugim autorem, a Jej wkład pracy w ich powstanie został określony w trzech pracach na 75%, 70% i 60% oraz w trzech pracach na 50%, co znalazło potwierdzenie w stosownych oświadczeniach współautorów. Stanowi to dowód wiodącej roli doktorantki w opracowywaniu koncepcji i wykonaniu badań oraz przygotowaniu publikacji, aczkolwiek zastanawia drugie miejsce doktorantki w pracach II.1 i II.3 w kontekście Jej 50% i 60% wkładu w ich powstanie.

Opracowanie zawierające w/w cykl publikacji liczy 72 strony i obejmuje:

- Oświadczenia promotora i autora rozprawy doktorskiej,
- Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską,
- Wykaz stosowanych skrótów,
- Wstęp,
- Cel i zakres pracy,
- Metodykę badań, w tym Materiał do badań, Układ doświadczeń i Analizę statystyczną,
- Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych,
- Wnioski,
- Streszczenia w językach polskim i angielskim,
- Bibliografią,
- Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.

We Wstępie doktorantka przedstawiła występowanie i znaczenie BVD-MD w świecie i w Polsce, gatunki wirusów należących do rodzaju *Pestivirus*, wrażliwość zwierząt i ludzi na zakażenie oraz budowę wirusa, następnie omówiła biotypy, genotypy i podtypy BVDV, ich rozprzestrzenienie i znaczenie w wywoływaniu różnych postaci klinicznych. Szczególną uwagę zwróciła na znaczenie zakażeń przetrwałych, dużą zmienność genetyczną wirusa i związaną z tym konieczność doskonalenia diagnostyki laboratoryjnej do wykrywania i charakterystyki molekularnej szczepów, również w kontekście skuteczności immunoprofilaktyki swoistej. Wstęp dowodzi bardzo dobrej znajomości badanej problematyki.

Cel pracy został jasno sformułowany i obejmował charakterystykę molekularną oraz analizę zmienności genetycznej BVDV występującego na terenie Polski i na tej podstawie opracowanie skutecznych metod biologii molekularnej i ich wdrożenie do rutynowej diagnostyki zakażeń bydła w celu identyfikacji zakażeń przetrwałych. Wydaje się, że opracowanie i optymalizacja metod molekularnych powinny poprzedzać charakterystykę i ocenę zmienności BVDV i taką kolejność przedstawia zakres badań. Wynika z niego także, że różnorodne metody biologii molekularnej zostały opracowane nie tylko do identyfikacji zwierząt zakażonych przetrwale, ale również do analizy filogenetycznej i genotypowania izolatów oraz szybkiego wykrywania materiału genetycznego BVDV w próbkach terenowych.

W Metodycy badań przedstawiono w stosunkowo syntetycznej formie materiał badawczy i układ doświadczeń, natomiast w kolejnym podrozdziale omówiono główne wyniki prac doświadczalnych. Szczegółowe opisy metodyczne, wyniki badań i dyskusję przedstawiono w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Wyniki omówiono w dwóch obszarach badawczych dotyczących analizy filogenetycznej i zmienności genetycznej BVDV oraz zastosowania metod molekularnych w diagnostyce i charakterystyce BVDV. Uwzględniając uwagę dotyczącą celu pracy kolejność tego omówienia powinna być odwrotna. Z przeprowadzonych badań doktorantka wyciągnęła pięć wniosków dowodzących spełnienia założonych celów badawczych.

Opracowanie kończą streszczenia w językach polskim i angielskim oraz bibliografia złożona z 54 pozycji dobrze dobranego, nienumerowanego piśmiennictwa zagranicznego i krajowego. Na końcu opracowania zawarto kopie prac stanowiących rozprawę doktorską.

Tematyka publikacji wchodzących w skład cyklu jest merytorycznie spójna i dotyczy:

1. Analizy filogenetycznej polskich izolatów BVDV i określenia zmienności genetycznej wirusa (prace II.2 i II.3).
2. Optymalizacji i zastosowania metod biologii molekularnej w diagnostyce oraz charakterystyce molekularnej BVDV (prace II.1, II.4 i II.5).

W opracowaniu należało również wspomnieć o pracy I.1, która co prawda nie jest pracą doświadczalną, tylko przeglądową, ale została włączona w cykl stanowiący rozprawę doktorską i zwraca uwagę na rosnące znaczenie atypowych pestiwirusów stanowiących zagrożenie dla hodowli bydła oraz komplikujących diagnostykę i zwalczanie BVD-MD.

W szerokich, dobrze zaplanowanych i konsekwentnie wykonanych badaniach, przy użyciu najnowszych metod laboratoryjnych, w tym zwłaszcza molekularnych, z których część zastosowano w tym obszarze badawczym po raz pierwszy, doktorantka wraz z zespołem, w którym pracowała uzyskała bardzo interesujące i wartościowe wyniki o znaczeniu zarówno poznawczym, jak i aplikacyjnym.

W badaniach dotyczących analizy filogenetycznej polskich izolatów BVDV, które przeprowadzono z użyciem 70 izolatów wyizolowanych w latach 2004-2011 w 28 stadach bydła w 12 województwach, wykazano umiarkowane zróżnicowanie genetyczne BVDV i dominację w krajowych stadach podtypów BVDV-1b i 1d, przy braku występowania podtypu 1a, na którym oparte są aktualnie stosowane szczepionki (praca II.2). Stwierdzono jednocześnie występowanie zwierząt zakażonych przetrwale w badanych stadach na poziomie 0,7% - 2,2%. Podkreślenia wymaga, że były to pierwsze badania nad zmiennością genetyczną terenowych izolatów BVDV występujących na terenie Polski.

Oryginalnym osiągnięciem było wykrycie i opisanie pierwszego w Polsce zakażenia bydła typem BVDV-2 w stadzie szczepionym przeciw BVD-MD (praca II.3). Stanowiło to dowód konieczności rozszerzenia zakresu stosowanych metod diagnostycznych do różnicowania genotypów i podtypów oraz identyfikacji zwierząt zakażonych przetrwale.

Trzy prace cyklu (II.1, II.4 i II.5) dotyczyły właśnie optymalizacji i zastosowania kilku metod molekularnych do diagnostyki i charakterystyki BVDV. Wykazano, że metoda real-time RT-PCR umożliwia w jednokrotnym badaniu różnicowanie zwierząt zakażonych przetrwale (PI) i przejściowo (TI), niezależnie od podtypu, wieku i statusu immunologicznego, jest wysoce czuła oraz umożliwia pulowanie próbek, skracając czas wykonania i zmniejszając koszty (praca II.1).

Kolejną opracowaną metodą diagnostyczną jest analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), umożliwiająca szybkie i skuteczne określanie genotypów i podtypów BVDV, stanowiąca alternatywę dla sekwencjonowania. Zasługą doktorantki i zespołu była identyfikacja tą metodą nowego, dotychczas w Polsce nie opisanego, podtypu BVDV-1e (praca II.4). Unikalnym w skali świata osiągnięciem jest opracowanie i zastosowanie po raz pierwszy metody krzyżowej amplifikacji (CPA) do szybkiego wykrywania zwierząt przetrwale zakażonych BVDV-1 i BVDV-2 (praca II.5)

Reasumując należy stwierdzić, że spójny tematycznie cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską, większościowego współautorstwa mgr inż. A. Kuty w opracowaniu koncepcji, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników i przygotowaniu publikacji, jest oryginalnym kompleksowym opracowaniem dotyczącym charakterystyki molekularnej BVDV i usprawnienia diagnostyki i zwalczania BVD-MD i może przyczynić się do poprawy sytuacji epizootycznej tej choroby w Polsce. Badania zawierają szereg elementów nowatorskich, niekiedy unikalnych, zostały wykonane metodycznie poprawnie, z użyciem odpowiednich do tego typu badań metod, a doktorantka przy ich wykonywaniu i opracowywaniu wyników wykazała się odpowiednią wiedzą merytoryczną i umiejętnością samodzielnego ich prowadzenia.

Niezależnie od faktu, iż prace stanowiące rozprawę doktorską były recenzowane szczegółowa ich analiza, jak również analiza przedstawionego opracowania ujawniła pewne niedociągnięcia, również o charakterze polemicznym, które z obowiązku recenzenta zmuszony jestem przedstawić w formie uwag krytycznych.

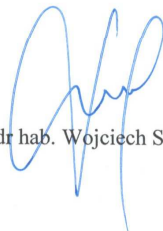
- W tytule opracowania zabrakło elementu diagnostycznego, którego dotyczyły trzy z sześciu prac cyklu;
- Użyta w tytule opracowania nazwa „wirus biegunki bydła” jest zbyt uproszczona w stosunku do pełnej nazwy wirusa i choroby;
- W wykazie publikacji praca I.1 jest napisana po polsku, zatem i tytuł powinien być w języku polskim;
- W danych bibliograficznych prac zwykle podaje się skróty, nie pełne nazwy czasopism;
- W wykazie skrótów i w tekście opracowania skrót TI powinien oznaczać zakażenie przejściowe (transient infection), a nie ostre (acute infection);
- W przypadku wyjaśnienia skrótów w wykazie nie ma potrzeby ich ponownego wyjaśniania w tekście opracowania;

- Należałoby ujednoczyć stosowane określenia – wiriony BVDV, cząsteczki BVDV (str. 5), wiriony wirusa, cząstki wirusa (str. 21);
- Próbkę wykorzystywaną w badaniach należało wymienić na początku podrozdziału 3.1 (str. 13);
- Wyjaśnienia wymaga wniosek 1 dotyczący powszechności występowania zakażeń BVDV u bydła w Polsce – w ramach cyklu nie prowadzono takich badań. Badania filogenetyczne służą raczej charakterystyce molekularnej szczepów, a nie ocenie występowania zakażeń;
- We wniosku 2 chodzi o warianty czy podtypy wirusa ?
- Praca II.5:
 - użyte w tytule i streszczeniu określenie „species” oznacza gatunek wirusa, a 1 i 2 to typy lub genotypy;
 - w Materiałach i metodach (str. 2) podano, że użyto 8 różnych genotypów BVDV, a znane na razie są tylko 3 – powinno być podtypy BVDV.
- Nieścisłości bądź niezręczne sformułowania:
 - str. 8 – „seroreagentów dodatnich” – raczej „zwierząt serologicznie dodatnich”;
 - str. 14 – „surowica krwi” – wystarczy „surowica”;
 - str. 16 – „reakcja RT-PCR” – drugie R w tym skrótce oznacza reakcję;
 - str. 25 – Zwierzęta PI wydalają zamiast wydzielają wirus;
 - str. 28 – zmiana określenia „my study” na „our study”.

Przedstawione uwagi krytyczne, o charakterze w większości porządkowym, wyjaśniającym lub polemicznym, które w związku z faktem, że prace stanowiące rozprawę doktorską zostały już wydrukowane nie mają właściwie znaczenia, nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy i nie mają wpływu na jej jednoznacznie pozytywną i bardzo wysoką ocenę.

We wniosku końcowym stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska, stanowiąca spójny tematycznie cykl sześciu publikacji pod wspólnym tytułem „Występowanie oraz charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła w Polsce”, w pełni 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, ze zm.) oraz § 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 nadaniu tytułu profesora (Dz. U. Nr 204, poz. 1200), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Kuty do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą przeprowadzonych badań, uzyskanie nowych, w tym unikalnych w skali światowej wyników, poszerzających wiedzę na temat zakażeń BVDV w Polsce, a także ich dużą wartość aplikacyjną w diagnostyce i zwalczaniu BVD-MD, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Wojciech Szweda