

Warszawa, 24.10.2018

Recenzja
Rozprawy doktorskiej lek. wet. Karola Stasiaka,
zatytułowanej
„Występowanie oraz charakterystyka molekularna herpeswirusów w populacji koni w
Polsce”
wykonanej
pod kierunkiem Prof. dr hab. Jerzego Roli

Herpeswirusowe zakażenia ludzi i wielu gatunków zwierząt występują na całym świecie, a te stwierdzone u zwierząt gospodarskich i towarzyszących mogą być przyczyną wymiernych strat gospodarczych. Wymienić należy tu BHV-1, PRV czy wirus choroby Mareka. U koniowatych stwierdza się natomiast zakażenia trzema α -herpeswirusami – EHV-1, EHV-3 i EHV-4 oraz dwoma należącymi do γ -herpesvirinae, a największe spośród nich znaczenie z pewnością przypisać należy EHV-1 – wirusowi zakaźnego ronienia klaczy.

Problematyka ronień u koni podejmowana była w Polsce jeszcze przed II wojną światową, czego wyrazem może być opublikowana w 1931 roku w *Wiadomościach Weterynaryjnych* (Nr 129, Kwiecień 1931) rozprawa doktorska Juliusza Brilla, późniejszego Profesora, pt.: „*Patogeneza i epizootjologia ronienia zakaźnego klaczy (abortus infectiosus equi) w stadninie państwowej w Kozienicach w latach 1926/27.*” Natomiast po wojnie, we wczesnych latach 50. temat ten podjęła Profesor Stanisława Woyciechowska, a rezultatem jej badań było stwierdzenie wirusowej etiologii ronień i izolacja szczepu Rac-H EHV-1 (od klaczy **Heraldia** ze stadniny **Racot**), który z czasem stał się rozpoznawanym na całym świecie szczepem standardowym. Profesor Woyciechowska opracowała też służący do wykrywania przeciwciał test immunodifuzji w żelu agarozowym który wykonywany był aż do późnych lat 90. Nie jest to zatem temat nowy, ale, z drugiej strony, ciągle aktualny, a nowoczesne metody badawcze, choćby z zakresu biologii molekularnej, i gwałtowny postęp techniczny, np. mikroskopia konfokalna, pozwalają na wyznaczenie coraz to szerszych horyzontów, zarówno w naukach stosowanych, jak i podstawowych.

Z tego punktu widzenia przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pt. „**Występowanie oraz charakterystyka molekularna herpeswirusów w populacji koni w Polsce**” jest bez wątpienia aktualna i stanowi, w mojej opinii, najpełniejsze jak dotąd opracowanie poświęcone herpeswirusowym zakażeniom u koni w Polsce.

Na rozprawę składa się pięć spójnych tematycznie prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych – cztery oryginalne w języku angielskim, trzy w czasopismach zagranicznych i jedna w polskim, całość cyklu natomiast dopełnia praca przeglądowa w języku polskim. Sama rozprawa ma układ typowy dla dzieł tego rodzaju i zawiera kolejno po spisie treści wykaz publikacji składających się na dysertację wraz z danymi bibliometrycznymi, wykaz skrótów, wstęp, częściowo zawarty w pracy przeglądowej, cel i zakres pracy, zwarte omówienie wyników opublikowanych w pracach oryginalnych, wnioski, streszczenia w językach polskim i angielskim oraz piśmiennictwo liczące 96 pozycji. Prace składające się na cykl stanowią integralną część rozprawy.

We Wstępie Autor szczegółowo omówił ogólną charakterystykę herpeswirusów występujących u koniowatych, budowę wirionu i replikację EHV-1, występowanie poszczególnych typów wirusa oraz kliniczne postacie zakażeń, jak również laboratoryjną diagnostykę i zapobieganie zakażeniom. Cel i zakres pracy został określony zwięźle i podzielony na cztery szczegółowe zadania. Zwięźle omówienie głównych wyników prac doświadczalnych ułatwia lekturę rozprawy i znacznie ogranicza konieczność sięgania do ich pełnej treści. Autor zawarł tu swoje najważniejsze osiągnięcia do których zaliczyć trzeba, bez wątplenia, stwierdzenie występowania w Polsce neuropatogennych szczepów EHV-1 i jest to pierwsze takie doniesienie. Cennym praktycznym efektem ocenianej pracy jest również nowa procedura badawcza wykrywania DNA EHV-1 i EHV-4 testem RTm-PCR. Nowym, istotnym osiągnięciem poznawczym była również analiza porównawcza ORF30 i ORF68 szczepów krajowych ze szczepami izolowanymi w innych krajach. Zgodnie z moim stanem wiedzy była to pierwsza tego typu analiza obejmująca więcej niż jeden gen u tak dużej liczby szczepów.

Za bardzo interesujące uważam również wyniki badań występowania i genetyczna analiza herpeswirusów izolowanych z układu oddechowego, a zwłaszcza zależne od wieku różnice występowania EHV-2 i EHV-5 oraz stwierdzenie nowych, dotychczas nieopisywanych grup genetycznych EHV-2.

Prace, w których zaprezentowano przytoczone w rozprawie wyniki zostały uprzednio opublikowane w recenzowanych i indeksowanych czasopismach i recenzenci wyrazili już swoje opinie. Również całość cyklu ocenić należy bardzo wysoko – to 110 punktów i IF=1.298. Ośmielę się jedynie zauważyć, że tytuł „*Genetic characterization of equid herpesvirus type 1 from cases of abortions in Poland.*” jest odrobinę mylący gdyż analizą objęto tylko dwa geny,

co, moim zdaniem, mogłoby znaleźć odzwierciedlenie w tytule. Podobnie, tytuł innej pracy „*Prevalence and sequence analysis of eqid herpesviruses from the respiratory tract of Polish horses.*” sugeruje analizę sekwencji ich genomów, podczas gdy badano tylko sekwencję genu kodującego białko gB. Również „Polish horses” zastąpiłbym „horses in Poland”, są to jednak opinie bardzo subiektywne.

Odnosząc się merytorycznie do przytoczonych przez Autora wyników nie sposób nie dostrzec i nie docenić ich niewątpliwej wartości zarówno poznawczej jak i praktycznej. I tak stwierdzenie występowania neuropatogennego wariantu EHV-1 jest niezbitym dowodem na to, iż potencjalnie możliwe jest występowanie w Polsce herpeswirusowych mieloencefalopatii, chociaż z drugiej strony wiadomo z literatury, że są one relatywnie rzadkie. Wyniki uzyskane przez Autora wydają się to potwierdzać – jedynie w dwóch spośród 64 próbek tkanek poronionych płodów stwierdzono wariant neuropatogenny. Jest to tym ciekawsze, że w żadnej ze stadnin z których pochodziły poronione płody nie notowano wcześniej przypadków neurologicznych i zakażeń układu oddechowego, a zwierzęta nie były szczepione przeciw *rhinopneumonitis equorum*. Samo nasuwa się zatem oczywiste pytanie czy raczej pytania, które chciałem tutaj zadać, ale ostatecznie pozostawię to zadanie Autorowi.

W drugiej z kolei pracy wchodzącej w skład cyklu Autorzy opisują zastosowanie RTm-PCR do badania tkanek poronionych płodów i jest to jedyne znane mi opracowanie w którym technikę tę zastosowano do badania tak różnorodnego materiału pochodzącego z przypadków poronień. Nie jest tylko jasne, czy podana przez Autora liczba 68 próbek to ogólna liczba próbek, wszystkich tkanek łącznie, czy też 68 kompletów próbek. Wątpliwości rozwiewa dopiero tabela 1 w publikacji oryginalnej, a uzyskane wyniki potwierdzają prawidłowość przyjętej w praktyce zasady pobierania do badań wirusologicznych właśnie płuc, wątroby i śledziony poronionych płodów.

Wyniki genetycznej charakterystyki EHV-1 na podstawie analizy sekwencji regionów ORF30 i ORF68 nie wymagają komentarza, ich wartość jest oczywista, mierzona rejestracją w bazie danych GenBank.

W ostatniej pracy zamieszczono wyniki badań występowania aktywnych herpeswirusowych zakażeń u koni w Polsce. Autorzy wykonali ogromną pracę – materiał stanowiły wymazy z nosa od aż 540 koni i wykrywano w nich aż cztery różne wirusy. Wyniki

potwierdziły występowanie w Polsce dwóch γ -herpeswirusów, EHV-2 i EHV-5, jak również powszechność występowania EHV-2 (u aż 77.2% procent zwierząt), Stwierdzono też wysoką częstość zakażeń EHV-5 – 47%, oraz zakażeń mieszanych. Sumarycznie aż u 83% zwierząt stwierdzono występowanie co najmniej jednego typu wirusa. Wyniki badań wykazały też ogromną zmienność genetyczną EHV-2, potwierdzając tym samym wcześniejsze doniesienia w których analiza restrykcyjna izolatów pochodzących z nozdrzy wykazywała istotne różnice w porównaniu z izolatami z leukocytów krwi obwodowej tych samych zwierząt. Zaznaczyć przy tym należy, że Autor zastosował tu znacznie prostszą i bardziej efektywną technikę. Na uwagę zasługuje również stwierdzenie przez Autorów dwóch nowych grup genetycznych EHV-2 oraz pewne zależności występowania różnych typów wirusa w zależności od rasy i myślę, że można byłoby pokusić się o rozszerzenie badań w tym kierunku.

Zastanawiające jest, że w wymazach z nosa nie stwierdzano EHV-1, jednym z możliwych wyjaśnień są tutaj terminy pobierania próbek – tylko w dwóch przypadkach miało to miejsce w lutym i marcu. Trudno bowiem wyobrazić sobie, by wśród 540 wymazów z nosa pobieranych w różnych regionach kraju nie zdarzyłby się chociaż jeden przypadek aktywnego zakażenia tym wirusem. Sądzę, że w tych okolicznościach jednoczesne badanie wymazów i leukocytów krwi obwodowej mogłoby przynieść interesujące wyniki. Ciekawą obserwacją było również stwierdzenie zależności występowania EHV-2 i EHV-5 w zależności od wieku badanych zwierząt i może i też wątek ten wart byłby kontynuacji.

Swoją rozprawę Autor zamknął pięcioma wnioskami. Wszystkie one są, w mojej opinii, uzasadnione i wypływają uzyskanych wyników. Jednak w szerszym kontekście niektóre z nich wymagają komentarza. Wniosek 1 zawiera wprawdzie element nowości – obserwację, że poronienia powodowane są głównie przez szczepy nieneuropatogenne, jednak po wniosek najważniejszy sięgnąć należy do pracy oryginalnej. Wniosek 3 natomiast jest jedynie potwierdzeniem prawidłowości ustalonej już dużo wcześniej zasady pobierania do badań wirusologicznych próbek wątroby, płuc i śledziony poronionych płodów. Autor nie odniósł się też do tego, że w wymazach z nozdrzy nie stwierdzono EHV-1, a szkoda.

W przedłożonej mi rozprawie znalazły się krótkie omówienia wyników zamieszczonych w poszczególnych pracach co bardzo ułatwiło i lekturę, i ocenę pracy, zabrakło jednak krótkiej choćby dyskusji podsumowującej całość, ale jest to oczywiście ocena subiektywna.

Z satysfakcją stwierdzam, że praca napisana jest bardzo dobrze, w bardzo uporządkowanym i wyraźnie przemyślanym układzie i z wyraźną lekkością pióra Autora, dzięki czemu czyta się ją bardzo gładko. Na szczególne uznanie zasługuje dbałość o stronę redakcyjną i graficzną i niezwykle staranne ich przygotowanie. Jednak podczas lektury zauważyłem pewne drobne uchybienia które, korzystając z przywileju recenzenta, pozwolę sobie przytoczyć:

Str. 3. – Skrót **DNA** należy do powszechnie znanych i nie ma potrzeby zamieszczania jego wyjaśnienia, podobnie **PCR**

HSV – pewna niekonsekwencja w nazewnictwie – jeśli używamy oznaczeń EHV-1 itd., to konsekwentnie HSV zastąpiony powinien być oznaczeniem HHV-1

Str. 4 – Real-time PCR to RTm-PCR

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu jest kalką językową która jednakowoż sugeruje, że pojedynczy nukleotyd wykazuje wielopostaciowość czyli polimorfizm

Str. 5 i in. – sekwencje nukleotydomowe – winno być sekwencje nukleotydów, nie powiemy przecież „sekwencje zdarzeniowe”; to samo dotyczy występujących w tekście „sekwencji aminokwasowych”

Str. 6 – EHV-1 nie tylko początkowo ale ciągle jeszcze nazywany jest **wirusem zakaźnego ronienia klaczy**

Str. 7 – nie do końca jest dla mnie jasne na czym miałyby polegać „cienkościenność” (albo „grubościenność”) kapsydu, jest to dla mnie nowe pojęcie

Str. 9 – termin „cykl lityczny” zarezerwowany jest dla bakteriofagów, tu należałoby raczej użyć określenia „cykl produktywny” zwłaszcza, że wiriony uwalniane są na drodze wypączkowania

Str. 10 – „cytoplazma komórkowa” – to pleonazm, bo czyż może być cytoplazma niekomórkowa?

„wirus opryszczki pospolitej” zamiast HHV-1

Str. 12 – w tabeli 2 przedstawiono „Najważniejsze funkcje glikoprotein biorących udział w cyklu namnażania EHV-1”, można zatem wnioskować, że wirusowa DNA-polimeraza nie bierze udziału w replikacji wirusa gdyż zabrakło jej w tabeli,

Str. 13 – sformułowanie „EHV-1 dodatnie” brzmi żargonowo

Str. 18 – sformułowanie „zakażenia na tle EHV-1” jest dość niezręczne

Str. 19 – laboratorium nie może nic **posiadać** (czyli być właścicielem)! A już z całą pewnością nie może **posiadać personelu!**

Str. 20 – „próbkoobranie” brzmi dość humorystycznie

Str. 22 – sformułowanie, że „badanie laboratoryjne może dać wynik fałszywie ujemny” jest błędne – badanie tkanek płodu nie jest „fałszywie” ujemne, wirusa tam rzeczywiście nie ma, fałszywie ujemne badanie to takie, w którym wirus jest ale go nie wykrywamy, można natomiast mówić o fałszywie ujemnym badaniu wirusologicznym którego celem było określenie przyczyny poronienia

Str. 28 – termin „zwalidowanie” używany jest często, brzmi jednak jak zgrzyt metalu po szkle

Str. 29 – sformułowanie „fragment genu ORF68 o wielkości 764 pz wszystkich dodatnich próbek EHV-1” jest dość niezręczne

Str. 30 – „próbki wymazów dodatnie w kierunku EHV-2” i „prawie połowa koni była dodatnia zarówno w kierunku EHV-2 jak i EHV-5” - te sformułowania brzmią żargonowo

Powyższe krytyczne uwagi nie umniejszają merytorycznej wartości pracy, która wzbogaca ogólną wiedzę o herpeswirusach, i wnosi nowe, istotne dane epidemiologiczne dotyczące herpeswirusów występujących u koni.

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska lek. wet. Karola Stasiaka spełnia wymogi art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz.595.) z późniejszymi zmianami, i niniejszym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Karola Stasiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Marcin Bańbura