

Dr hab. Janusz Danek, prof. UTP  
Zakład Inżynierii Biomedycznej  
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy  
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 23.11.2018 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej **lekarza wet. Karola Stasiaka**

pt. „Występowanie oraz charakterystyka molekularna herpeswirusów w populacji koni w Polsce”

wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr. hab. Jerzego Roli (promotora) oraz dr. Wojciecha Sochy (promotora pomocniczego), w Zakładzie Wirusologii, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Podstawę formalną wykonania niniejszej recenzji stanowi pismo Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego z dnia 24.09.2018 r. (wasz znak: BRN-410/9/18), zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, podjętą w dniu 27.04.2016 r.

Zakażenia wirusowe stanowią poważny problem epizootyczny i epidemiologiczny oraz ekonomiczny w hodowli koni. Obok infekcji wywołanych przez wirusa grypy (Equine Influenza Virus – EIV) i zakaźnego zapalenia tętnic (Equine Viral Arteritis, EVA, EAV) ważną rolę w krajowych stadninach odgrywają zakażenia herpeswirusowe, wywołane przez alfa-herpeswirusy oraz gamma-herpeswirusy. Alfa-herpeswirusy (Equine herpesvirus type 1, EHV-1 i Equine herpesvirus type 4, EHV-4) powodują, oprócz zakażeń dróg oddechowych, także ronienia u klaczy i śmierć nowonarodzonych źrebiąt oraz zaburzenia neurologiczne, natomiast zakażenia gamma-herpeswirusami (Equine herpesvirus type 2, EHV-2 i Equine herpesvirus type 5, EHV-5) w pewnych okolicznościach mogą powodować zapalenie spojówek koni (EHV-2) lub wiązać się przyczynowo z wieloogniskowym zwłóknieniem płuc koni (EHV-5).

Występowanie herpeswirusów w populacji koni jest powszechne, zarówno w świecie, jak i w kraju. Szybkie szerzenie się herpeswirusów u koni wynika ze szczególnej adaptacji tych zarazków do organizmów nosicieli i stosunkowo częstych zakażeń latentnych. Zmienność

herpeswirusów znajduje swój wyraz w rosnącej liczbie podtypów, stanowiących zwiększające się zagrożenie dla koni. Szacowanie tego wymaga prowadzenia badań nad występowaniem i drogami szerzenia się chorobotwórczych herpeswirusów oraz ciągłego opracowywania i doskonalenia technik identyfikacji tych patogenów, z wykorzystaniem różnych metod molekularnych, w tym szczególnie technik opartych na amplifikacji materiału genetycznego (PCR, Real-Time PCR).

Przedstawiona do recenzji praca doktorska lekarza wet. Karola Stasiaka odnosi się w pełni do tej problematyki, w sposób naukowy i praktyczny, przyjmując za cel „Określenie rozprzestrzenienia zakażeń herpeswirusowych w populacji koni w Polsce oraz charakterystykę molekularną wyizolowanych szczepów EHV-1, EHV-2, i EHV-5”.

Powyższą rozprawę doktorską stanowi poniższy zbiór pięciu prac, spójnych tematycznie i opublikowanych w indeksowanych czasopismach naukowych oraz zebranych pod wspólnym tytułem – „Występowanie oraz charakterystyka molekularna herpeswirusów w populacji koni w Polsce”:

1. Stasiak K., Rola J., Żmudziński J.F.: Herpeswirus koni typ 1 - dobrze poznany, lecz ciągle stanowiący wyzwanie. *Postępy Mikrobiologii* 2016, 55, 4, 351-360. (IF<sub>2016</sub> = 0,311, punkty MNiSW=15)
2. Stasiak K., Rola J., Ploszay G., Socha W., Żmudzinski J.F.: Detection of the neuropathogenic variant of equine herpesvirus 1 associated with abortions in mares in Poland. *BMC Veterinary Research* 11: 102, 2015, doi: 10.1186/s12917-015-0416-7. (IF<sub>2015</sub>=1,643, punkty MNiSW=35)
3. Stasiak K., Rola J., Żmudzinski J.F.: Application of real-time PCR for evaluation of distribution of equine herpesvirus type 1 in tissues of aborted fetuses. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2015,18(4):833-9. doi: 10.1515/pjvs-2015-0108. (IF<sub>2015</sub>=0,719, punkty MNiSW=20)
4. Stasiak K., Dunowska M., Hills S.F., Rola J.: Genetic characterization of equid herpesvirus type 1 from cases of abortion in Poland. *Archives Virology* 2017, 162(8):2329-2335. doi: 10.1007/s00705-017-3376-3. (IF<sub>2017</sub>=2,160, punkty MNiSW=20)
5. Stasiak K., Dunowska M., Rola J.: Prevalence and sequence analysis of equid herpesviruses from the respiratory tract of Polish horses. *Virology Journal* 2018, 11: 15(1):106. doi: 10.1186/s12985-018-1018-3. (IF<sub>2017</sub>=2,465, punkty MNiSW=20)

Zgodnie z powyższym zestawieniem, prace te zostały opublikowane w latach 2015-2018, w czasopismach z listy A Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (zbiorczy IF=7,298, całkowita liczba punktów MNiSW=110). Wszystkie manuskrypty mają charakter współautorski, w których doktorant jest zawsze na pierwszym miejscu, z następującymi wkładami w

przygotowanie poszczególnych publikacji – 80% (praca przeglądowa, nr 1), 50% (praca oryginalna, nr 2), 70% (praca oryginalna, nr 3), 60% (praca oryginalna, nr 4) i 50% (praca oryginalna, nr 5).

Opracowanie tematyczne, poprzedzone stosownymi oświadczeniami promotora i autora rozprawy, spisem najważniejszych skrótów oraz wykazem powyższych publikacji, liczy 48 stron tekstu o określonej strukturze (spis treści), obejmującej następujące rozdziały: Wstęp, Cel i zakres pracy, Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych, Wnioski, Streszczenie, Summary i Piśmiennictwo. Całość opracowania kończą pełne teksty publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

W pierwszej części pracy, zwanej „Wstępem” (wykorzystując publikację przeglądową pt. „Herpeswirus koni typ 1 - dobrze poznany, lecz ciągle stanowiący wyzwanie”) syntetycznie scharakteryzowano herpeswirusy występujące u koniowatych, budowę wirionu i namnażanie EHV-1, występowanie zakażeń herpeswirusowych w populacji koni, patogenezę zakażenia EHV-1, postaci kliniczne i następstwa zakażenia koni wywołwanego przez EHV-1 i EHV-4, diagnostykę laboratoryjną w rozpoznawaniu zakażeń EHV-1 oraz sposoby i zasady zapobiegania (w tym immunoprofilaktykę swoistą) zakażeń herpeswirusowych u koni. Ta część pracy dowodzi bardzo dobrej znajomości przez doktoranta opisywanej problematyki.

Dobrze sformułowany został również cel pracy, który jest spójny z tematem rozprawy doktorskiej oraz sprecyzowany w szerokich zakresach, obejmujących następujące zadania:

1. Określenie rozprzestrzenienia zakażeń herpeswirusami (EHV-1, EHV-2, EHV-4, EHV-5) w populacji koni w Polsce na podstawie wyników badań wymazów z nosa z użyciem testu real-time PCR.
2. Izolację wirusów w hodowli komórkowej i stworzenie kolekcji krajowych szczepów herpeswirusów koni.
3. Analizę molekularną archiwalnych i aktualnie krążących szczepów EHV-1, wyizolowanych z poronionych płodów, padłych źrebiąt i wymazów z nosa.
4. Analizę filogenetyczną polskich izolatów EHV-2, EHV-5.

Rozdział pracy pt. „Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych” przygotowano wykorzystując prace własne, opublikowane wcześniej w recenzowanych czasopismach naukowych.

Badania, oparte o nowoczesne metody laboratoryjne (zrecenzowane pozytywnie w cytowanych publikacjach) stosowane w identyfikacji wirusów i ich genotypów, pozwoliły na

określenie występowania wybranych zakażeń herpeswirusowych (w tym szczególnie aktualnie krążących szczepów EHV-1) w populacji koni w Polsce (także w odniesieniu do poronień u klaczy oraz ryzyka wystąpienia nerwowej postaci EHM) oraz charakterystykę molekularną i filogenetyczną EHV-2, EHV-5.

W pierwszej, cytowanej w rozprawie doktorskiej, pracy doświadczalnej stwierdzono, że w latach 1999-2012, wystąpiły liczne przypadki (18 pozytywnych izolatów) poronień u klaczy wywołane nieneuropatogennymi szczepami EHV-1 oraz 2 przypadki wywołane neuropatogennymi szczepami EHV-1 (genotyp G<sub>2254</sub>). Należy podkreślić, że w publikacji tej, po raz pierwszy w kraju opisano obecność w poronionych płodach końskich ten ostatni rodzaj zakażenia.

W drugiej pracy doświadczalnej przedstawiono procedury zmodyfikowanego zastosowania testu real-time PCR w diagnostyce ronień u klaczy wywoływanych przez wirusa EHV-1, co pozwoliło (po walidacji i uzyskaniu pozytywnego wyniku w badaniu biegłości) na wdrożenie go do rutynowej diagnostyki zakażeń EHV-1/4 w Zakładzie Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Należy tu podkreślić szczególnie duże znaczenie praktyczne otrzymanych wyników.

W trzeciej pracy doświadczalnej kontynuowano genetyczne analizy izolatów EHV-1 powodujących ronienia u klaczy w Polsce. Analizie genetycznej poddano gen ORF30 oraz ORF68 – uważany za marker służący do określenia pochodzenia geograficznego szczepów EHV-1. Badania wykazały, że obecnie w kraju dominują szczepy nieneuropatogenne EHV-1<sub>A2254</sub>. Opisane w pracy sekwencje nukleotydowe polskich izolatów EHV-1 zostały wpisane do GenBank Nucleotide Sequence Database. Ma to także duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne.

W ostatniej, cytowanej pracy doświadczalnej, oceniono występowanie aktywnych zakażeń herpeswirusowych koni (EHV-1, EHV-2, EHV-4, EHV-5), pochodzących z 13 państwowych stadnin w Polsce. Analizując próbki wymazów z nozdrzy koni, wykazano obecność DNA wirusowego (real-time PCR, z zastosowaniem starterów specyficznych dla glikoproteiny B EHV-1/4 i EHV-2/5), w odniesieniu do: EHV-2 (77,2% przypadków zakażonych koni), EHV-5 (47% przypadków zakażonych koni) i EHV-4 (0,4% przypadków zakażonych koni), bez obecności materiału genetycznego EHV-1. W pracy omówiono także zmienność genetyczną izolatów EHV-2 i EHV-5. Przeanalizowano także wpływ wieku i rasy na wystąpienie zakażeń określonymi herpeswirusami, co ma także duże znaczenie praktyczne. Powyższe, pionierskie badania, zostały po raz pierwszy opisane w cytowanej publikacji.

Rozdział pt. „Wnioski” odnosi się do tematu oraz celu pracy i poszczególnych zadań badawczych realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej. Został przygotowany w postaci, syntetycznie sprecyzowanych, pięciu wniosków.

Rozprawę doktorską kończy dobrze przygotowane streszczenie (także w j. angielskim) oraz wyczerpujący spis piśmiennictwa, obejmujący 96 pozycji literaturowych.

Przestawione do oceny opracowanie tematyczne w postaci rozprawy doktorskiej, oparte o cytowane publikacje własne (współautorskie), posiada pewne niedociągnięcia, które zostały (z obowiązku Recenzenta) przedstawione w postaci następujących uwag krytycznych, o charakterze ogólnym i/lub bardziej szczegółowym:

1. Pierwsza część pracy jest bardziej przeglądem literatury niż wstępem, w klasycznym tego rozumieniu. Właściwy wstęp powinien zawierać istotne wprowadzenie do obszaru problemowego pracy i zwięzłą prezentację dotychczasowego stanu badań oraz szczególnie podkreślić ważność podjętego problemu badawczego.
2. Przegląd literatury został przygotowany starannie, ale zgodnie z pracą Garvey i wsp. Equid herpesvirus 8: Complete genome sequence and association with abortion in mares. PlosOne. 2018, tabela 1 powinna być w przyszłości zmodyfikowana.
3. Ze względu na ewentualną rolę ogiera i jego nasienia (krycie naturalne i inseminacja) w epidemiologii EHV-1 i EHV-4 (potencjalne zakażenie o charakterze wenerycznym) informacja o tym powinna znaleźć się w podrozdziale pt. „Patogeneza zakażenia EHV-1”, przed opisem wtórnych źródeł zakażenia. Ten akapit powinien być także uzupełniony o informacje zawarte w publikacji Tearle i wsp. Replication of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the testes and epididymides of ponies and venereal shedding of infectious virus. J Comp Pathol. 1996.
4. Powinno się również podać informację, że potencjalnym źródłem i drogą zakażenia EHV-1 może być także zarodek i/lub jego transfer (zgodnie z pracą, Hebia i wsp. Potential risk of equine herpes virus 1 (EHV-1) transmission by equine embryo transfer. Theriogenology, 2007).
5. Nawiązując do powyższego należy stwierdzić, że ciekawym byłoby w przyszłości przeprowadzenie badań pod kątem ewentualnego występowania EHV w rozrodczym materiale biologicznym, pochodzącym z krajowych stad i stadnin koni.

6. Redagując podrozdział pt. „Postacie kliniczne” należało także wspomnieć, że u ogierów reproduktorów w związku z infekcją EHV-1 można zaobserwować zaburzenia neurologiczne, w postaci porażenia prącia i napletka oraz urospermii. Informacje te są jednak bardziej specjalistyczne i niewątpliwie wykraczają ponad zainteresowania naukowe doktoranta.
7. W rozdziale pt. „Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych” powinno się omawiać wyniki badań zachowując porządek tematyczny zgodny z kolejnością podanych zadań badawczych, a nie czasem publikacji.
8. Zgodnie z powyższym, pewnego przeredagowania powinny ulec także wnioski, aby bardziej precyzyjnie odpowiadać na stawiane sobie cele badawcze i otrzymane wyniki badań. Tak więc przeredagowany i uzupełniony wniosek 4. powinien być podany jako 1. Obecny wniosek 1. należałoby połączyć tematycznie z 3. wnioskiem, natomiast 2. przeredagować i uzupełnić, gdyż odnosi się tylko do domyślnego celu badawczego. Na końcu, powinny znaleźć się wnioski dotyczące molekularnej charakterystyki i analizy filogenetycznej wybranych szczepów EHV występujących w populacji koni w Polsce. Na marginesie tego, w streszczeniu opisano w sposób bardziej uporządkowany otrzymane wyniki badań, niż to uczyniono we wnioskach.
9. Wydaje się, że dyskusje nad uzyskanymi wynikami badań, wprawdzie zostały już pozytywnie zrecenzowane, powinny być nieco pogłębione, np. winno się ustosunkować do zupełnego braku izolacji w wymazach z nozdrzy badanych koni materiału genetycznego EHV-1 (Stasiak i wsp. 2018).
10. Rozdział „Piśmiennictwo” powinien być uzupełniony o nowe pozycje, np. cytowane wyżej, oraz poprawiony z podaniem autora w prawidłowej kolejności, zgodnej z rokiem opublikowania jego prac (np. w odniesieniu do publikacji Pusterla N.).
11. W tekście rozprawy doktorskiej pojawiło się niewiele braków i niedociągnięć wpływających na jej estetykę.

Przedstawione uwagi, o charakterze bardziej porządkowym i/lub dyskusyjnym, nie umniejszają wysokiej, naukowej oraz praktycznej, wartości rozprawy doktorskiej, opartej o określony cykl opublikowanych prac tematycznych.

We wniosku końcowym należy stwierdzić, że przedstawiona rozprawa doktorska, stanowiąca zestaw kilku prac, pod wspólnym tytułem „Występowanie oraz charakterystyka

molekularna herpeswirusów w populacji koni w Polsce” spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki, z dnia 14.03.2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595 z 2003 r., z późniejszymi zmianami). Zgodnie z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lekarza wet. Karola Stasiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na bardzo szeroki zakres badań oraz nowatorski charakter wielu aspektów, poznawczych i aplikacyjnych, zawartych w zbiorze publikacji stanowiących podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej, w tym: 1. dokonanie oceny występowania (w zależności od regionu, wieku i rasy) aktywnych zakażeń herpeswirusowych (EHV-2, EHV-4, EHV-5) u koni (9 różnych ras koni, pochodzących z 13 państwowych stadnin w Polsce), 2. modyfikację testu real-time PCR do diagnostyki wirusa EHV-1 stanowiącego przyczynę poronień u klaczy, 3. wykazanie po raz pierwszy w kraju, w poronionych płodach końskich, zakażeń neuropatogennymi szczepami EHV-1<sub>G2254</sub> (EHM) oraz 4. wykonanie szczegółowych analiz molekularnych krajowych izolatów EHV-1 oraz EHV-2 i EHV-5, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Dr hab. Janusz Danek, prof. UTP  
(DVM, PhD, ScD)