

Dr hab. Kazimierz Tarasiuk prof. UR

Kraków, 18.07.2019 r.

Uniwersyteckie Centrum

Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

Al. Mickiewicza 24/28

30-059 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Kozak pt. "Afrykański pomór świń – wybrane aspekty diagnostyki laboratoryjnej, epidemiologii i oceny ryzyka"

Promotorem pracy jest prof. dr hab. Małgorzata Pomorska-Mól.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Edyty Kozak jest obszerną monografią o typowym planie organizacyjnym treści pracy, składającym się z rozdziałów i podrozdziałów. Główne rozdziały to: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie i piśmiennictwo. Rozprawa doktorska obejmuje 230 stron druku komputerowego i jest ilustrowana licznymi tabelami i rycinami.

We wstępie rozprawy doktorskiej Autorka bardzo szczegółowo przedstawia aktualne dane z zakresu struktury wirionu wirusa afrykańskiego pomoru świń (APŚ), biologii wirusa, epidemiologii, patogenez, obrazu klinicznego, immunologii, możliwości diagnostyki, profilaktyki oraz zwalczania tej groźnej choroby. Autorka wykazała się dobrą znajomością piśmiennictwa z tego zakresu. Warto podkreślić, że we wstępie pracy wykorzystwała najnowsze dane literaturowe.

Cel pracy został sprecyzowany dość jasno, po dłuższym wprowadzeniu uzasadniającym podjęcie badań. Ostatecznie cel pracy został przedstawiony w formie cząstkowej w 4 punktach opisujących poszczególne fazy pracy eksperymentalnej.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorantka przedstawiła szczegółowo użyte materiały oraz procedury badawcze, co umożliwia dokładne śledzenie przebiegu doświadczeń. Chciałbym zwrócić uwagę na różnorodność metod badawczych, które stosowano w pracy. Do nich zaliczyć należy walidację wybranych technik laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce APŚ, zarówno serologicznych (ELISA, Test immunoperoksydazowy-IPT, Test immunoblotting-IB), jak też molekularnych (Real-Time PCR). W procesie walidacji technik serologicznych badano specyficzność, czułość, powtarzalność, odtwarzalność i selektywność. W procesie walidacji techniki molekularnej badano takie cechy jak: LOD, specyficzność, czułość, powtarzalność i

odtworzalność. Izolację DNA z materiału pochodzącego od świń i dzików przeprowadzano z wykorzystaniem różnych zestawów komercyjnych. Jako materiał patologiczny w badaniach wykorzystywano krew, surowicę, szpik kostny, nerki, śledzionę, płuca, migdałki, węzły chłonne krezkowe, podżuchwowe i nerkowe. Do walidacji wykorzystywano także próbki ujemne pochodzące od zwierząt niezakażonych wirusem APŚ oraz próbki kontaminowane plazmidem z wklonowanym fragmentem genu kodującego białko VP72.

Sytuacja epidemiologiczna ze szczególnym uwzględnieniem dalszego ryzyka rozprzestrzeniania się APŚ oceniona została na podstawie analizy uzyskanych w latach 2014 - 2016 wyników badań laboratoryjnych (molekularnych i serologicznych) w odniesieniu do populacji dzików i świń.

Materiał do badań stanowiły próbki materiału biologicznego, pobranego od dzików padłych i powypadkowych w ramach tzw. monitoringu biernego oraz odstrzelonych w ramach monitoringu czynnego. Materiał do badań stanowiły także próbki pochodzące od świń padłych oraz żywych z objawami klinicznymi, a także od świń klinicznie zdrowych pochodzących ze strefy objętej restrykcjami. Materiał biologiczny do badań laboratoryjnych pobrano w sumie od 125393 świń oraz 44846 dzików. W skład materiału biologicznego do badań wchodziła krew lub surowica oraz narządy wewnętrzne takie jak: śledziona, nerka, migdałki, węzły chłonne (krezkowe, podżuchwowe, nerkowe), płuca, wątroba, żołądek, jelito cienkie, pęcherz moczowy oraz ślinianka. W przypadku dzików w stanie zaawansowanego rozkładu pobierano kości długie (ramienną, promieniową, udową, piszczelową, strzałkową) oraz mostek. Ponadto do badań użyto skrzepów krwi, kawałków mięśni, skóry oraz próbek paszy i żelatyny.

Krew do badań pobierano od świń żywych i padłych oraz dzików padłych, odstrzelonych i pochodzących z wypadków komunikacyjnych. Dla potrzeb badań użyto 121112 próbek krwi pobranej od świń oraz 28488 próbek krwi pochodzącej od dzików.

Wycinki narządów wewnętrznych, kości, mięśni, skóry pobierano od świń i dzików padłych lub poddanych eutanazji oraz dzików odstrzelonych i powypadkowych. Do badań przeznaczono w sumie 6407 próbek pobranych od świń domowych oraz 30996 próbek pochodzących od dzików. W badaniach wykorzystano także 115 próbek paszy i 17 próbek żelatyny; próbki pobierano w zakładach przetwórczych.

W badaniach wykorzystano metodę molekularną (Real-Time PCR) oraz testy serologiczne (ELISA, Test immunoperoksydazowy - IPT, Test immunoblotting - IB). Wyniki dodatnie lub

wątpliwe uzyskane w teście ELISA potwierdzano testami serologicznymi potwierdzającymi IPT i/lub IB. Badania przeprowadzono w oparciu o procedury badawcze opracowane na podstawie wytycznych Europejskiego Laboratorium Referencyjnego ds. APŚ.

W latach 2014-2016 przy użyciu metody Real-Time PCR przebadano w sumie 125386 świń, co stanowi 99,99% w stosunku do wszystkich zwierząt poddanych badaniu oraz 44846 dzików, co stanowi 100%. Obecność materiału genetycznego wirusa APŚ stwierdzono u 185 świń i 208 dzików. Obecność przeciwciał przeciwko wirusowi APŚ stwierdzono u 16 świń na 19889 badanych oraz u 42 dzików na 20501 badanych zwierząt. Po uwzględnieniu wyników badań wszystkich przeprowadzonych testów zakażenie wirusem APŚ potwierdzono ostatecznie u 189 świń oraz u 235 dzików. Warto podkreślić, że obecność materiału genetycznego wirusa APŚ stwierdzono u 97,88% świń oraz u 88,51% dzików w stosunku do wszystkich zwierząt zakażonych. Uzyskane wyniki są ważne z punktu widzenia epidemiologii APŚ.

Do istotnych osiągnięć tej pracy należą wyniki walidacji testu peroksydazowego, potwierdzające 100% specyficzność, czułość, powtarzalność i odtwarzalność tej metody. Stanowiło to podstawę dopuszczenia testu do rutynowego stosowania w diagnostyce serologicznej APŚ w Krajowym Laboratorium Referencyjnym w Puławach. Podobne wyniki uzyskano w Europejskim Laboratorium Referencyjnym ds. APŚ odnośnie do czułości analitycznej i diagnostycznej testu. Pozwoliło to na stosowanie testu IPT jako metody alternatywnej do potwierdzania wyników dodatnich i wątpliwych, uzyskiwanych w teście ELISA. Dane literaturowe potwierdzają także 100% specyficzność testu peroksydazowego w odniesieniu do próbek z wynikiem ujemnym, uzyskanym w teście ELISA. Warto też dodać, że test IPT jest użytecznym narzędziem do wczesnego wykrywania przeciwciał i był najwyższej ocenioną metodą serologiczną stosowaną w diagnostyce APŚ po jego pojawieniu się w krajach nadbałtyckich w 2014 roku.

Na podkreślenie, w ramach wykonywanej pracy doktorskiej, zasługuje również ocena walidacji metody molekularnej (Real-Time PCR), najczęściej stosowanej w diagnostyce APŚ. Walidację omawianej metody przeprowadzono z zastosowaniem różnorodnego materiału pochodzącego od świń i dzików, co pozwoliło na potwierdzenie przydatności i wiarygodności tej techniki w diagnostyce APŚ. Doktorantka określiła kilka istotnych parametrów testu Real-Time PCR, takich jak specyficzność, czułość, selektywność oraz powtarzalność i odtwarzalność.

Specyficzność testu w badaniach własnych określono na 100%. Świadczą o tym wyniki ujemne, uzyskane po zbadaniu szerokiego panelu próbek pobranych od zdrowych świń i dzików oraz

próbek paszy i żelatyny. W ramach wykonywanej pracy doktorskiej wykazano, że Real-Time PCR z zastosowaniem sondy UPL charakteryzuje się 100% czułością. Dla porównania na podstawie zbadanych przez EURL 450 próbek narządów i 150 próbek krwi pochodzących od eksperymentalnie zakażonych wirusem APŚ świń ustalono, że przy użyciu tego samego testu odsetek wyników dodatnich wyniósł odpowiednio 97,8% i 41,3%. Wysoka czułość testu Real-Time PCR pozwala na wykrywanie wirusa APŚ u zwierząt zakażonych jeszcze przed pojawieniem się objawów klinicznych oraz przeciwciał, jak również do identyfikacji osobników, które przetrwały zakażenie. Ponadto przygotowanie sondy UPL jest znacznie szybsze i o 30% tańsze w porównaniu z innymi sondami.

Warte zauważenia są wyniki badań Doktorantki w odniesieniu do cechy selektywności testu Real-Time PCR. W wyniku przeprowadzonych, w ramach rozprawy doktorskiej, badań nad selektywnością testu nie stwierdzono reakcji krzyżowych z następującymi wirusami: pomoru klasycznego świń, zespołu rozrodczo-oddechowego, choroby pęcherzykowej, cirkowirusa typu 2, grypy świń oraz bakteriami takimi, jak: *Coxiella burnetti*, *Chlamydia spp.*, *Borrelia burgdorferi* oraz *Campylobacter fetus*. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi innych autorów, którzy zajmowali się tą problematyką.

Kolejnym etapem walidacji była ocena przydatności testu Real-Time PCR do badań w kierunku APŚ w warunkach zróżnicowanej temperatury i czasu przechowywania materiału sączonego i niesączonego, pochodzącego od świń i dzików. W swoich badaniach Autorka wykazała, że nawet kilkunastodniowe przechowywanie materiału zakaźnego w temperaturze pokojowej, czy też jego kilkukrotne rozmrażanie nie miało znaczącego wpływu na wydajność ekstrakcji materiału genetycznego APŚ, czy też końcowy wynik testu.

Wykonana, w ramach pracy doktorskiej, analiza wartości Ct otrzymanych w teście Real-Time PCR po zbadaniu próbek terenowych pochodzących od świń i dzików zakażonych w Polsce wykazała, że z punktu widzenia koncentracji wirusa APŚ najbardziej przydatnym materiałem do diagnostycznych badań molekularnych są wycinki śledziony, węzłów chłonnych, nerki, płuc, szpiku kostnego oraz krwi.

Uzyskane, różnymi technikami diagnostycznymi, wyniki badań pozwoliły na określenie prevalencji zarówno u dzików padłych, jak też odstrzelonych. Z analizy tych danych wynika, że odsetek zwierząt seropozytywnych wśród dzików padłych wyraźnie wzrastał z każdym kolejnym rokiem i wynosił 0,57% w roku 2014; 1,43% - 2015 i 19,35% w roku 2016; u dzików odstrzelonych prevalencja nie przekraczała 0,29%. Przy tej okazji wykazano też wysoki

stopień korelacji potwierdzającego testu serologicznego IPT oraz molekularnego Real-Time PCR próbek krwi i narządów wewnętrznych pobranych zarówno od świń, jak też i dzików. Wyniki te są zgodne z założeniami badaczy hiszpańskich, według których wymienione testy stanowią „złoty standard” w diagnostyce APŚ. Warto podkreślić, że ocena sytuacji epidemiologicznej APŚ w oparciu o zbadanie próbek terenowych wykazała lepszą efektywność monitoringu biernego u dzików padłych w porównaniu do monitoringu czynnego u dzików odstrzelonych.

Według Doktorantki w Polsce, w latach 2014 – 2016, zakażenia wirusem APŚ występowały wzdłuż wschodniej granicy rozprzestrzeniając się w kierunku południowym i zachodnim. Podjęte środki zwalczania i zapobiegania szerzeniu się choroby w Polsce pozwoliły na centralizację obszaru zakażonego do terenu 10 powiatów zlokalizowanych na obszarze trzech województw: podlaskiego, lubelskiego i mazowieckiego. Z danych przedstawionych w 2015 roku przez EFSA wynika, że APŚ w populacji dzików w Polsce i na Litwie szerzył się wolniej w porównaniu do Łotwy i Estonii, co może wynikać z różnego ukształtowania terenu oraz występowania specyficznych kompleksów leśnych i rolniczych, które sprzyjają bytowaniu dzików i utrudniają walkę z chorobą. W przypadku Jeziora Siemianowskiego wykazano czasowy hamujący wpływ naturalnych barier geograficznych na rozprzestrzenianie się wirusa APŚ.

Bez wątpienia na uwagę zasługuje dyskusja podsumowująca przedstawione wyniki badań. Jest ona wielowątkowa i bardzo szczegółowa. W trakcie omawiania poszczególnych wyników badań Autorka stara się konfrontować je z danymi literaturowymi. Warto podkreślić, że Doktorantka podjęła się dość trudnej roli krytycznej interpretacji uzyskanych wyników badań i obserwacji.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań z zakresu walidacji testów serologicznych oraz molekularnych pozwoliły na bardziej wnikliwą ocenę sytuacji epidemiologicznej APŚ nie tylko w Polsce, ale także w niektórych krajach sąsiadujących. Ze względu na specyfikę choroby (100% śmiertelność u świń i dzików, brak szczepionek) oraz znaczenie gospodarcze (brak możliwości eksportu) diagnostyka APŚ staje się celem nadrzędnym, szczególnie w rejonach zagrożonych oraz sąsiadujących z nimi. Stąd też optymalizacja metod diagnostycznych zarówno serologicznych jak i molekularnych pod względem takich parametrów jak czułość, specyficzność, powtarzalność i odtwarzalność jest ze wszech miar bardzo potrzebna i oczekiwana. Warto podkreślić, że w Krajowym Laboratorium Referencyjnym ds. APŚ PIWet-

PIB w Puławach w latach 2014-2016 metodą molekularną zbadano ponad 125000 świń i około 45000 dzików, serologicznie zaś 20000 świń i 20000 dzików. Obecność DNA wirusa APŚ stwierdzono u 185 świń i 208 dzików. W teście komercyjnym ELISA (INGENASA) wynik dodatni lub wątpliwy stwierdzono u 61 świń i 1031 dzików. Badania potwierdzające testem IB lub IPT wykazały obecność przeciwciał tylko u 16 świń i 42 dzików, co może świadczyć o niejednoznaczności wyników uzyskanych w teście ELISA. Badania Doktorantki potwierdziły, że niewielki odsetek wyników dodatnich lub wątpliwych uzyskanych w komercyjnym teście serologicznym mogły być definitywnie potwierdzone bardziej czułym testem IB lub IPT. W przypadku świń odsetek wyników potwierdzonych wynosił 26,23%, w przypadku dzików tylko 4,07% zwierząt badanych przy użyciu IB lub IBT. Doktorantka tłumaczy ten fakt jakością przeznaczonych do badania próbek krwi. W badaniach własnych wykazała bowiem, że procent wyników niepotwierdzonych dla dzików odstrzelonych wyniósł 96,39%, powypadkowych 96,77% i padłych 92,04%, co w każdym przypadku związane było ze znaczną hemolizą próbek krwi. Podobne wnioski wyprowadzili w wyniku swoich badań także badacze hiszpańscy, którzy stwierdzili wyraźną korelację pomiędzy wynikami fałszywie dodatnimi, a stopniem hemolizy próbek krwi. Reasumując należy stwierdzić, że wyniki badań serologicznych w dużym stopniu uzależnione są od jakości próbek krwi, dostarczonych do badania w kierunku APŚ.

W badaniach własnych Doktorantka wykazała natomiast, że wyniki badań molekularnych uzależnione są w głównej mierze od rodzaju materiału biologicznego, przeznaczonego do badania diagnostycznego w kierunku APŚ. Najczęściej stosowanym materiałem jest krew, ze względu na jej przydatność do badań różnymi metodami zarówno serologicznymi, jak też molekularnymi. Ponadto do badań w kierunku APŚ u świń stosuje się narządy wewnętrzne, węzły chłonne, migdałki, szpik kostny, a nawet mięśnie; u dzików zaś narządy wewnętrzne, szpik kostny, migdałki i węzły chłonne. Analiza wykonana przez Doktorantkę wykazała, że wirus APŚ może występować zarówno w narządach, jak też we krwi zakażonych świń. Na uwagę zasługuje fakt, że wykrywalność DNA wirusa APŚ we krwi i narządach i/lub kościach wynosi 100%. Tymczasem wykrywalność wirusa we krwi zakażonych świń wynosi 94,08%; u dzików padłych i powypadkowych 71,43% oraz u dzików odstrzelonych 32,56%. Podobne wyniki badań uzyskali autorzy zajmujący się diagnostyką wirusa APŚ w innych krajach Europy Wschodniej.

Znaczną część Dyskusji Doktorantka przeznaczyła na analizę, z uwzględnieniem wyników własnych, sytuacji epidemiologicznej oraz prognozach jej dalszego rozwoju w czasie i przestrzeni. Wynika z niej, że w latach 2014-2016 obserwowano powolne, ale konsekwentne

szerzenie się choroby nie tylko w Polsce, ale także w krajach nadbałtyckich. Doświadczenia tych trzech lat dowodzą, że źródłem zakażenia mogą być zarówno dziki jak i świnie, chociaż za pierwotne źródło infekcji w Polsce uznano dziki, przy udziale których choroba rozprzestrzeniła się raczej na niewielkie odległości. Podobna sytuacja miała miejsce w krajach nadbałtyckich Litwie, Łotwie i Estonii. W kolejnej fazie rozprzestrzeniania się APŚ w Polsce miała miejsce transmisja wirusa do świń domowych bezpośrednio przy udziale dzików lub za pośrednictwem człowieka.

W celu dokładniejszego poznania szerzenia się wirusa APŚ u dzików na różnych obszarach Doktorantka podjęła próbę oceny prewalencji miesięcznej, rocznej oraz sezonowej i wykazała, że częstość występowania prewalencji rocznej i miesięcznej była wyższa u dzików padłych niż u zwierząt odstrzelonych. Prewalencja sezonowa u dzików padłych była na obszarze całego kraju najwyższa latem, a na obszarze rzeczywistym zimą; najniższa zaś na wszystkich analizowanych obszarach w okresie wiosennym i jesiennym.

Warte odnotowania i podkreślenia są przeprowadzone analizy statystyczne dotyczące oceny ryzyka rozprzestrzeniania się APŚ w kraju w kontekście odstrzału dzików, jak również w kontekście legalnego przemieszczania świń z państw nadbałtyckich na terytorium Polski.

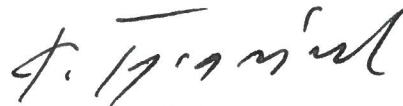
Analiza czasowo-przestrzenna występowania zakażeń wirusem APŚ wykazała, że do szerzenia się choroby w Polsce przyczyniły się dziki, świnie domowe oraz człowiek, nieprzestrzegający zasad bioasekuracji. Doktorantka konkluduje, że w latach 2014 – 2016 w Polsce miały miejsce cztery prawdopodobne drogi szerzenia się choroby: dzik – dzik, dzik – świnia domowa, świnia – świnia i świnia domowa – dzik.

Rozprawa doktorska mgr inż. Edyty Kozak została prawidłowo zaplanowana, konsekwentnie zrealizowana i przedłożona do recenzji jako obszerna monografia przedstawiająca wybrane aspekty diagnostyki laboratoryjnej i oceny sytuacji epidemiologicznej APŚ w ciągu pierwszych trzech lat od wystąpienia choroby w Polsce tj. 2014-2016. Autorka zrealizowała założone cele pracy i uzyskała wartościowe wyniki, które pozwoliły na prawidłowe sformułowanie aż 11 wniosków.

Podsumowując całokształt rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Kozak stwierdzam, że wyniki pracy, oprócz aspektu poznawczego, mają ogromną wartość aplikacyjną, szczególnie w odniesieniu do diagnostyki laboratoryjnej afrykańskiego pomoru świń. Monografia ta stanowi

cenne źródło informacji nt. optymalnych metod diagnostyki serologicznej oraz molekularnej APŚ, jak również wielu ważnych aspektów epidemiologii tej groźnej choroby świń.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Edyty Kozak odpowiada warunkom stawianym na stopień doktora nauk w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 2 i 4 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Komisji Przewodów Doktorskich Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr inż. Edyty Kozak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Kazimierz Tarasiuk