

Recenzja

**Rozprawy doktorskiej lek. wet. Marka Walczaka, na temat
„Chorobotwórczość krajowego szczepu wirusa afrykańskiego pomoru świń”,
wykonanej w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym pod kierunkiem
prof. dr hab. Grzegorza Woźniakowskiego oraz dr Macieja Franta**

Pojawienie się wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASFV) w Gruzji w 2007 roku stanowiło początek euroazjatyckiej epizoozji afrykańskiego pomoru świń (ASF), która stopniowo rozprzestrzeniła się na coraz to nowe regiony Europy i Azji, wstrząsając globalnym rynkiem świń i wieprzowiny. W odróżnieniu do sytuacji z lat 1980-tych i 1990-tych kiedy to klasyczny pomór świń (CSF) stanowił główny problem epizootyczny w produkcji trzody chlewnej, sytuacja z ASF w wielu krajach wydaje się niemożliwa do opanowania przy użyciu obecnie dostępnych narzędzi. Stopniowe uwalnianie regionów i krajów od CSF było możliwe dzięki wysokiej skuteczności szczepionek żywych przeciw wirusowi CSF (CSFV) a następnie wprowadzeniu szczepionek markerowych. W przypadku ASF możemy jedynie obserwować rozwój epizoozji i dążyć metodami administracyjnymi do ograniczenia jej skutków ekonomicznych. Przykłady Czech i Belgii, gdzie eradykacja ASF się powiodła, wskazują, że szybka i zdecydowana reakcja administracji weterynaryjnej może być w pełni skuteczna. Niestety nie miało to miejsca w Polsce, a wprowadzone restrykcje, obostrzenia i nakładane na hodowców obowiązki nie zdały egzaminu. Skokowe przenoszenie się wirusa na duże odległości wskazuje jednoznacznie na rolę człowieka w transmisji patogenu. Najwyraźniej zawodzi więc edukacja na temat choroby i jej znaczenia wśród rolników, hodowców, myśliwych i zwykłych konsumentów wieprzowiny i dziczyzny. Popularne są za to teorie spiskowe czy propaganda „obrońców zwierząt”, podważająca sens redukcji populacji dzików.

Niestety opracowanie skutecznych i bezpiecznych szczepionek przeciw ASF, umożliwiających różnicowanie zwierząt zakażonych od szczepionych wciąż wydaje się odległą perspektywą, mimo obiecujących wyników badań naukowych. Trudności te wynikają z niezwykle złożonej budowy ASFV, którego genom ma wielkość do około 190 tysięcy par zasad i koduje 150-200 białek. Dla porównania genom CSFV ma wielkość około 13 tysięcy nukleotydów i koduje tylko jedną poliproteinę. Niezwykle ważnym elementem walki z ASFV jest więc coraz lepsze

poznawanie biologii i ekologii tego wirusa oraz jego interakcji z organizmem świni. Niestety badania takie są kosztowne, między innymi ze względu na warunki jakie muszą spełniać pomieszczenia dla zwierząt i laboratoria do prac z tym wirusem. Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach jest jedynym w Polsce miejscem gdzie takie badania można prowadzić. W związku z powyższym przedmiot i temat recenzowanej pracy doktorskiej lek. wet. Marka Walczaka „Chorobotwórczość krajowego szczepu wirusa afrykańskiego pomoru świń”, należy uznać za w pełni uzasadniony i ważny ze względów naukowych jak i z punktu widzenia praktyki lekarsko-weterynaryjnej.

Omówienie i ocena pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. wet. Marka Walczaka ma typowy układ i liczy 138 stron wraz z piśmiennictwem, rycinami i tabelami. Składa się z rozdziałów obejmujących wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenia, wykaz tabel i rycin i piśmiennictwo. Wymienione rozdziały są dodatkowo podzielone na liczne mniejsze podrozdziały. Tekst jest ilustrowany 22 tabelami, 26 rycinami i 18 fotografiami, a piśmiennictwo obejmuje 137 pozycji.

We wstępie Doktorant przedstawia historię ASF w Europie, w tym w Polsce, charakterystykę drobnoustroju, a także przebieg zakażenia oraz zasady rozpoznawania i zwalczania. W opinii recenzenta zbędny jest podział wstępu na aż 20 podrozdziałów, co nie ułatwia, a raczej utrudnia zapoznanie się z tekstem. Mimo, że w podrozdziale 1.5.1 dość dokładnie opisano przebieg zakażenia komórki, nie dowiadujemy się nic na temat mechanizmów replikacji ASFV. Doktorant poprzestaje na stwierdzeniu, że „replikacja zachodzi w przestrzeni okołojądrowej”.

Podrozdział „Odpowiedź immunologiczna” powinien zostać umieszczony w podrozdziale „Patogeneza”. Podrozdziały 1.5.2 i 1.5.3 rozdziału „Patogeneza” zawierają przecież opisy reakcji odpornościowych świń. Część informacji zawartych w podrozdziale 1.5.4 dotyczy zmian sekcyjnych i mikroskopowych. Takie ich rozmieszczenie powoduje niepotrzebne powielanie treści, na przykład dotyczących wybroczyn, wylewów krwawych itp. Podrozdział 1.6.2 „Objawy sekcyjne” należałoby raczej zatytułować „Zmiany sekcyjne” a podrozdział 1.6.3 „Obraz histopatologiczny” – „Zmiany mikroskopowe”. Niestety opisy zawarte w tych podrozdziałach dotyczą wyłącznie ostrych zmian „podręcznikowych”, podczas gdy w podrozdziale 1.6.1 „Objawy kliniczne” dowiadujemy się, że ich zakres może być bardzo szeroki. Czy ma to odzwierciedlenie w zmianach sekcyjnych i mikroskopowych? Podrozdział 1.8.1 „Diagnostyka lekarsko-weterynaryjna” powinien być zatytułowany „Diagnostyka

kliniczna”. Stwierdzenie o ograniczonej roli diagnostyki klinicznej w rozpoznawaniu ASF (podrozdział 1.8.1) może być nieco mylące. Przeczy temu również sam Doktorant w kolejnych zdaniach tego podrozdziału pisząc, że „każdy przypadek niewyjaśnionych padnięć lub gorączki o nieznannej etiologii powinien wzbudzić czujność służb weterynaryjnych”. Niestety wielu lekarzy weterynarii stale uważa, że można poprzestać na rozpoznaniu klinicznym. Prowadzi to w wielu przypadkach do poważnych, lub katastrofalnych, jak w przypadku ASF, skutków ekonomicznych. Prawidłowo przeprowadzone rozpoznanie kliniczne zawsze powinno kończyć się skierowaniem właściwych próbek do badania laboratoryjnego w określonym kierunku. Zapewne Doktorantowi chodziło o brak możliwości wykrycia ASF na podstawie badania klinicznego. Dowodzą tego również wartościowe wyniki przeprowadzonych badań opisanych w dysertacji. Biorąc pod uwagę, że bioasekuracja jest jedyną metodą zapobiegania ASF należy uznać, że podrozdział 1.9.4 dotyczący tego problemu został potraktowany zbyt ogólnie i czytelnik rozprawy nie dowie się nic o tym jakie zasady bioasekuracji powinny spełniać fermy świń aby zminimalizować ryzyko zawleczenia ASFV.

Jako cel pracy (strona 29) wskazano ocenę właściwości chorobotwórczych jednego z polskich szczepów ASFV. Doktorant wymienia dodatkowo sześć celów szczegółowych, które w opinii recenzenta trudno za takie uznać. Jest to raczej lista wybranych metod wykorzystanych w badaniach.

Materiał i metody przedstawiono na 16 stronach. Z opisu wynika, że badania przeprowadzono na 28 świniami podzielonych na trzy grupy zakażane donosowo różnymi dawkami wirusa i jedną grupę kontrolną. Niestety nie dowiadujemy się na jakiej podstawie wybrano takie a nie inne dawki zakażne. Grupa I otrzymała dwukrotnie wyższą dawkę niż grupa II, która z kolei otrzymała dawkę stukrotnie wyższą niż grupa III. Zwierzęta były obserwowane na obecność objawów klinicznych ASF oraz pobierano od nich próbki krwi, wymazy z odbytu i jamy ustnej (w wynikach i dyskusji określanych jako ślina). Pośmiertnie pobierano próbki narządów i płynów ciała. Pobrane próbki badano na obecność DNA ASFV i samego wirusa oraz swoistych przeciwciał, a próbki krwi poddawano całemu szeregowi badań hematologicznych i biochemicznych. Opis przeprowadzonych badań jest w większości bardzo szczegółowy, co zasługuje na pochwałę lecz podobnie jak w przypadku „Wstępu” rozdrobnienie na aż 28 podrozdziałów, z których niektóre zawierają po jednym zdaniu, nie ułatwia zadania czytelnikowi. Ponadto opisy niektórych metod są powielane w różnych podrozdziałach. Na przykład elementy opisu izolacji i namnażania ASFV w hodowli makrofagów płucnych świń pojawiają się, lub są powielone w podrozdziałach 3.1.2, 3.1.3, 3.7.1, 3.14.1 i 3.14.2. Z kolei

zawarty w podrozdziale 3.4 opis sekwencjonowania szczepu wykorzystanego w doświadczalnym zakażeniu, oraz analizy jego sekwencji, jest szczątkowy. Nie dowiadujemy się z niego jak przygotowywano biblioteki, jak je sekwencjonowano, przy użyciu jakich metod składano i jakimi metodami analizowano. W programie Geneious można wykorzystywać cały szereg algorytmów analiz genetycznych dostosowanych do określonych potrzeb użytkownika, a więc stwierdzenie ze strony 32, że „analizy filogenetyczne przeprowadzono przy użyciu programu Geneious” jest niewystarczające. Kontrastuje to ze szczegółowością opisu testu immunoperoksydazowego w podrozdziale 3.18 (strony 42-43), który jest metodą dość prostą, od lat powszechnie wykorzystywaną w wirusologii.

Opis wyników zawarto na 55 stronach co podkreśla ogrom uzyskanego w wyniku przeprowadzonych badań materiału. Analiza genetyczna polskiego szczepu wykorzystanego w badaniach wykazała jego bliskie podobieństwo do innych szczepów izolowanych w Polsce, za wyjątkiem szczepu Pol/2015/Podlaskie, który był bliżej spokrewniony z wirusami z Rosji i Gruzji. Podpis pod ryciną 4 na stronie 47 przedstawiającą kladogram jest zbyt oszczędny i brak w nim ważnych informacji na temat metod wykorzystanych w rekonstrukcji pokrewieństwa analizowanych sekwencji. Szczególnie zaskakujący jest dystans filogenetyczny sekwencji Pol/20165/Podlaskie i pozostałych sekwencji z Polski. Szkoda, że Doktorant nie podjął i szerzej nie omówił tego aspektu w dyskusji.

Objawy kliniczne u zakażonych zwierząt opisano dość szczegółowo i były one zróżnicowane w obrębie wszystkich grup, podobnie jak przeżywalność po zakażeniu. Okres inkubacji wahał się od 4 do 20 dni. Podobne było zróżnicowanie zmian sekcyjnych i mikroskopowych. Jeśli chodzi o wykrywalność ASFV w real time PCR w różnych materiałach biologicznych to ogólnie najniższe wartości Ct uzyskano w badaniu surowicy, podczas gdy materiały alternatywne jak wymazy z odbytu czy jamy ustnej dawały często wyniki powyżej Ct 30, czy nawet zbliżające się do Ct 40, co podkreśla znaczenie krwi jako najlepszego materiału diagnostycznego. Podobnie jak w przypadku objawów i zmian makro- i mikroskopowych wyniki real-time PCR były zróżnicowane w obrębie grup. W rozdziale 4.8 Doktorant opisał wyniki oznaczania poziomu ASFV w różnego rodzaju próbkach w oparciu o ilościowy real-time PCR, które przedstawił na wykresie (Rys. 14, strona 70). Podczas gdy poziomy wirusa we krwi i wymazach z jamy ustnej nie różniły się między grupami, to w przypadku kału i moczu najwyższe miana wirusa osiągał w grupie zakażonej najniższą dawką. Niestety nie dowiadujemy się czy ta różnica była statystycznie istotna. Różnice w zawartości ASFV stwierdzono również w niektórych narządach wewnętrznych i podobnie jak w przypadku próbek pobieranych

przyżyciowo nie wyjaśniono czy były one statystycznie istotne. Ważną obserwacją stanowiło stwierdzenie u niektórych świń wiremii i obecności ASFV w kale i wymazach z jamy ustnej zanim doszło do wystąpienia gorączki. Jest to niezwykle ważne z praktycznego punktu widzenia i dowodzi fundamentalnej roli ścisłego przestrzegania zasad bioasekuracji w ograniczaniu rozprzestrzeniania się ASFV. Wykrywalność przeciwciał była zmienna w obrębie grup a pojawiały się one od 13-18 dnia po zakażeniu, i po 2-5 dniach od wykrycia wiremii.

Jeśli chodzi o zmiany we wskaźnikach białokrwinkowych to w początkowym stadium choroby doszło ich podwyższenia, a następnie obniżenia. We wszystkich grupach stwierdzono stopniowy spadek stężenia hemoglobiny i liczby płytek krwi, lecz tylko ta pierwsza wartość uległa obniżeniu poniżej poziomu uznanego za prawidłowy. Nie stwierdzono istotnych zmian w średnich wartościach poziomu ALT i GGT oraz albumin, podczas gdy poziom AST był istotnie podwyższony w ostatnich dwóch życia z wiremią. Poziom kinazy kreatynowej wzrósł jedynie w grupach zakażonych 1000 i 500 HAU wirusa, chociaż wzrost ten był statystycznie istotny jedynie w tej drugiej grupie. Podwyższenie poziomu kreatyniny dotyczyło tylko grupy, którą zakażono najwyższą dawką a poziom mocznika był podwyższony we wszystkich grupach.

W dyskusji na stronie 102 Doktorant stwierdza, że duże różnice w obrębie grup doświadczalnych obserwowane w przypadku większości analizowanych wskaźników mogą wynikać z nieskutecznej inokulacji donosowej. Wyjaśnia to dlaczego obserwacje odnoszono do pierwszego dnia wykrytej wiremii. Niemniej, pod znakiem zapytania stawia to analizy pod kątem otrzymanej dawki wirusa, która u niektórych świń była różna od dawki teoretycznie podanej.

Rozprawa jest podsumowana 8 wnioskami, z których niektóre wymagają doprecyzowania lub usunięcia. Na przykład wniosek 1, choć najprawdopodobniej prawdziwy, nie wynika z badań opisanych w dysertacji. Analizie poddano niewiele sekwencji i nie wyjaśniono odrębnego grupowania pierwszego polskiego szczepu z 2014 roku. We wniosku 2 Doktorant pisze, że dawka zakaźna nie wpływa na obraz choroby. Stoi to w sprzeczności z wyżej wyrażonym przypuszczeniem, że nie wszystkie świny uległy zakażeniu donosowemu.

Wniosek końcowy

Lek. wet. Marek Walczak zrealizował nakreślone w celach rozprawy zadania badawcze i uzyskał wyniki, które stanowią oryginalny wkład autora w rozwój wiedzy na temat patogenezы i diagnostyki ASFV na przykładzie polskiego szczepu wirusa. Autor wykazał dużą zmienność

w zakresie objawów klinicznych, siewstwa i śmiertelności między osobnikami zakażonymi polskim szczepem ASFV, oraz że klinicznie zdrowe świnię mogą siać wirus.

Recenzowana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w świetle przepisów ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Przedkładam zatem Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Tomasz Stadejek