

Recenzja rozprawy doktorskiej
lek. wet. Marka Walczaka
„Chorobotwórczość krajowego szczepu wirusa afrykańskiego pomoru świń”

Afrykański pomór świń jest wysoce zakaźną, chorobą wirusową świń i wędzarniczych, której czynnikiem etiologicznym jest wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV), należący do rodziny *Asfarviridae*.

Choroba występuje na całym świecie i jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych w hodowli trzody chlewnej. W Polsce zwalczana jest z urzędu. W związku z tym badania poświęcone zakażeniom ASFV, mechanizmom chorobotwórczości oraz drogom szerzenia się wirusa wydają się być w pełni uzasadnione.

W przesłanej do oceny pracy doktorskiej lek wet Marek Walczak przedstawił wyniki badań poświęconych chorobotwórczości krajowego szczepu ASFV.

Układ redakcyjny ocenianej dysertacji odpowiada wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 138 stron wydruku komputerowego, w tym wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz tabel i figur i piśmiennictwo. Dokumentacja jest bardzo bogata i obejmuje 22 tabele, 26 rycin i 18 fotografii umiejętnie włączonych w tekst pracy.

Praca porusza interesujące zagadnienia zarówno z praktycznego, jak i naukowego punktu widzenia. Dotyczy choroby o dużym znaczeniu ekonomicznym, stanowiącej zagrożenie dla hodowli trzody chlewnej na świecie. Fakt, iż mimo podjętych szerokich prób opanowania ognisk ASF, choroba w dalszym ciągu notowana jest w 24 krajach na świecie stanowi wystarczający i uzasadniony powód podjęcia przez Doktoranta badań. Decyzję o realizacji przedstawionych w pracy badań podjął on z pełną świadomością spodziewanych trudności zwłaszcza związanych z nakładem pracy oraz interpretacją znacznej ilości wyników badań klinicznych, hodowlanych, cytometrycznych, serologicznych i molekularnych, ale i z nadzieją że wyniki przeprowadzonych badań przyczynią się do lepszego poznania chorobotwórczości szczepu ASFV izolowanego na obszarze Polski.

Dotychczasowe opracowania dotyczące patogenezы i chorobotwórczości szczepów ASFV odnoszą się w większości do innych genotypów wirusa aniżeli genotyp II, który był przedmiotem badań lek. wet. Marka Walczaka. Ponieważ genotyp II ASFV szerzy się obecnie dynamicznie w populacji świń w Europie, istnieje konieczność zgłębienia mechanizmów jego chorobotwórczości, jak i prowadzenia monitoringu choroby przez niego wywołanej. Dlatego, tym bardziej podjęte przez Doktoranta badania wydają się uzasadnione i wartościowe.

Badania zawarte w przedstawionym do oceny doktoracie stanowią pierwsze tak szczegółowe opracowanie dotyczące właściwości chorobotwórczych rodzimego szczepu ASFV. Zaprezentowane wyniki dowiodły, że jeden izolat wirusa może być odpowiedzialny za wystąpienie różnych form choroby, co ma istotne znaczenie dla monitoringu i zwalczania ASF. W tym kontekście podjęcie przez lek. wet. Marka Walczaka badań dotyczących zagadnień zaprezentowanych w tytule pracy należy uznać za trafne i w pełni uzasadnione zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym, mogących mieć znaczenie dla poprawy monitoringu afrykańskiego pomoru świń w populacji trzody chlewnej.

Pracę rozpoczyna, poprzedzony wykazem skrótów, osiemnastostronicowy wstęp, w którym Doktorant przedstawił szczegółowo sytuację epizootyczną choroby na świecie, opisał jej czynnik etiologiczny, drogi szerzenia, objawy kliniczne, zjawiska odpornościowe zachodzące w organizmach zakażonych osobników, a wreszcie metody rozpoznawania ASF oraz możliwości profilaktyki choroby.

Wstęp jest dosyć obszerny, a jego układ w mojej ocenie mógłby wyglądać nieco inaczej. Bardziej logicznym byłoby połączenie podrozdziału 1.1. „Rys historyczny i geograficzny” z podrozdziałem 1.2. „Zarys sytuacji epidemiologicznej w Polsce” w jeden, który mógłby być zatytułowany np. „Sytuacja epidemiologiczna choroby na świecie”.

W podrozdziale 1.9 Wstępu, „Zwalczanie i zapobieganie”, Doktorant opisał metody zwalczania ASF na drodze administracyjnej oraz przedstawił możliwości zapobiegania chorobie. Umiejętnie przedstawił problemy dotyczące opracowania skutecznych szczepionek przeciwko chorobie. Zbyt lakonicznie moim zdaniem, w podrozdziale tym przedstawione zostały zasady bioasekuracji. W zasadzie Autor opisał tu jedynie cechy jakie posiadać powinien dobry środek dezynfekcyjny nie odnosząc się do dostępnych na rynku polskim substancji/preparatów, które są w stanie skutecznie inaktywować ASFV.

Wstęp wskazuje na dobrą znajomość przez Doktoranta badanej tematyki i piśmiennictwa. Jest on tak napisany, że uzasadnia celowość prowadzenia zaproponowanych

przez Doktoranta badań i pozwala na sformułowanie ich ostatecznego celu, który logicznie wypływa z przedstawionego we wstępie opisu.

Celem pracy była ocena właściwości chorobotwórczych szczepu ASFV izolowanego na terenie Polski, w oparciu o wyniki: analizy molekularnej, oraz szeroko pojętych badań *in vivo* i *in vitro*. Dodatkowo lek wet Marek Walczak oceniał siewstwo wirusa z wydzielinami i wydaliniami, określał miano wirusa w poszczególnych tkankach, wydzielinach i wydalinach, a także badał odpowiedź immunologiczną u zwierząt poddawanych zakażeniu zjadliwym szczepem ASFV.

W Rozdziale „Materiały i Metody”, liczącym 16 stron Autor opisał użyte w pracy materiały oraz metodyki badawcze. Przedstawił metody: hodowli wirusa *in vitro*, zakażenia świń pełnozjadliwym szczepem ASFV, metodykę prowadzenia badań hematologicznych, biochemicznych, histopatologicznych, molekularnych, serologicznych oraz cytometrycznych.

W podrozdziale 3.1.3. „Warunki hodowli”, nie podano jakie antybiotyki były dodawane do płynu odżywczego w celu ochrony hodowli przed zakażeniami bakteryjnymi i grzybiczymi.

Na str. 36 w podrozdziale 3.8. „Punktacja „clinical score” w opisie ocenianych parametrów należy doprecyzować, że oceniano wydalanie kału, a nie np. moczu. Doktorant nie podał numeru zgody Lokalnej Komisji Etycznej odnośnie możliwości prowadzenia badań na zwierzętach. W podrozdziale 3.10 „Seksja” napisano, iż oceniano wygląd powłok wewnętrznych. Nie ma w organizmie takich struktur jak powłoki wewnętrzne- należałoby doprecyzować jakie struktury były oceniane. W podrozdziale 3.17.1 należy poprawić, iż badano stężenie CRP, a nie poziom.

Wyjaśnienia wymaga dlaczego Doktorant wykorzystał do badania nasilenia reakcji zapalnej u świń zakażonych ASFV stężenie białka CRP, a nie inne, bardziej odpowiednie dla przedstawicieli tego gatunku markery jak HP (haptoglobina), MAP (główne białko ostrej fazy świń), czy SAA (amyloid A). Białka ostrej fazy cechuje różna przydatność w monitorowaniu stanów zapalnych u zwierząt w zależności od ich gatunku, dlatego w diagnostyce stanów patologicznych należy stosować białka swoiste dla poszczególnych gatunków zwierząt.

Ogólnie rozdział „Materiał i Metody” napisany jest bardzo przejrzyście, dzięki czemu badania przeprowadzone przez Doktoranta mogą być bez większego problemu powtórzone przez innych badaczy. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo jasno i rzeczowe opisanie badania cystometrii przepływowej

Wyniki stanowią najbardziej rozbudowaną część doktoratu. Zostały one przedstawione na 55 stronach tekstu, w który umiejętnie włączono ryciny i tabele, starannie opracowane i czytelne.

W pierwszej części wyników Autor przedstawił różnice genetyczne pomiędzy szczepami krajowymi i zagranicznymi wirusa, czego graficznym przedstawieniem było drzewo filogenetyczne. Doktorant wykazał różnice w sekwencjach nukleotydowych poszczególnych szczepów ASFV, jednak dla pełnej ich charakterystyki i określenia, czy mutacje w sekwencjach nukleotydowych są mutacjami cichymi, czy też przekładają się na zmiany sekwencji aminokwasowych, należałoby przepisać sekwencje nukleotydowe, na aminokwasowe i przeprowadzić podobną ich analizę.

W dalszej części Wyników Doktorant wykazał, że ASF może przebiegać w trzech postaciach, przy czym nie stwierdzono, by dawka zakaźna (poza osobnikami w grupie trzeciej) istotnie wpływała na przebieg choroby. Nie stwierdził On także istotnych statystycznie różnic w średniej długości życia zwierząt z wiremią w poszczególnych grupach, natomiast średnie okresy inkubacji choroby w grupach zwierząt zakażonych niższymi dawkami wirusa były dłuższe od średniego okresu inkubacji choroby w grupie 1 (zakażanych dawkami o najwyższym mianie wirusa).

Przy określaniu śmiertelności w poszczególnych grupach nasuwa się pytanie dlaczego Doktorant oceniał ją w 11 dpi, a nie na końcu trwania doświadczenia? Takie podejście stworzyło wrażenie, iż najwyższa dawka zakaźna wirusa (grupa I) indukuje jednocześnie najwyższe upadki (tak faktycznie było w 11 dniu po zakażeniu), aczkolwiek, gdy spojrzymy na całość doświadczenia, okazuje się, że najwyższa śmiertelność wystąpiła w grupie trzeciej. Jeżeli Doktorant chciał wykazać korelację pomiędzy dawką zakaźną, a szybkością pojawiania się upadków informację tą należało odpowiednio uwypuklić w tekście pracy i tytule podrozdziału.

Podrozdział 4.5. należało zatytułować „Zmiany sekcyjne”, a nie „Objawy sekcyjne”. W tekście i tabeli 8 odnoszącej się do tego rozdziału wskazanym byłoby użyć poprawnej terminologii medycznej i anatomicznej. Zamiast „spelnomegalia” – „powiększenie śledziony”, zamiast „przekrwiony migdał”- „przekrwiony migdałek”

W rozdziale III Wyników, Autor prezentuje rezultaty badań molekularnych opisując zarówno w tekście pracy, jak i przedstawiając na wykresach zależność pomiędzy średnimi wartościami cyklu progowego (Ct), a liczbą dni po zakażeniu, po których DNA wirusa było

wykrywane w tkankach, wydzielinach i wydalinach zwierząt. Wartościowym uzupełnieniem tej części pracy byłoby przedstawienie krzywej amplifikacji DNA, na której można by przedstawić dynamikę narastania ilości kopii wirusowego DNA w poszczególnych cyklach real-time PCR i z której można by odczytać wartość Ct.

Również w tej części pracy wnoszę uwagę do stosowanej przez Doktoranta terminologii. O ile w języku potocznym możemy posługiwać się zwrotem „poziom wirusa”, to w pracach naukowych powinniśmy być bardziej precyzyjni i stosować określenie „miano wirusa”.

Na stronie 70 w rozdziale 4.8.2. tekst pracy odnosi się do Ryciny 14, a nie 16.

Kolejne podrozdziały wyników odnoszą się do siewstwa ASFV oraz zmian w parametrach hematologicznych i biochemicznych surowicy oraz stężenia białka C-reaktywnego u świń po zakażeniu pełnozjadliwym szczepem wirusa.

W podrozdziale 4.9.1. „Siewstwo w ASFV w kale, ślinie i moczu” Doktorant prezentuje dane dotyczące pojawiania się wirusowego DNA w krwi, kale i ślinie, ale nie w moczu, ograniczając się jedynie do stwierdzenia: „Biorąc pod uwagę wyniki wykrywalności, istnieje prawdopodobieństwo, że siewstwo wirusa następuje również poprzez mocz”. Jeżeli badania w tym zakresie nie były przeprowadzone, nie należało w tytule podrozdziału uwzględniać moczu jako materiału z którym może dochodzić do siewstwa wirusa. Jeżeli natomiast Doktorant dysponuje odpowiednimi danymi, powinny być one włączone do tekstu.

Na stronie 73, lek. wet. Marek Walczak pisze „wzrost wirusa widoczny był...”. Wirus nie rośnie, a jedynie replikuje, bądź narasta jego miano, dlatego sugerowałbym odpowiednie przeredagowanie tej części tekstu.

W rozdziale poświęconym zmianom hematologicznym i biochemicznym Doktorant wykazał, iż liczba leukocytów u większości świń po zakażeniu spada wraz z długością trwania wirerii, podobnie jak stężenie hemoglobiny. Także u większości zwierząt pod koniec okresu wirerii notowano wzrost aktywności AST i ALT. Nie wykazał On istotnych statystycznie różnic w stężeniu albumin pomiędzy grupami świń chorych, a zdrowych. Pod koniec okresu wirerii notowano natomiast wzrost aktywności kinazy kreatynowej (grupa II), stężenia kreatyniny i mocznika (grupa I). Stale utrzymujące się podwyższone stężenie CRP Doktorant notował w grupie I od czwartego dnia wirerii, natomiast w grupie II i III już od pierwszego dnia wirerii. Jest to zadziwiające, ponieważ wydawałoby się, że świnię zakażane

większa dawka wirusa powinny szybciej reagować wzrostem stężenia CRP w surowicy, aniżeli osobniki zakażane niższą dawką patogenu. W badaniach przedstawionych przez lek. wet. Marka Walczaka mamy sytuację odwrotną.

W rozdziale V wyników Doktorant zaprezentował wyniki badania serologicznego i cytometrycznego. Wykazał On, że przeciwciała przeciwko ASF u zakażonych świń pojawiały się średnio 3-4 dni po wykryciu wirusa we krwi tj. od 2 do 5 dnia wirerii. Z kolei nie stwierdził istotnych statystycznie zmian w liczbie limfocytów B, pomiędzy zwierzętami grup badanych, a grupy kontrolnej. Istotny statystycznie spadek liczby limfocytów T dotyczył tylko zwierząt grupy III.

W liczącym 9 stron rozdziale „Dyskusja” Doktorant podkreślił, że przeprowadzone badania są jednymi z pierwszych dotyczących przebiegu klinicznego ASF indukowanego zakażeniami genotypem II wirusa.

Lek. wet. Marek Walczak, poprawnie i umiejętnie podjął próbę krytycznej analizy i oceny uzyskanych wyników, konfrontując je z literaturą źródłową. Dowiódł nie tylko bardzo dobrej znajomości badanej problematyki, ale również umiejętności weryfikacji wyników badań własnych w kontekście wyników uzyskanych przez innych autorów. W tej części pracy Doktorant w zasadzie przedyskutowała każdy aspekt prowadzonych badań – od badania klinicznego, badań hematologicznych i biochemicznych, serologicznych, a także badań molekularnych, aż po badania anatomo-patologiczne. W wielu miejscach w tej części pracy, Autor powtarza jednak wyniki badań własnych, które były już prezentowane wcześniej, zamiast skupić się wyłącznie na skonfrontowaniu ich z obserwacjami innych autorów.

Praca zakończona jest aż siedmioma wnioskami, które co prawda logicznie wynikają z kontekstu doktoratu, niemniej jednak ich liczba wydaje się zbyt duża. Sugerowałbym połączenie wniosku 1 i 3 w jeden, podobnie jak wniosków 2, 4 i 7.

Najbardziej wartościowym wydaje się wniosek nr 6, w którym lek wet Marek Walczak stwierdził, że najwyższe miano wirusa w organizmie zakażonych świń stwierdza się w szpiku, krwi narządach wewnętrznych, natomiast w kale i ślinie pojawia się on okresowo. Stwierdzenie to jest niezwykle istotne z punktu widzenia diagnostyki choroby i pozwala wytłumaczyć uzyskanie fałszywie ujemnych wyników badania przyżyciowego u osobników zakażonych ASFV.

Pracę kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bogaty wykaz piśmiennictwa krajowego i zagranicznego, (liczy 137 pozycji), który świadczy o zdolności

doboru właściwych materiałów źródłowych do analizy wyników i dyskusji w ramach tematyki będącej przedmiotem badań.

Reasumując stwierdzam, że przedstawione w pracy zagadnienia stanowią ważne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej chorobotwórczości krajowego szczepu ASFV, przebiegu klinicznego i rozpoznawania ASF u świń. Uzyskane wyniki są w mojej ocenie wartościowe zwłaszcza z uwagi na fakt, iż jest to pierwsze tego typu pełne opracowanie dotyczące chorobotwórczości krajowego genotypu II ASFV. Praca zawiera elementy nowatorskie, została wykonana metodycznie poprawnie, a wyniki badań mają duże znaczenie poznawcze.

Oczywiście szczegółowa analiza rozprawy ujawnia pewne niedociągnięcia na które częściowo zwróciłem uwagę w treści recenzji

Autor powinien być bardziej precyzyjny w stosowaniu terminologii weterynaryjnej. np. na str. 22 i 23 zamiast „ataksja i konwulsje”, lepiej użyć słów „niezborność i drgawki”. Na str. 23 zamiast „Objawy krwotoczne” (nie ma takich) „zmiany krwotoczne”, na str. 24. zamiast „świnie były infekowane”, „świnie były zakażane”

Te i wcześniejsze uwagi mają w większości charakter porządkowy i nie wpływają na pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy. Doktorant włożył wiele pracy w wykonanie badań, wywiązując się w pełni z zadań określonych w celach badawczych.

W konkluzji stwierdzam, że praca doktorska pt.: **”Chorobotwórczość krajowego szczepu wirusa afrykańskiego pomoru świń”** 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, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet Marka Walczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 30 września 2020

prof. dr hab. Łukasz Adaszek
Lekarz weterynarii
20-470 Lublin, ul. Nalkowskich 104/22
tel. 502-703-622
Prof. dr hab. Łukasz Adaszek

603001