

Recenzja rozprawy doktorskiej
Lek. wet. Julii Kęsik-Maliszewskiej
„Ocena rozprzestrzenienia zakażeń wirusem
Schmallenberg (SBV) w populacji przeżuwaczy domowych,
wolno żyjących oraz w wektorze owadzi w Polsce”

Wirus Schmallenberg (SBV) należy do rodziny *Orthobunyavirus*. Wywoływana przez niego choroba występuje na całym świecie i jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych w hodowli bydła. Szacuje się, że częstość występowania zwierząt serologicznie dodatnich dla wirusa w populacji bydła może wynosić nawet 60%, dlatego wszelkie badania poświęcone zakażeniom SBV, mechanizmom chorobotwórczości oraz drogom szerzenia się wirusa wydają się być w pełni uzasadnione.

W przesłanej do oceny pracy doktorskiej lek. wet. Julia Kęsik-Maliszewska przedstawiła wyniki badań poświęconych ocenie rozprzestrzenienia się zakażeń na tle wirusa Schmallenberg (SBV) w populacji przeżuwaczy domowych, wolno żyjących oraz w wektorze owadzi w Polsce. Praca została przygotowana w formie cyklu publikacyjnego, na który składa się aż 8 artykułów, opublikowanych w czasopismach znajdujących się na liście filadelfijskiej.

Układ redakcyjny ocenianej dysertacji odpowiada wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 164 strony wydruku komputerowego, w tym: wykaz publikacji składających się na cykl, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, omówienie, wnioski, podsumowanie, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo i publikacje rozprawy doktorskiej.

Przygotowana została w postaci cyklu, 8 publikacji wieloautorskich o wysokim współczynniku IF (sumaryczny IF=14,061). Pięć z artykułów wchodzących w skład pracy opublikowano w czasopismach zagranicznych: *Transboundary and Emerging Diseases*, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *Journal of Wildlife Diseases*, *Viruses*, *Virus Genes*, natomiast trzy w czasopismach krajowych: *Journal of Veterinary Research*, *Polish Journal of Veterinary Science* oraz *Medycyna Weterynaryjna*.

Praca porusza interesujące zagadnienia zarówno z praktycznego, jak i naukowego punktu widzenia. Dotyczy choroby o dużym znaczeniu ekonomicznym, stanowiącej zagrożenie dla hodowli bydła na świecie. Fakt, iż mimo podjętych szerokich prób opanowania ognisk choroby Schmallengberg, w dalszym ciągu jest ona notowana na całym świecie, w tym w Polsce, stanowi wystarczający i uzasadniony powód podjęcia przez Doktorantkę badań. Decyzję o realizacji przedstawionych w pracy badań podjęła Ona z pełną świadomością spodziewanych trudności zwłaszcza związanych z nakładem pracy oraz interpretacją znacznej ilości wyników badań serologicznych, molekularnych, filogenetycznych ale i z nadzieją że wyniki przeprowadzonych badań przyczynią się do lepszej charakterystyki szczepów wirusa występującego w Polsce oraz i lepszego poznania sytuacji epidemiologicznej choroby w naszym kraju.

Na uwagę zasługuje ogrom materiału, jaki przebadala Doktorantka prowadząc badania zarówno na surowicy (pobieranej zarówno od zwierząt gospodarskich, jak i dzikich), nasieniu, owadach, jak i tkankach poronionych płodów. Doktorat jest bardzo rozbudowany i w mojej ocenie przeprowadzenie samych badań serologicznych byłoby wystarczające do tego, by Doktorantka mogła ubiegać się o stopień naukowy doktora.

Dotychczasowe opracowania dotyczące wirusa Schmallengberg odnoszą się w większości do prewalencji zakażeń tym patogenem w populacji bydła. Dlatego też badania Doktorantki należy uznać za nowatorskie, przyczyniające do lepszego poznania choroby i jej czynnika etiologicznego, zwłaszcza w aspekcie charakterystyki molekularnej polskich szczepów SBV.

W tym kontekście podjęcie przez lek. wet. Julię Kęsik-Maliszewską badań dotyczących zagadnień zaprezentowanych w tytule pracy należy uznać za trafne i w pełni uzasadnione zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym.

Pracę rozpoczyna, spis treści, wykaz skrótów i wstęp. Wstęp liczy 4 strony. Doktorantka przedstawiła w nim opis wirusa Schmallengberg i historię choroby przez niego wywoływanej, odnosząc się do obecnej sytuacji epizootycznej choroby Schmallengberg w Europie.

Ta część pracy wskazuje na dobrą znajomość przez Doktorantkę badanej tematyki. Całość wstępu jest tak napisana, że uzasadnia celowość prowadzenia zaproponowanych przez

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

Zakładanymi celami podjętych przez Doktorantkę badań były: określenie rozprzestrzenienia zakażeń SBV u przeżuwaczy domowych w Polsce na podstawie badań serologicznych bydła, owiec oraz kóz, ocena populacji zwierząt wolno żyjących, jako potencjalnego rezerwuaru SBV w Polsce, ocena obecności SBV w nasieniu buhajów w Polsce, określenie rozprzestrzenienia SBV w kuczmanach odławianych w ramach krajowego monitoringu entomologicznego i badań własnych, określenie zmienności genetycznej wirusa Schmallenberg w Polsce. Wszystkie one zostały zrealizowane, a wyniki zostały przedstawione w ośmiu publikacjach.

W artykule pierwszym „*Schmallenberg virus in Poland endemic or re-emerging? A six-year serosurvey.* (2021) Kęsik-Maliszewska J., Collins Á.B., Rola J., Blanco-Penedo I., Larska M.; *Transboundary and Emerging Diseases* 68, 2188– 2198, drugim: “*Potential use of hematological and acute phase protein parameters in the diagnosis of acute Schmallenberg virus infection in experimentally infected calves*”. (2019) Kęsik-Maliszewska J., Pomorska-Mól M., Collins Á. B., Rola J., Larska M.; *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 64, 146-152, i ósmym: “*Epizootologia wirusa Schmallenberg w Polsce*”. (2016) Kęsik-Maliszewska J., Larska M., Żmudziński J.F.; *Medycyna Weterynaryjna* 72(5), 275-280 Doktorantka określała rozprzestrzenienia zakażeń SBV u przeżuwaczy domowych w Polsce na podstawie badań serologicznych. Spośród 22 tysięcy przebadanych przeżuwaczy domowych, aż 37,5% reagowało serododatnio, przy czym prewalencja występowania przeciwciał dla SBV wahała się w poszczególnych latach obserwacji od 30 do 40%. Województwem o najwyższej seroprewalencji (61%) było podkarpackie. Bardzo interesującym z punktu widzenia epidemiologii choroby osiągnięciem było określenie dynamiki rozprzestrzeniania się SBV w kraju wskazujące na cykliczny wzrost seroprewalencji u przeżuwaczy gospodarskich, zwierząt indykatorowych i przeżuwaczy wolnożyjących co 3-4 lata. Należy przypuszczać, że wzrost ten był związany z naturalnymi zakażeniami, gdyż w Polsce nie były prowadzone szczepienia przeciw SBV. Ponadto Doktorantka wykazała, że cieplejsze wiosny oraz jesienie, i wyższa wilgotność wiosną oraz późnym latem oraz były istotnie związane z seroprewalencją SBV, co jest związane z większą aktywnością wektora choroby.

Bardzo istotnym efektem tej części badań było opracowanie wytycznych dotyczących prowadzenia monitoringu postepidemicznego SBV, który wg Doktorantki rekomenduje się

przewieźć w grupie zwierząt indykatorkowych, jałówek w wieku od 6 do 12 miesięcy. Próbkę do badań powinny być pobierane po każdym sezonie aktywności kuczmanów od zwierząt we wszystkich województwach.

W pracach: *“Epidemiology of Schmallenberg virus in European bison (Bison bonasus) in Poland”*. (2018) Kęsik-Maliszewska J., Krzysiak M.K., Grochowska M., Lechowski L., Chase C., Larska M.; *Journal of Wildlife Diseases* 54(2), 272-282, i: *“Were Polish wild boar exposed to Schmallenberg virus?”* (2017) Kęsik-Maliszewska J., Jabłoński A., Larska M.; *Journal of Veterinary Research* 61, 151-155, lek. wet. Julia Kęsik – Maliszewska dokonała oceny populacji zwierząt wolno żyjących, jako potencjalnego rezerwuaru SBV w Polsce. Doktorantka wykazała, że niektóre gatunki zwierząt dzikożyjących jak jeleniowate, czy żubry na określonych terenach mogą prawdopodobnie stanowić rezerwuar wirusa dla zwierząt gospodarskich o czym świadczy wysoki odsetek serologicznie dodatnich dla SBV osobników. W populacji żubrów było to 73,2% zwierząt, w populacji jeleniowatych 40% osobników. Spośród badanych zwierząt dzikożyjących najniższy odsetek osobników, u których w surowicy wykryto przeciwciała dla SBV stanowiły dziki (ok 1%), co wskazuje, iż ten gatunek nie stanowi rezerwuaru i nie odgrywa znaczącej roli w krążeniu SBV w środowisku sylwatyicznym. U żubrów, podobnie jak u zwierząt gospodarskich obserwowano występowanie cyklicznych wzrostów odsetka zwierząt serologicznie dodatnich podczas sezonów wzmożonego krążenia wirusa.

Piąta praca z cyklu składającego się na doktorat *„Detection of Schmallenberg virus RNA in bull semen in Poland”*. (2016) Kęsik-Maliszewska J., Larska M.; *Polish Journal of Veterinary Science* 19(3), 655-657, dotyczy badań nad wykrywaniem obecności SBV w komercyjnym nasieniu buhajów. Autorka przebadła 131 próbek nasienia, spośród których słabo dodatni wynik dla SBV uzyskała dla siedmiu z nich. Wyniki te jednoznacznie nie wskazują, czy nasienie może być źródłem zakażenia SBV, aczkolwiek sugerują, iż należy wziąć pod uwagę możliwość szerzenia się infekcji także drogą płciową. Dlatego też, aby zapobiec ewentualnej transmisji zakażenia w ten sposób, wydaje się, koniecznym poddawanie nasienia buhajów badaniom molekularnym na obecność SBV.

Prace: *“Epidemiology of Schmallenberg virus in European bison (Bison bonasus) in Poland”*. (2018) Kęsik-Maliszewska J., Krzysiak M.K., Grochowska M., Lechowski L., Chase C., Larska M.; *Journal of Wildlife Diseases* 54(2), 272-282 oraz *“Post-Epidemic Distribution of Schmallenberg virus in Culicoides arbovirus vectors in Poland”*, (2019) Kęsik-Maliszewska J., Larska M., Collins Á.B., Rola J.; *Viruses* 11(5), 447, odnoszą się do badań nad występowaniem SBV w kuczmanach odławianych w ramach krajowego monitoringu

entomologicznego i badań własnych. Owady pozyskiwano z trzech różnych środowisk: z pobliza obór zwierząt gospodarskich, z zagrody żubrów oraz z wnętrza obór.

W pierwszym środowisku odłowiono ogółem trzy miliony czterysta tysięcy sztuk kuczmanów w 24 lokalizacjach na terenie całego kraju. Owady pulowano, a spośród 5478 przygotowanych pul, 66 (1,2%) dało wynik SBV RNA dodatni. Istotnym osiągnięciem tej części badań było wykazanie obecności materiału genetycznego nie tylko w organizmie samic różnych gatunków *Culicoides*, lecz także po raz pierwszy u samców, co może wskazywać także na ich rolę w szerzeniu się zakażeń.

Częstotliwość występowania SBV w populacji kuczmanów pochodzących z zagrody żubrów była znacznie niższa, aniżeli w owadach odławianych z pobliza obór hodowlanych bydła (maksymalnie 3% pul owadów), natomiast w organizmie żadnego z kuczmanów pochwyconych w okresie zimowym we wnętrzu obór nie wykryto materiału genetycznego wirusa, co świadczy, że aktywność *Culicoides* wewnątrz obór w zimie jest bardzo ograniczona i ryzyko nowych infekcji przy udziale kuczmanów jest znikome, a przezimowanie SBV w populacji wektora może być związane raczej z obecnością uśpionego wirusa w postaciach młodocianych kuczmanów zakażonych transowarialnie.

Kolejny artykuł wchodzący w skład cyklu publikacji: „*Comparison of Schmallerberg virus sequences isolated from mammal host and arthropod vector*”. (2018) Kęsik-Maliszewska J., Antos A., Rola J. Larska M.; *Virus Genes* 54(6), 792-803, dotyczy badań nad zmiennością genetyczną wirusa Schmallerberg w Polsce. Doktorantka analizowała sekwencje genów z surowicy bydła: sekwencję segmentu S, segmentu M, segmentu L oraz 2 sekwencje hyper-zmiennego fragmentu (HVR) segmentu M z materiału pochodzącego z surowicy, z tkanek płodów owczych oraz z pul kuczmanów (w tym przypadku analizowano dodatkowo 7 sekwencji glikoproteiny N i 5 sekwencji glikoproteiny C). Analiza polskich oraz europejskich sekwencji izolowanych od przeżuwaczy potwierdziła wysoką stabilność genetyczną segmentów S oraz L; natomiast segment M zawierający zmienną genetyczną domenę glikoproteiny C (HVR) był najbardziej zmienny. Glikoproteina ta może stanowić czynnik wirulencji i odpowiada za hamowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Na uwagę zasługuje fakt, iż wszystkie sekwencje uzyskane w badaniach własnych zostały wprowadzone do internetowej bazy danych GenBank, a dodatkowo fragmenty genomu SBV wyizolowanego od owadów były pierwszymi tego rodzaju w bazie, co świadczy o oryginalności prowadzonych przez Doktorantkę badań.

Wyniki opublikowane przez Doktorantkę w cyklu publikacji pozwoliły Jej na wyciągnięcie aż 10 wniosków. Wniosek nr 1 i 2 powinny zostać połączone w jeden, podobnie jak wnioski 9 i 10.

Nie sposób nie zgodzić się z Doktorantką, że przeprowadzone przez Nią badania nad wirusem Schmallerberg pozwoliły na uzyskanie zbioru unikalnych w skali kraju i świata wyników dotyczących rozprzestrzenienia i charakterystyki tego nowego patogenu, a jednocześnie pozwalają na rewizję dotychczasowych i opracowania nowych wytycznych monitoringu SBV w kraju i na świecie. Mają więc także obok wartości naukowej, wartość praktyczną.

Reasumując stwierdzam, że przedstawione w pracy zagadnienia stanowią ważne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej wirusa Schmallerberg – zwłaszcza szerokokopiętej epidemiologii zakażeń przez niego wywoływanych. Prezentowane przez Doktorantkę badania zawierają elementy nowatorskie, zostały wykonane metodycznie poprawnie, a wyniki badań mają duże znaczenie poznawcze.

Oczywiście szczegółowa analiza rozprawy ujawnia pewne niedociągnięcia, czy niekonsekwencje, mają one jednak w większości charakter błędów edytorskich, a nie merytorycznych.

- Streszczenie w języku polskim i angielskim powinno znaleźć się na początku pracy, a nie dopiero po podsumowaniu jako Rozdział IX

- W tekst doktoratu niepotrzebnie został wkomponowany rozdział V. „Materiały i metody” Informacje w tym względzie zwarte są w artykułach wchodzących w cykl publikacyjny i nie ma potrzeby ich powtarzania.

- W tekście pracy należy unikać sformułowania „wirus SBV” (np. na stronie nr 22). SBV jest skrótem pochodzącym od „Schmallerberg virus”, dlatego umieszczanie przed skrótem polskiego słowa „wirus” brzmi trochę jak „masło maślane”.

- Tytuł opublikowanej pracy „Epidemiology of Schmallerberg virus in European bison (Bison bonasus) in Poland” nie odzwierciedla wyników badań prezentowanych w niej przez autorów. Wynika z niego, iż autorzy analizowali sytuację epidemiologiczną zakażeń SBV w populacji żubrów, podczas gdy faktycznie przeprowadzili także badania dotyczące wirusa u jeleniowatych oraz w populacji kuczmanów. Zdaję sobie sprawę, że zarzut ten adresowany powinien być w mniejszym stopniu do Doktorantki, a w większym do redakcji Journal of Wildlife Diseases, niemniej jednak jest to swojego rodzaju wskazówka dla Doktorantki, aby

w przyszłości baczniejszą uwagę poświęcała właściwemu przypisywaniu tytułu do prac naukowych, które będzie publikowała

Przedstawione uwagi mają w większości charakter porządkowy i nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy. Doktorantka włożyła wiele pracy w wykonanie badań, wywiązując się w pełni z zadań określonych w celach badawczych.

W konkluzji stwierdzam, że praca doktorska pt.: **"Ocena rozprzestrzenienia zakażeń wirusem Schmallenberg (SBV) w populacji przeżuwaczy domowych, wolno żyjących oraz w wektorze owadzi w Polsce"** 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. Julii Kęsik-Maliszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie w związku z tym, iż praca jest nowatorska dotyczy bardzo aktualnego problemu w hodowli bydła, a zaprezentowane w niej wyniki mają szansę być szeroko cytowanymi, (co po części już ma miejsce) wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej stosowaną nagrodę Dyrektora PIW-PIB w Puławach.

Lublin, 25 listopada 2021

Prof. dr hab. Łukasz Adaszek

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

60300