

Instytut Weterynarii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Kuty

pt.: „Występowanie oraz charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła w Polsce” – wykonanej pod kierunkiem dr hab. Mirosława Pawła Polaka (promotora) i dr hab. Magdaleny Larskiej (promotora pomocniczego) w Zakładzie Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Recenzję wykonano przyjmując zlecenie, którym jest pismo Komisji Doktorskiej Rady Naukowej z dnia 13.08.2015 r. (BRN-410/7/15), zgodne z Uchwałą nr 40/2013 Rady Naukowej PIWet-PIB podjętą w dniu 24.04.2013 r.

Izolacja wirusa BVDV z przypadków zachorowań przeżuwaczy w różnych geograficznie regionach świata wskazuje na jego duże rozpowszechnienie. Wrażliwość na zakażenie gatunków przeżuwaczy dziko żyjących i hodowlanych, w tym bydła, ogniskuje uwagę na epizootycznym zagrożeniu hodowli krów ras mlecznych i mięsnych. Straty ekonomiczne zakażeń w przeliczeniu na milion wycieleń szacuje się na dziesiątki milionów dolarów. Wynikają one z zachorowań o przebiegu ostrym, w tym cechującej się wysoką śmiertelnością skazy krwotocznej, śmiertelnego przebiegu nadkażeń szczepem cytopatycznym BVDV trwałych nosicieli, towarzyszącej zakażeniom immunosupresji i niekorzystnego oddziaływania zakażeń na funkcje rozrodcze. Szerokie rozprzestrzenienie wirusa, łatwość przenoszenia się zakażeń między zwierzętami, wysokie prawdopodobieństwo powstawania nowych genotypów w wyniku rearanżacji genomu to tylko niektóre fakty, które zadecydowały o umieszczeniu wirusowej biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD) w wykazie chorób podlegających obowiązkowi rejestracji. Wprowadzone z dniem 19 listopada 2012 roku rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nadało tej jednostce chorobowej status problemu aktualnego i poważnego.

W tematykę występowania i uwalniania od wirusa BVDV pogłowia bydła w Polsce wpisuje się przedłożona do oceny praca doktorska mgr inż. Aleksandry Kuty pt.: „Występowanie oraz charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła w Polsce” – wykonanej w Zakładzie Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego –

Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem dr hab. Mirosława Pawła Polaka (promotora) i dr hab. Magdaleny Larskiej (promotora pomocniczego).

Pracę stanowi 35 stronicowe opracowanie załączonych 6 publikacji, którymi są:

- jedna praca przeglądowa

Kuta A., Larska M., Polak M.P., Żmudziński J.F.: „Atypical pestiviruses – risk for cattle breeding and importance for control of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Medycyna Weterynaryjna* 2012, 68, 84-87 oraz

- pięć prac oryginalnych

Larska M., Kuta A., Polak M.P.: Evaluation of diagnostic methods to distinguish between calves persistently and transiently infected with bovine viral diarrhoea virus in respect to the presence of maternal antibodies. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2013, 57, 311-317;

Kuta A., Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Predominance of bovine viral diarrhoea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. *Veterinary Microbiology* 2013, 166, 639-644;

Polak M.P., Kuta A., Rybałtowski W., Rola J., Larska M., Żmudziński J.F.: First report of Bovine Viral Diarrhoea Virus-2 infection in cattle in Poland. *The Veterinary Journal*, 2014, 202, 643-645;

Kuta A., Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and identification of new subtype in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2015, 59, 19-22;

Kuta A., Woźniakowski G., Polak M.P.: Cross-priming amplification for detection of bovine viral diarrhoea virus species 1 and 2. *Journal of Applied Microbiology* 2015, 06/2015; DOI: 10.1111/jam.12859.

Załączony cykl publikacji stanowią prace współautorskie, w których udział doktorantki został określony i poświadczony w pierwszych trzech na poziomie 50% oraz w kolejnych 60%, 70% i 75%. W czterech pracach doktorantka jest pierwszą autorką, w dwóch drugą, a łączny IF wynosi 8,203 (wg. *Journal Citation Reports* z 2013 roku), co odpowiada 160 pkt. wg. listy czasopism punktowanych z 2014 roku.

Zwarty opis łączących się tematycznie publikacji przygotowano według klasycznego dla tego typu opracowań układu, obejmującego podział na 8 rozdziałów, które stanowi: wstęp, zasadniczy cel i zakres badań prezentowanych w publikacjach, metody badań, omówienie najważniejszych wyników, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim) oraz

cytowana w publikacjach bibliografia. Opracowanie, liczące wraz z załączonymi kopiami publikacji 72 strony, poprzedzają oświadczenia promotora i autora rozprawy doktorskiej o oryginalnym i autorskim jej charakterze.

W rozdziale „Wstęp” znajduje się opis historii zarejestrowanych przypadków zakażeń BVDV, klinicznych skutków zakażeń, budowy i genomu wirusa, częstości zakażeń pogłowia w świecie i w Polsce, ich diagnostyki i metod genotypowania.

Kluczowymi uwagami we wstępie, które wyznaczyły kierunek badań i uzasadniają ich celowość jest wskazanie na dużą zmienność BVDV oraz możliwość powstawania nowych jego wariantów. Doktorantka podkreśla, że wskazane okoliczności są powodem konieczności korzystania z zaawansowanych, złożonych i kosztownych technik molekularnych w diagnostyce zakażeń. Wskazuje, że jest to powodem doskonalenia istniejących metod identyfikacji i opracowywania nowych. Samo stwierdzenie obecności materiału genetycznego wirusa nie potwierdza aktywnego zakażenia. Chcąc je potwierdzić trzeba korzystać z metod ilościowych, wymagających czasami dwukrotnego ich wykonania w wyznaczonym odstępie czasu.

Z tych powodów konieczne jest stałe monitorowanie typów i podtypów wirusa oraz możliwych nowych jego wariantów. Daje to możliwość modyfikowania metod diagnostycznych, dostosowanych do potrzeb badań monitoringowych i programów zwalczania zakażeń BVDV, obniżając ich pracochłonność i koszty. Narzuca jednak konieczność bieżącego kontrolowania ich skuteczności.

Końcowe uwagi we wstępie uzasadniają zakres badań i ich kierunek, których celem było:

- opanowanie zaawansowanych i uznanych metod biologii molekularnej wykorzystywanych w identyfikacji głównych genotypów wirusa (RT-PCR oraz qRT-PCR) i odróżnianie zwierząt przetrwale zakażonych (PI) od tych, które są w ostrej fazie zakażenia (TI);
- określenie zmienności genetycznej wirusa krążącego w krajowej populacji bydła;
- zastąpienie sekwencjonowania w genotypowaniu izolatów wirusa analizą fragmentów restrykcyjnych;
- opracowanie metody krzyżowej amplifikacji w celu szybkiego wykrywania obecności materiału genetycznego BVDV w próbkach terenowych i jej optymalizacja.

W rozdziale „Metodyka badań” doktorantka wskazuje na źródła pochodzenia materiału do badań monitoringowych oraz szczepów referencyjnych używanych, jako

kontrole dodatnie. W dalszej części opisuje sekwencję badań i cel każdego zamierzenia badawczego. Były nimi:

- w umownie oznaczonej pracy II.1 – określenie wpływu przeciwciał siarowych na czułość trzech metod diagnostycznych (ELISA Ag, RT-PCR i qRT-PCR) i poprawność odróżniania zwierząt przetrwale zakażonych (PI) od tych, które znajdują się w ostrej fazie zakażenia (TI);

- w pracy II.2 - identyfikacja genotypów BVDV występujących na terenie Polski z wykorzystaniem analizy sekwencji nukleotydowych fragmentów genomu wirusa;

- w pracy II.3 – weryfikacja związku zachorowań w stadzie bydła mlecznego szczepionego przeciwko BVDV z podejrzeniem aktywnego zakażenia wirusem BVDV;

- w pracy II.4 – przedstawienie wyników genotypowania wirusa metodą analizy długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), zaprojektowaną dla izolowanych w kraju genotypów;

- w pracy II.5 – opracowanie szybkiej metody detekcji wirusa BVDV techniką amplifikacji krzyżowej (CPA) w celu szybkiej diagnostyki zakażeń BVDV-1 i BVDV-2.

W końcowej części rozdziału znajduje się opis zastosowanych w analizie wyników metod statystycznych.

W rozdziale „Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych” doktorantka szczegółowo opisuje wyniki badań podejmując nad nimi dyskusję w świetle istniejących danych piśmiennictwa krajowego i zagranicznego. Wskazuje, że:

- nie stwierdza się geograficznej zależności między występowaniem wirusa BVDV zarówno u zwierząt w kraju i porównywalnych badaniach w krajach Unii Europejskiej;

- podkreśla unikatowość badań nad zmiennością genetyczną krajowych, terenowych izolatów wirusa z przypadków zachorowań na BVD-MD;

- wskazuje na możliwość niższej skuteczności szczepień w Polsce limitowaną obecnością na krajowym rynku biopreparatów opartych na szczepach podtypu BVDV-1a, których jak dotąd nie wykryto w izolatach krajowych;

- zwraca uwagę na możliwość pojawiania się nowych genotypów BVDV, dotychczas nie występujących w Polsce, które mimo szczepień mogą powodować znaczące straty ekonomiczne nawet w stadach objętych programem szczepień;

- podkreśla konieczność prowadzenia badań zaawansowanymi metodami diagnostyki molekularnej, umożliwiającymi wykrywanie wszystkich genotypów wirusa;

- zwraca uwagę, że metody wykorzystujące technikę PCR charakteryzuje wyższa czułość niż technikę ELISA przy braku negatywnego wpływu przeciwciał siarowych na wynik badania;

- zaproponowała wartości progowe dla testu qRT-PCR, umożliwiające odróżnienie osobników PI i TI w pojedynczym badaniu, równocześnie wskazując obszar wyników dla próbek wątpliwych, ograniczając ilość koniecznych badań powtórnych;

- opracowała metodę analizy długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) w analizie genomu wirusa, której zastosowanie umożliwi identyfikację siedmiu najczęściej spotykanych podtypów i typowanie do dalszych badań szczegółowych izolatów z nowymi, niesklasyfikowanymi podtypami wirusa;

- opracowała również warunki dla metody wykrywania materiału genetycznego BVDV w reakcji krzyżowej amplifikacji (CPA), umożliwiającej szybką identyfikację osobników PI zakażonych aktualnie zidentyfikowanymi na terenie kraju genotypami wirusa.

Opisane efekty badań doktorantka podsumowała pięcioma rozsądnie sformułowanymi, rzeczowymi i wyważonymi wnioskami. Ich rzeczowość i aktualność odzwierciedla odnośnienie się do kluczowych i najnowszych publikacji w tej dziedzinie, co można wywnioskować z bardzo aktualnego i obszernego piśmiennictwa cytowanego w publikacjach.

Ułatwieniem w zaopiniowaniu przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej jest fakt pozytywnej weryfikacji wyników badań doktorantki, jakiej dokonali recenzenci jej artykułów naukowych, które ukazały się w dobrych, recenzowanych i uznanych czasopismach naukowych. Akcentuje to łączny IF – 8,203, co odpowiada liczbie 160 pkt. krajowych.

Występując w roli recenzenta przedłożonego opracowania chcę ustosunkować się do zawartości badań i ich znaczenia dla programu zwalczania zakażeń BVDV. Niewątpliwie kluczowym elementami programu zwalczania wirusa BVDV w stadach jest ograniczanie źródeł kontaminacji środowiska hodowlanego. W przypadku choroby BVD-MD osobników PI i TI. Badania realizowane przez doktorantkę ściśle wiążą się z możliwością identyfikacji osobników PI podlegających eliminacji oraz ograniczania aktywnych zakażeń poprzez szczepienia biopreparatami zawierającymi aktualne podtypy wirusa (zmniejszenie ilości przypadków osobników TI). Rozpoznanie krajowych typów wirusa BVDV, jakie jest efektem badań doktorantki, umożliwiło uproszczenie procedur molekularnych, a nawet zaproponowanie szybkiej i skutecznej metody typowania osobników PI, co do których decyzja o eliminacji nie wymaga genotypowania. Przedstawione w badaniach wyniki analiz genotypów wirusa to również wskazówki dla wyboru efektywnych biopreparatów. Zwraca uwagę duży materiał, który stanowiło 5.410 próbek poddanych badaniom przesiewowym.

Skrupulatność monitoringu i jakości opracowywanych metod podkreśla ich kontrola z wykorzystaniem zidentyfikowanych terenowych izolatów oraz szczepów referencyjnych. Na uwagę zasługuje fakt podania kryteriów diagnostycznych (wartości progowe), skutecznie identyfikujących osobniki PI i zawężających liczbę badań powtórnych. Doktorantka z dużą rozważą podchodzi do zaproponowanych modyfikacji metod molekularnych, wskazując na konieczność ciągłego śledzenia zmienności populacji wirusa BVDV, co świadczy o dojrzałości naukowej.

Krytyczne elementy przedstawionych badań to ograniczenia opracowanych metod do aktualnych genotypów występujących w kraju, narzucające konieczność monitorowania zmienności BVDV w kraju. Tylko w ten sposób możliwe jest uniknięcie wyników fałszywie ujemnych dla nowych typów wirusa. Te krytyczne uwagi zostały dostrzeżone również przez doktorantkę w opisie zaproponowanych modyfikacji metod molekularnych. Wskazuje na konieczność ciągłego śledzenia zmienności populacji wirusa BVDV.

Już w pierwszym celu swoich badań doktorantka założyła konieczność zapoznanie się z precyzyjnym warsztatem diagnostycznym, który stanowią zaawansowane metody diagnostyki molekularnej. Powołuje się na nie i podkreśla, że własne modyfikacje stanowią uproszczenia procedur diagnostycznych, których skuteczność jest dostosowana do aktualnych typów wirusa. Utrzymanie skuteczności tych metod, a w razie konieczności ich modyfikowanie, musi być weryfikowane zaawansowanymi metodami diagnostyki molekularnej.

Wobec wahającej się rentowności hodowli bydła, często znajdującej się na progu opłacalności, rozpoznawanie zakażeń i uwalnianie stad od wirusa powinno uwzględniać dominujące genotypy wirusa. Dobre rozpoznanie sytuacji epizootycznej, bieżący monitoring genotypów wirusa umożliwia dostosowanie metod diagnostycznych do krajowej populacji BVDV oraz wybór właściwych szczepionek. Badania nad uproszczeniem procedur laboratoryjnych, ich dostosowywanie do aktualnie rejestrowanych zakażeń i kontrola skuteczności diagnostycznej, optymalizuje koszty badań z zachowaniem skuteczności rozpoznań.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać na nieliczne uchybienia w tekście opracowania, które w niczym nie umniejszają merytorycznej wartości dokonań doktorantki. Są nimi:

- konieczność zamieszczenia w tytule opracowania pełnej nazwy choroby tj. wirusowa biegunka bydła i choroba błon śluzowych;
- „zdublowane” w tekście pełne nazwy skrótów wcześniej umieszczonych w wykazie;

- oraz użycie w opracowaniu zwrotu „ostre zakażenie” dla przypadków oznaczonych TI, które oznacza zakażenie przejściowe (transient infection).

Przedstawione opracowanie wykonanych badań i publikacje będące ich efektem oceniam bardzo wysoko, a kierując się wysoką wartością merytoryczną i aplikacyjną badań wnioskuję we właściwym etapie przewodu doktorskiego o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej, doceniając zakres i wnikliwość badań, stopień trudności nakreślonych celów badań, a także wkład pracy w przygotowanie opracowania stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Kuty pt.: „Występowanie oraz charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła w Polsce” spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z 2003 r., ze zmianami w Dz.U. z 2005 r.) oraz § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadaniu tytułu profesora (Dz. U. Nr 204, poz. 1200).

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Kuty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. wet. Marek Gehrke
prof. nadzw. UP w Poznaniu