

Olsztyn, 05-11-2022

Prof. dr hab. Andrzej Pomianowski
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
W Olsztynie

Recenzja pracy doktorskiej

lek. wet. Alicji Wójcik „Badania nad wybranymi aspektami epidemiologii parwowirusy psów”

Podstawę prawną recenzji stanowi pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, powołujące się na uchwałę Rady Dyscypliny z dnia 28 września 2022 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej lek. wet. Alicji Wójcik.

Choroby wirusowe występujące u psów i kotów, pomimo szerokiego wprowadzenia programów szczepień, stanowią wciąż zagrożenie dla zdrowia i życia tych zwierząt. Parwowirusowe zapalenie jelit uznaje się za jedną z najczęściej stwierdzanych chorób zakaźnych psów. Tę wysoce zaraźliwą, często śmiertelną chorobę wywołuje parwowirus psów (CPV-2). Od momentu pojawienia się choroby w późnych latach siedemdziesiątych XX wieku, w genomie wirusa zaszły istotne zmiany, co spowodowało pojawienie się jego nowych szczepów. Również w Polsce diagnozowane są przypadki parwowirusy psów, nierzadko o ciężkim przebiegu.

Przedstawiona do oceny dysertacja lek. wet. Alicji Wójcik dotyczy właśnie problematyki wybranych aspektów epidemiologii parwowirusy psów. Temat pracy uważam za aktualny i uzasadniony zarówno dla nauki jak i praktyki klinicznej.

Rozprawa doktorska zatytułowana „Badania nad wybranymi aspektami epidemiologii psów” jest spójnym tematycznie zbiorem czterech artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowym, określonym przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki. Tym samym prezentowany cykl publikacyjny lek.

wet. Alicji Wójcik spełnia formalne wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora.

Publikacje stanowiące pracę doktorską to:

1. Wójcik A., Ziętek J., Winiarczyk S.: Parwowiroza psów – problem wciąż aktualny. *Medycyna Weterynaryjna* 2019, 7(8), 472-479 (IF=0,281)
2. Wójcik A., Ziętek J., Staniec M., Winiarczyk S.: Genetic variability among canine parvovirus strains currently circulating in Poland. *Medycyna Weterynaryjna* 2021, 77(5), 232-237 (IF=0,383)
3. Wójcik A., Ziętek J., Staniec M., Janecki R., Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Serological testing for antibodies against canine parvovirus in a population of adults dogs in eastern Poland. *Medycyna Weterynaryjna* 2021, 77(6), 300-303 (IF=0,383)
4. Wójcik A., Winiarczyk S., Adaszek Ł.: Research on factors that influence the course of canine parvovirus. *Medycyna Weterynaryjna* 2021, 77(7), 325-330 (IF=0,383)

W dwóch pracach udział lek. wet. Alicji Wójcik jako wiodącej Autorki wynosił 70% a dwóch pozostałych 60% i polegał na zaplanowaniu doświadczenia, zgromadzenia piśmiennictwa, przeprowadzeniu badań oraz przygotowaniu szkicu manuskryptu.

Dodatkowo przedstawiony cykl czterech publikacji naukowych wzbogacony jest o streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, omówienie badań składające się ze wstępu, celów i założeń pracy, materiałów i metod oraz podsumowania i wniosków. Dołączone są również stosowne oświadczenia promotora, autora rozprawy oraz współautorów publikacji.

Artykuły naukowe stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały opracowane w oparciu o klasyczne standardy przynależne tego typu publikacjom. Ze względu na fakt, iż prace te były już recenzowane w niniejszej ocenie przedstawię jedynie ich skróconą charakterystykę. Pierwszy artykuł ma charakter przeglądowy i dokumentuje aktualny stan wiedzy na temat parwowirusy psów. Z analizy tej publikacji jasno wynika, że Doktorantka dobrze orientuje się w zakresie literatury związanej z tematem poruszanego przez nią zagadnienia. W związku z obserwacjami poczynionymi iż, w Polsce zaczęto odnotowywać przypadki nadostrych zakażeń parwowirusowych u psów dorosłych, nawet tych poddanych w przeszłości pełnemu cyklowi szczepień profilaktycznych, Autorka postawiła hipotezę mówiącą, że przyczyną zmiany typowego przebiegu choroby i braku skuteczności szczepień może być nowy wariant psiego parwowirusa o wyższej zakaźności i zjadliwości,

niewykazujący odporności krzyżowej ze szczepami obecnymi w komercyjnych szczepionkach lub zbyt niski poziom odporności populacyjnej przeciwko temu wirusowi. Aby zweryfikować tę hipotezę Doktorantka podjęła badania mające na celu:

1. Analizę obrazu klinicznego psów z potwierdzonym zakażeniem parwowirusowym, w tym ocenę związku pomiędzy przebiegiem choroby, a szczepem wirusa wywołującego infekcję, efektem cytopatycznym spowodowanym jego replikacją w hodowli komórkowej, a także wiekiem zwierząt i ich historią.
2. Charakterystykę molekularną genu VP2 szczepów CPV pochodzących z terenów wschodniej Polski, izolowanych od zwierząt chorych.
3. Określenie poziomu odporności humoralnej skierowanej przeciwko CPV wśród populacji dorosłych psów o zróżnicowanej historii immunoprofilaktyki, pochodzących z terenów wschodniej Polski.

Zakładane cele zrealizowano w trzech etapach badawczych a wyniki przedstawiono w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe Doktorantki.

Badania przeprowadzono w latach 2017-2019 na pacjentach Katedry Epizootiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, wykazujących objawy postaci jelitowej parwowirusy. Materiałem do badań serologicznych była krew żylna, natomiast materiał do badań molekularnych i wirusologicznych stanowiły próbki kału. Wykonano ekstrakcję DNA parwowirusa z próbek kału i hodowli komórkowej z następową amplifikacją materiału genetycznego metodą PCR. Dokonano sekwencjonowania i analizy filogenetycznej produktów PCR. Przeprowadzono również badanie efektu cytopatycznego wyizolowanego parwowirusa na hodowlach linii komórkowej CCC clone 81. Dodatkowo określono miano przeciwciał przeciwwirusowych w surowicy psów objętych szerszym badaniem (200 psów) przy użyciu metody immunochromatograficznej. Badania wykonano z użyciem nowoczesnych metod i aparatury co podnosi wartość merytoryczną dysertacji.

W pierwszym etapie badań określono zmienność genetyczną szczepów parwowirusa pochodzących z terenów Polski wschodniej. Badania przeprowadzono na materiale genetycznym wyizolowanym z próbek kału pobranych od 46 psów z parwowirusą, z których 16 było poddanych w przeszłości szczepieniom ochronnym przeciwko CPV. Wykazano, że najczęściej występującym szczepem CPV na terenie wschodniej Polski jest szczep CPV 2b, który został wykryty w 37 próbkach, co stanowiło 80 % przebadanych próbek. Kolejny zakres prowadzonych przez Doktorantkę badań seroepidemiologicznych

miał na celu określenie stanu odporności populacyjnej psów na podstawie mian przeciwciał anty CPV w grupach dorosłych psów o różnej historii immunoprofilaktyki. Badaniami objęto 200 zwierząt wielu ras w wieku 4-17 lat. Psy podzielono na trzy grupy: regularnie szczepione, bez dawki przypominającej oraz grupę nigdy nie szczepioną przeciwko parwowirowi. U wszystkich osobników w badanej populacji psów stwierdzono występowanie przeciwciał antyparwowirusowych, a najwyższy odsetek zwierząt (86%) z wysokimi mianami przeciwciał występował wśród psów szczepionych zgodnie z zaleceniami WSAVA. W następnym etapie badań Autorka poszukiwała korelacji między przebiegiem zakażenia danym szczepem parwowirusa i tempem wywoływanego przez niego efektu cytopatycznego na liniach komórkowych a wiekiem chorych zwierząt i ich historią szczepień przeciwko parwowirowi. Badaniami objęto 45 psów różnych ras i płci w wieku od 6 tygodni do 8 lata z potwierdzoną parwowirową. 30 zwierząt nie było nigdy szczepionych a 15 przeszło pełny cykl szczepień. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu Chi-kwadrat, przy istotności $p \leq 0,05$. Efekt cytopatyczny pojawił się we wszystkich 45 hodowlach zakażonym od chorych psów, jednak nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy szybkością jego pojawiania się a szczepem wirusa, którym doszło do zakażenia, wiekiem i historią szczepień psów od których pobrano materiał zakaźny.

Dyskusja we wszystkich artykułach składających się na rozprawę doktorską zaplanowana została w sposób przemyślany i obejmuje praktycznie wszystkie elementy związane z badanym zagadnieniem. Dobór piśmiennictwa nie budzi zastrzeżeń w związku z faktem, iż większość cytowanych prac to opracowania opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach z listy JCR.

Podsumowując Doktorantka wykazała, że:

1. Izolaty parwowirusa zidentyfikowane w badaniach własnych spokrewnione są z parwowirusami szeroko rozpowszechnionymi na świecie.
2. W badanej populacji psów występowały przeciwciała antyparwowirusowe niezależnie od immunoprofilaktyki, z tym że najwyższy odsetek zwierząt z wysokimi mianami występował u psów szczepionych zgodnie z zaleceniami WSAVA.
3. Na podstawie analizy filogenetycznej stwierdzono, że dominującymi szczepami wirusa były CPV-2a i CPV-2b.
4. W grupie psów szczepionych i zakażonych wariantem CPV-2b notowano śmiertelność 21,4%, natomiast wśród psów nieszczepionych śmiertelność wynosiła 34,7%.

5. Istnieje dodatnia korelacja pomiędzy czasem powrotu do zdrowia chorych zwierząt, a wcześniejszym szczepieniem przeciwko CPV.
6. Na przebieg choroby ma wpływ szczep wirusa powodujący infekcję.
7. Czas i dynamika wystąpienia efektu cytopatycznego na hodowle komórkowe są niezależne od szczepu wirusa, wieku zwierząt oraz ich historii szczepień.

Prezentowane przez lek. wet. Alicję Wójcik wyniki badań mają niewątpliwie duże znaczenie poznawcze w kontekście oceny klinicznej pacjenta z parwowirozą, przebiegu choroby, efektów leczenia, rokowań oraz immunoprofilaktyki. Jednakże, z punktu widzenia klinicysty w opisie symptomatologii zakwalifikowanych do badań psów zabrakło mi bardziej szczegółowego przedstawienia obrazu choroby a zwłaszcza jego przebiegu i określenia bezpośredniej przyczyny śmierci zwierząt, co byłoby ważne dla postępowania terapeutycznego. W czasie rozwoju choroby dochodzi bowiem do złożonych zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej i równowagi kwasowo-zasadowej jak również powstawania zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Nie jest to zarzut i nie umniejsza wartości merytorycznej pracy, która miała przecież charakter ukierunkowany na badania epizootyczne, wirusologiczne i serologiczne, ale wzbogaciłoby pracę o ten jeszcze jeden ważny element kliniczny, chociażby ze względu na wyższą zjadliwość szczepów CPV-2b i nieco odmienny obecnie przebieg parwowirozoty psów.

Na podstawie przeprowadzonych badań własnych Autorka wnioskuje, że:

- Brak pełnej skuteczności szczepień był spowodowany pojawieniem się wariantu wirusa CVP-2b przy jednoczesnym braku tego wariantu w stosowanych szczepionkach.
- Terenowy szczep CPV-2b nie był w pełni neutralizowany przez przeciwciała indukowane przez komercyjne szczepionki, na co wskazują zachorowania psów immunizowanych.
- Relatywnie wysoka śmiertelność u psów szczepionych przeciwko parwowirozie wskazuje na wyższą niż zwykle spotykaną zjadliwość szczepów CPV-2b.
- Szczepionki niezawierające w swym składzie szczepów odpowiadających krążącym szczepom terenowym mogą stymulować jedynie zawężone działanie ochronne.
- Utrzymanie wysokiej skuteczności szczepień przeciwko parwowirozie wymaga stałego monitoringu krążących w terenie szczepów parwowirusów i aktualizowania składu preparatów używanych do immunoprofilaktyki.

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że oceniana rozprawa została zaplanowana, wykonana i przedstawiona poprawnie. Ma bardzo dużą wartość zarówno poznawczą jak i aplikacyjną. Chciałbym przy tym podkreślić trudność wykonania badań naukowych na pacjentach klinicznych, zwłaszcza o charakterze długofalowym. Doktorantka w pełni sprostала temu zadaniu, wynikającemu z założeń przedstawionej dysertacji.

W konkluzji stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust.3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. z późn. zm. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z dn. 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669).

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autorki lek. wet. Alicji Wójcik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



KIEROWNIK KATEDRY
CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ

prof. dr hab. Andrzej Pomianowski