



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel/fax. 61 848 75 62
mpomorska@up.poznan.pl



**KATEDRA NAUK
PRZEDKLINICZNYCH
I CHORÓB
ZAKAŻNYCH**

Poznań, 11.11.2024

Prof. dr hab. Małgorzata Pomorska-Mól
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Dominiki Szulc

pt.: „Obraz ultrasonograficzny narządów jamy brzusznej kotów z potwierdzonym badaniami molekularnymi zakaźnym zapaleniem otrzewnej (FIP)”
wykonanej pod opieką promotora prof. dr hab. Łukasza Adaszka oraz promotora pomocniczego dr. Piotra Dębiaka

Warunki stawiane rozprawom doktorskim, a zarazem cechy, jakie powinna wykazywać przedmiotowa dysertacja, zostały określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym. Zgodnie z tym przepisem rozprawa doktorska ma prezentować ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Ponadto, przedmiotem rozprawy doktorskiej ma być oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne. Do tych trzech aspektów odniosę się w niniejszej recenzji.

1. Formalna podstawa wykonania recenzji

Podstawę formalną wykonania recenzji pracy doktorskiej stanowi uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie 16/2024 z dnia 30 października 2024 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów w przewodzie doktorskim lek. wet. Dominiki Szulc.

2. Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 133 strony standardowego wydruku komputerowego i obejmuje 67 rycin, 16 tabel i 129 pozycji piśmiennictwa. Ma układ typowy dla tego rodzaju prac i zawiera: spis treści, streszczenia i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, spis skrótów i oznaczeń zastosowanych w rozprawie, wstęp zawierający przegląd piśmiennictwa powiązanego z tematem rozprawy doktorskiej oraz uzasadniający podjęcie przez doktorantkę wybranego problemu naukowego, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, spis rycin i tabel. Przesłana dokumentacja zawiera także oświadczenia promotora i autorki pracy.

Rozprawa doktorska lek. wet. Dominiki Szulc napisana jest starannie, jasno i nie nasuwa istotnych trudności w zrozumieniu intencji przy planowaniu i realizowaniu poszczególnych elementów badań.

W pierwszym rozdziale, stanowiącym wstęp do pracy, Doktorantka szczegółowo opisała historię i epidemiologię choroby, którą zajmowała się w swoich badaniach, czynnik etiologiczny, prognozę i czynniki ryzyka oraz objawy kliniczne i metody rozpoznawania zakaźnego zapalenia otrzewnej (FIP).

Ta część pracy co do zasady napisana jest w sposób zrozumiały, poprawnym językiem chociaż Autorka nie uniknęła drobnych błędów językowych, edytorskich i merytorycznych (dla przykładu s. 8: „Identyfikacji koronawirusa kociego (FCoV) jako przyczynę choroby” zamiast „jako przyczyny choroby”; s.9: „jakoby koty z FIP nie sieją wirusa” zamiast „nie siały”; s.10 „gdzie ilość kotów” zamiast „gdzie liczba kotów”; s.13: „jako marker infekcji ogólnoustrojowej koronawirusa” zamiast „jako marker infekcji ogólnoustrojowej koronawirusem”; s.16 „już w ciągu 2-3 dni od początku infekcji” – czy chodziło o „już w ciągu 2-3 dni od zakażenia”?; s.16. „szczep fipogeny jest zdolna” zamiast „jest zdolny”; s.18 „Kompleksy odkładają się w różnych narządach, takich jak kłębuszki nerkowe, ściana naczyń w gałce ocznej i w ośrodkowym układzie nerwowym” – wymienione w tym zdaniu elementy nie są narządami; s.20 „kilka do kilkunastu miesięcy [9-24 miesięcy]” – 24 to już kilkadziesiąt; s.21 „centralnym układzie nerwowym” zamiast „centralnym układzie nerwowym”.

Na stronie 25 dysertacji Doktorantka wskazuje, że „W badaniach histologicznych wirus często izolowany jest z nerek, zwłaszcza u zwierząt z wielonarządowymi zmianami” – wydaje się, że nie do końca tutaj chodzi o izolację wirusa i ten fragment należy poprawić.

Korekty wymaga także opis w tabeli 4: RT-PCR nie należy do diagnostycznych testów pośrednich, być może Doktorantce chodziło o fakt, że w tym przypadku uzyskanie wyniku dodatniego może, ale nie musi przemawiać na korzyść potwierdzenia FIP (w tym przypadku należałoby jednak inaczej zatytułować tabelę). Korekty w wielu miejscach wymaga także interpunkcja.

W dalszej części pracy Doktorantka przedstawiła 2 cele swoich badań tj.: wykazanie czy istnieje korelacja pomiędzy rasą, płcią, wiekiem, a wystąpieniem wysiękowej postaci FIP oraz wykazanie związku pomiędzy przebiegiem choroby, a obrazem USG narządów wewnętrznych w aspekcie możliwości identyfikacji markerów zakażenia. W mojej opinii tytuł pracy nie do końca oddaje rzeczywisty cel badań, gdyż Doktorantka poza oceną obrazu ultrasonograficznego narządów jamy brzusznej kotów z potwierdzonym badaniami molekularnymi zakaźnym zapaleniem otrzewnej (FIP), skupiła się także na ocenie korelacji (a więc i ewentualnych czynników ryzyka) pomiędzy takimi czynnikami jak rasa, płeć i wiek, a rozwojem wysiękowej postaci FIP. Dodatkowo w drugiej części celu należałoby wskazać o markery jakiego zakażenia chodzi – czy po prostu zakażenia koronawirusem kocim czy też konkretną jego postacią (np. „FIPogeny” biotyp wirusa)?

Kolejny rozdział rozprawy zawiera opis materiału oraz metod zastosowanych w badaniach Doktorantki. W rozdziale tym lek. wet. Dominika Szulc wyodrębniła 9 podrozdziałów: Zwierzęta użyte w badaniu, Badanie hematologiczne i biochemiczne surowicy krwi, Elektroforeza białek surowicy, Badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej i klatki piersiowej, Badanie serologiczne, Próba Rivalty, Badanie molekularne; Badanie cytologiczne i anatomo-patologiczne i Analiza statystyczna. W rozdziale M&M Doktorantka opisała zwierzęta wykorzystane w badaniach i ich podział na 3 grupy. Badania przeprowadzono na 188 kotach z obszaru kilku województw. Zwierzęta zostały zaklasyfikowane do 3 grup: I – tzw. badanej (osobniki, u których na podstawie wyników badań klinicznych, hematologicznych, molekularnych i ultrasonograficznych postawiono podejrzenie wysiękowej postaci zakaźnego zapalenia otrzewnej, n=127); II - kontrolnej obejmującej koty zdrowe młode (w wieku do 1

roku), n=27 oraz III, którą można uznać za grupę kontrolną dodatnią, z innymi niż FIP stanami patologicznymi w obrębie jamy brzusznej (procesy nowotworowe, zmiany zapalne w jamie brzusznej), n=34. Dokładną charakterystykę zwierząt z podaniem ich rasy, płci oraz wieku zebrano w tabelach. Zgodnie z informacjami wszystkie koty poddawane były badaniu klinicznemu celem oceny stanu ich zdrowia i stanowiły pacjentów klinik i gabinetów weterynaryjnych. Następnie Doktorantka szczegółowo opisała badania, którym poddawane były zwierzęta lub próbki pobrane od zwierząt. Część z nich (badania hematologiczne, biochemiczne, elektroforeza białek surowicy, ocena cytologiczna i badanie histopatologiczne) zostało wykonanych w komercyjnych laboratoriach weterynaryjnych lub naukowych, jako usługa zlecona. W rozdziale opisano kolejne techniki badawcze, w tym szczegółowo badanie molekularne pobranych próbek. Lek. wet. Dominika Szulc w podrozdziale Analiza statystyczna szczegółowo przedstawiła wykorzystane testy oraz opisała dodatkowe podziały zwierząt na grupy zależnie od analizowanej cechy.

Kolejny rozdział dysertacji zawiera wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Na samym początku tego rozdziału lek. wet. Dominika Szulc podaje szczegółową charakterystykę zwierząt z poszczególnych grup, co w większości jest powtórzeniem danych zawartych w rozdziale M&M i nie powinno się znaleźć w tej części rozprawy. Podobnie dyskusyjne jest umieszczenie w tej części danych z wywiadu, które w mojej opinii nie stanowią wyników badań doktorantki a charakteryzują zwierzęta z grupy badanej i powinny zostać umieszczone w rozdziale M&M.

Jak wykazała Doktorantka, najczęściej stwierdzanymi w badaniu klinicznym objawami u kotów z grupy I były: apatia (101/127), osłabienie (84/127), wodobrzusze (77/127) oraz gorączka fluktuująca, nie reagująca na antybiotyki (76/127). Badania hematologiczne potwierdziły limfopenię oraz wzrost liczby neutrofilów u blisko połowy chorych kotów, a obniżenie parametrów czerwonych krwinek obserwowano jedynie u 30 kotów. Spośród kotów, których właściciele wyrazili zgodę na wykonanie elektroforezy białek surowicy (n=71), u 36 osobników (50,7 %) wykazano hipergammaglobulinemię, zaś obniżony stosunek A:G potwierdzono u 63 zwierząt (88,7%).

W dalszej kolejności Doktorantka przedstawiła wyniki badania ultrasonograficznego zwierząt objętych badaniami. Ta część pracy opatrzona jest dużą liczbą rycin dokumentujących obserwowane zmiany, co należy ocenić bardzo pozytywnie.

U kotów z grupy I określano charakter płynu, jego objętość oraz lokalizację (jama brzuszna i/lub jama opłucnej). U 10% kotów płyn gromadził się w jamie opłucnej, u 20% osobników zarówno w jamie opłucnej, jak i jamie brzusznej, natomiast u 67% tylko w jamie brzusznej. W przypadku 4 osobników nie stwierdzono obecności płynu w jamach ciała. Przeprowadzone badania histopatologiczne próbek pobranych od tych zwierząt wykluczyły postać wysiękową FIP. Aechogenny płyn w jamie brzusznej był widoczny u 58% kotów, echogenny z luźno unoszącymi się strzępkami włókniaka u 42% zwierząt. Pofałdowane, wyraźnie hyperechogenne pasma sieci, kreskę, tłuszcz kreskowy otaczający narządy notowano u 87% zwierząt.

Poza oceną płynu w jamach ciała, ocenie podlegały także narządy tych obszarów. Powiększone i niejednorodne węzły chłonne stwierdzono u 59% kotów, podczas gdy u 8,7% zwierząt były one niepowiększone i jednorodne, natomiast u 42,5% niepowiększone, niejednorodne, reaktywne. Śledziona była powiększona u większości badanych kotów, obserwowano w niej zmiany śródmiąższowe. Najwięcej kotów wykazywało powiększenie

śledziona, której miąższ był niejednorodny co wskazywało na reaktywny stan zapalny. W grupie I, u 68 badanych kotów trzustka była powiększona, o nieregularnych brzegach a echogeniczność względem otaczających tkanek obniżona. W grupie I u 67 badanych kotów nie stwierdzono zmian w nerkach. Nerki o zróżnicowanym korowo rdzennym, uwidoczniono u 19 osobników, a z hiperechogennym objawem rąbka u 19 kotów. U 80 kotów z tej grupy wątroba, wykazywała cechy powiększenia, a u 88 stwierdzono niską echogeniczność narządu. Tylko u 6 kotów narząd ten był hiperechogeniczny. U 79 chorych kotów grupy I obserwowano zmiany w przewodzie pokarmowym związane z obecnością asymetrycznej dodatkowej hiperechogennej warstwy w obrębie warstwy śluzowej pętli jelita cienkiego, zastój treści, atonię przewodu pokarmowego, niewielkie pogrubienie warstwy mięśniowej, marszczenie ściany jelit cienkich oraz pogrubienie ściany jelita ślepego z obniżeniem jej echogeniczności. W badaniu USG przez ścianę klatki piersiowej nie stwierdzono podobnych zmian u znacznego odsetka kotów, co mogłoby wskazywać na zmiany charakterystyczne dla tej choroby.

W dalszej części Doktorantka charakteryzuje zmiany obserwowane u zwierząt zakwalifikowanych do grup II i III. Omawia także wyniki badań serologicznych i wyniki prób Rivalty, która była dodatnia dla każdego osobnika z grupy I (z potwierdzonym badaniem molekularnym FIP). Niestety w pracy zabrakło informacji jak wyniki tej próby kształtowały się w pozostałych grupach, a zwłaszcza w grupie III. Byłaby to cenna informacja na temat ewentualnej czułości i specyficzności tego badania w rozpoznawaniu FIP. Mam w tym miejscu pytanie do Doktorantki – czy taka próba była wykonywana w pozostałych grupach kotów? A jeśli nie to, dlaczego i czy nie sądzi Doktorantka, że wyniki mogłyby dostarczyć cennych informacji?

Kolejny podrozdział zawiera szczegółowe omówienie wyników badań molekularnych. Ponieważ wynik tego badania był podstawą kwalifikacji kotów do grup, nie jest zaskoczeniem, że wszystkie koty z grupy I uzyskały w tym badaniu wynik dodatni (tj. w płynie z jamy brzusznej/klatki piersiowej pobranym o wykazano obecność materiału genetycznego koronawirusa kociego, z mutacją M1058L typową dla szczepu fipogenego FCoV). Wartości ct w drugiej reakcji PCR dla badanych próbek wahały się w granicach 20-21, a więc były wysokie. W żadnej próbce płynu otrzewnowego pobranego od kotów grupy kontrolnej II i III badaniem PCR nie wykazano obecności materiału genetycznego FCoV. Kolejny podrozdział zawiera omówienie wyników badań cytologicznych i patologicznych. Identyfikację procesów nowotworowych u kotów grupy III dokonano w oparciu o badania cytologiczne oraz histopatologiczne. U zwierząt rozpoznano następujące typy nowotworów: chłoniak śródpiersia u 1 kota, chłoniak u 26 kotów, gruczolak i rak kory nadnercza u 1 kota, rakowiak u 1 kota, niskozróżnicowany nowotwór złośliwy wątroby oraz śledziona u 1 kota, złośliwy nowotwór nabłonkowy nerki – rak anaplastyczny u 1 kota. U pozostałych kotów stwierdzono nie ziarniniakowe zmiany zapalne.

W podsumowaniu wyników analiz statystycznych Doktorantka wskazuje, iż wykazano statystycznie istotną zależność ($p = 0,02$) pomiędzy rasą kotów a wystąpieniem wysiękowej postaci FIP oraz wysoką korelację ($r = 0,75$) pomiędzy wystąpieniem choroby „u kotów rasy europejskiej w porównaniu do kotów rasowych” (brakuje tu informacji o wartości p , która świadczy o istotności wspomnianej korelacji). Analizując ten podrozdział rozumiem, że koty zaliczone do tzw. rasy europejskiej nie były de facto kotami rasowymi, a raczej mieszańcami? Gdyby wspomniane koty europejskie były mieszańcami to wyniki Doktorantki podważałyby panujący powszechnie pogląd o tym, że na FIP rzadko chorują mieszańce. Biorąc jednak pod

uwagę strukturę grypy badanej, bardziej należałoby się skłonić ku stwierdzeniu, że ze względu, iż koty europejskie stanowiły zdecydowaną większość w grupie I (tj. około 75%) to mogło to mieć wpływ na wyniki analiz korelacji i zależności. Takie podejście znajdujemy też w dalszej części rozprawy – w rozdziale Dyskusja, gdzie Doktorantka, w mojej opinii poprawnie interpretuje uzyskane wyniki i odnosi je do rzeczywistej proporcji kotów rasowych i europejskich (nie rasowych?) wykorzystanych w badaniach.

Doktorantka wykazała także, że istnieje statystycznie istotna zależność ($p = 0,00$) pomiędzy wiekiem zwierząt, a wystąpieniem wysiękowej postaci FIP oraz silna korelacja między wiekiem, a wystąpieniem wysiękowej formy FIP ($r = 0,857$, tutaj także *brak wartości p*). Dodatkowo, analiza wykazała, że wraz z wiekiem zmniejsza się częstotliwość wystąpienia mokrej postaci FIP. Nie potwierdzono wpływu płci na występowanie FIP ($p = 0,09$).

W rozdziale dyskusja Doktorantka omawia uzyskane wyniki i w większości poprawnie konfrontuje je z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, chociaż czasami daje się zauważyć brak cynowania piśmiennictwa potwierdzającego dana tezę. Objętość dyskusji jest prawidłowa biorąc pod uwagę proporcje treści poszczególnych rozdziałów dysertacji. Z obowiązków recenzenta muszę wymienić kilka elementów, które wymagałyby bardziej szczegółowego omówienia czy też poprawy.

Na stronie 109 dysertacji Doktorantka stwierdza, iż „W badaniach własnych u wszystkich kotów grupy pierwszej wynik tego badania (próba Rivalty) był dodatni, co łącznie z obserwowanymi objawami klinicznymi i dodatnimi wynikami PCR pozwoliło na postawienie rozpoznania FIP” – a jak to wyglądało w pozostałych grupach? Brakuje mi rozwinięcia tego zagadnienia w dyskusji, zwłaszcza biorąc pod uwagę stwierdzenie znajdujące się na stronie 107 „Falszywie dodatni wynik testu Rivalty może być uzyskiwany przy chłoniaku, czy bakteryjnym zapaleniu otrzewnej [104]”.

W dalszej części dyskusji znajdujemy stwierdzenie, że „Fluktuująca, nie reagująca na antybiotyki gorączka występuje częściej u kotów z postacią wysiękową aniżeli z bezwysiękową FIP. Obserwacje własne są w tym aspekcie zgodne z wynikami badań innych autorów [48, 105], którzy wykazali, że u młodych kociąt cierpiących na FIP obserwuje się słabe przyrosty masy ciała, zaś u starszych osobników spadki masy ciała [105]” – prawdopodobnie coś tutaj zostało wycięte podczas redagowania tekstu, gdyż trudno porównywać fluktuującą gorączkę do przyrostów masy ciała?

W opinii recenzentki, poniższe informacje zawarte na stronie 110 pracy, dotyczące metodyki prowadzenia badania USG, powinny zostać przeniesione do części M&M.

„W badaniu AFAST obraz USG uzyskiwano z czterech przyłożeń sondy:

1. DH przeponowo-wątrobowe (diaphragmatico-hepatic) – umożliwia zobrazowanie płynu pomiędzy przeponą a wątrobą, ale również pozwala na wstępną ocenę odbicia lustrzanego wątroby, zmian w obrębie linii opłucnej, z tej projekcji również można ocenić obecność płynu w worku osierdziowym, jamie opłucnej, stan pęcherzyka żółciowego z wykluczeniem jego obrzęku,
2. SR śledzionowo-nerkowe (spleno-renal) – płyn lokalizuje się pomiędzy ogonem śledziony a doczaszkowym polem nerkowym,
3. CC pęcherzowo – okrężnicze (cysto-colic) - lokalizacja płynu w okolicy pęcherza moczowego jego doczaszkowej części oraz pętli jelit cienkich,
4. HR wątrobowo – nerkowe (hepato-renal) lokalizacja płynu w okolicy pępkowej, płyn gromadzi się pomiędzy pętlami jelit cienkich i otrzewną

Sporo uwagi Doktorantka poświęca omówieniu zmian widocznych w badaniu USG oraz

w miarę możliwości stara się tłumaczyć ich tło fizjologiczne bądź patologiczne oraz ewentualne powiązanie z FIP. Jest to jak najbardziej właściwe biorąc pod uwagę cel prowadzonych badań. Doktorantka wykazała m.in., że wbrew powszechnej opinii, nerki nie są narządem, który ulega powiększeniu u większości kotów z FIP, a także, że nie zawsze należy spodziewać się zmian ich obrazu ultrasonograficznego. Również objaw rąbka nie był notowany zbyt często, co wyklucza możliwość stosowania tej nieprawidłowości jako markera ultrasonograficzny FIP.

Rozprawę kończą 4 wnioski, które w większości wynikają z przeprowadzonych badań oraz są odzwierciedleniem celów pracy doktorskiej. We wniosku pierwszym Doktorantka podaje, że „choroba dotyka w większości osobniki młode co ma związek z nie w pełni rozwiniętym w tej grupie wiekowej układem odpornościowym” – ten fragment wniosku powinien zostać usunięty, gdyż funkcjonowanie i rozwój układu immunologicznego kotów nie były przedmiotem badań Doktorantki. Drugi wniosek można bardziej doprecyzować, gdyż równie często w obrazie klinicznym FIP stwierdzano apatię, osłabienie oraz gorączkę fluktuującą, nie reagującą na antybiotyki. A jeśli Doktorantce chodziło o objaw/zmianę widoczną w badaniu ultrasonograficznym, to również należy to wyraźnie zaznaczyć. We wniosku 4 proponuję pozostawić jedynie ostatnią jego część tj.: „Na podstawie obrazu ultrasonograficznego nie ma możliwości postawienia rozpoznania FIP, a co najwyżej jego podejrzenia”, co w sposób jasny i zwięzły oddaje uzyskane przez Doktorantkę wyniki i odzwierciedla cel pracy.

Podsumowanie

Wszystkie wychwycone przeze mnie nieścisłości, uchybienia czy pomyłki nie umniejszają w istotny sposób wartości naukowej dysertacji. Stwierdzam, iż przedłożona do recenzji rozprawa doktorska **prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną lek. wet. Dominiki Szulc w dyscyplinie weterynaria**, a w szczególności w zakresie tematyki prowadzonych badań. Ambitny plan badań obejmujący poza badaniami klinicznymi także badania z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych, oraz sposób jego realizacji, a także omówienia i analizy wyników, w tym krytycznego podejścia do niektórych aspektów przeprowadzonych badań, wykazuje, że **Doktorantka opanowała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**. Przedstawiona dysertacja **stanowi ponadto oryginalne rozwiązanie problemu naukowego** i dostarcza interesujących wyników, nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale także aplikacyjnego. Wyniki przeprowadzonych badań wzbogacają dotychczasową wiedzę na temat możliwości zastosowania badania ultrasonograficznego w diagnostyce FIP.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pani lek. wet. Dominiki Szulc pt.: „Obraz ultrasonograficzny narządów jamy brzusznej kotów z potwierdzonym badaniami molekularnymi zakaźnym zapaleniem otrzewnej (FIP)”, odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm). Na tej podstawie składam do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani lek. wet. Dominiki Szulc do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie weterynaria.

Prof. dr. hab. Małgorzata Pomorska-Mól

Kierownik Katedry
Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych