

Prof. dr hab. Renata Urban-Chmiel  
Zakład Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków  
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 03.01.2018r.

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Adama Żurka pt. „**Ocena swoistej odporności humoralnej cieląt na wybrane antygeny szczepów *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*”**”

Choroby układu oddechowego bydła stanowią jeden z głównych problemów zdrowotnych i ekonomicznych w produkcji zwierzęcej w kraju, oraz innych państwach UE i Ameryce Płn. Zwiększone wskaźniki zachorowalności, które w przypadku wielu stad przekraczają 60% zwierząt, wysoka śmiertelność, obniżone przyrosty wagowe, zmniejszone wykorzystanie paszy, niska jakość tuszy oraz wysokie koszty ponoszone na profilaktykę i terapię prowadzą w konsekwencji do ogromnych strat ekonomicznych w tym sektorze produkcji zwierzęcej. Straty wynikające z występowania zespołu oddechowego bydła wymagają kompleksowych działań, mających na celu ograniczenie zachorowalności i śmiertelności cieląt.

Proces chorobowy przebiega najczęściej przy udziale czynników wirusowych, wśród których wyróżnić można: bydłęcy wirus syncytialny, wirus parainfluenzy 3, wirus biegunki i choroby błon śluzowych, herpeswirusy bydłęce, koronawirusy, a także bakterii takich jak: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Mycoplasma bovis*, *M. dispar* i *Corynebacterium pyogenes*. Zasadniczą rolę w wywołaniu choroby odgrywa immunosupresja powstająca w efekcie interferencji wirusów w prawidłowe funkcjonowanie makrofagów i limfocytów m.in., poprzez hamowanie migracji i aktywności neutrofilów oraz proliferacji limfocytów B, osłabienie aktywności komórek NK, indukowanie procesów apoptozy limfocytów T CD4+ oraz indukowanie produkcji i uwalniania cytokin prozapalnych (IL-1, 8, TNF $\alpha$ ). Upośledzenie sprawności układu immunologicznego szczególnie z udziałem mechanizmów obronnych płuc, w tym również błon śluzowych, stwarza dogodne warunki do zasiedlenia i rozwoju zróżnicowanej flory bakteryjnej.

W etiopatogenezie zespołu oddechowego bydła, istotne znaczenie odgrywają także środowiskowe czynniki stresowe głównie transport zwierząt, tworzenie stada, walki o dominację, zmiana środowiska hodowlanego oraz sposób i jakość żywienia.

Celem minimalizacji strat oraz poprawy opłacalności produkcji bydła opasowego, w prowadzonych obecnie programach profilaktyki, poza eliminacją czynników usposabiających wykorzystuje się immunoprofilaktykę swoistą, utrudnioną przez polietiologiczny charakter syndromu oraz metafilaktykę polegającą na stosowaniu antybiotyków o szerokim spektrum działania. Pomimo ogromnego zaangażowania wielu renomowanych ośrodków badawczych, rozwiązania proponowane w immunoprofilaktyce syndromu oddechowego cieląt, zarówno pod względem konstrukcji szczepionki jak też metod i terminów szczepienia nie są satysfakcjonujące dla lekarzy weterynarii i hodowców zwierząt.

Jednym z działań prewencyjnych znajdujących zastosowanie w immunoprofilaktyce BRDC cieląt w wieku poniżej 2 miesięcy, jest wykorzystanie odporności biernej, uzyskanej za pośrednictwem siary, której przeciwciała indukowane są, efektem dwukrotnego podania antygenów szczepionkowych na 6 oraz 3 tygodnie przed spodziewanym terminem porodu. Wysoki poziom przeciwciał siarowych przeciwko antygenom wirusowym BVDV-1, BVDV-2, BRSV, BHV-1, BPIV-3 oraz bakteryjnym m.in. *M. haemolytica* może zapewnić odporność bierną, cechującą się wysokim poziomem przeciwciał siarowych u cieląt w wieku 3-4 mies. Niedobór transferu odporności biernej w następstwie np. zbyt długiego porodu, braku dostępu do siary, pojenia siarą złej jakości (stężenie Ig < 50g/L), stres, mogą przyczynić się braku skutecznej odporności biernej i w efekcie przyczynić się do zwiększenia strat cieląt w odchowcie do 6 miesiąca życia, obniżenia przyrostów wagowych, oraz wydłużenia średniego wieku pierwszego wycielenia jałówek.

W świetle powyższych informacji podjęcie przez Doktoranta badań z tego zakresu należy uznać za trafne i uzasadnione, zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Recenzowana rozprawa doktorska, przedstawiona w formie oprawionego wydruku komputerowego liczy 131 stron tekstu, 11 rycin, 4 tabele, 3 fotografie oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dysertację kończy 5 wniosków oraz wykaz 111 pozycji w większości anglojęzycznego piśmiennictwa. Układ pracy jest zgodny z wymogami stawianymi pracom naukowym wykonywanym na stopień doktora nauk weterynaryjnych. Obejmuje on przegląd piśmiennictwa, w którym przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczącej etiopatogenezy oraz epidemiologii zespołu oddechowego u bydła z uwzględnieniem szczegółowej analizy strat ekonomicznych w hodowli wielkostadnej. Jest to

prawidłowa analiza aktualnego piśmiennictwa będącego inspiracją do podjęcia badań będących tematem zrealizowanej pracy doktorskiej, świadcząca o dobrym przygotowaniu merytorycznym oraz bogatym doświadczeniu zawodowym Doktoranta.

We Wstępie pracy, który został przedstawiony na 16 stronach, Doktorant szczegółowo scharakteryzował etiopatogenezę syndromu oddechowego cieląt, omówił czynniki usposabiające do jego wystąpienia oraz przedstawił możliwości działań zapobiegających powstawaniu patologii. W tej części pracy Autor w wyczerpujący sposób scharakteryzował udział wirusowych i bakteryjnych czynników etiologicznych zespołu oddechowego wraz z patomechanizmami ich oddziaływania, przy predysponującym współdziałaniu stresowych czynników środowiskowych. Na szczególną uwagę zasługuje podkreślenie przez Doktoranta kluczowej roli udziału czynników predysponujących związanych z transportem, tworzeniem nowego stada oraz adaptacją zwierząt do nowych warunków środowiskowych w rozwoju syndromu oddechowego o charakterze wirusowo-bakteryjnym. W dalszej części tego rozdziału Doktorant przedstawił kompleksową charakterystykę aktualnie wykorzystywanych metod profilaktyki wraz z przykładami antygenów szczepionkowych wykorzystywanych w immunoprofilaktyce zespołu oddechowego u bydła. W końcowej części „wstępu” Autor skupia się na opisie zależności pomiędzy wykorzystywanymi do immunizacji antygenami pochodzenia bakteryjnego i wirusowego w szczepionkach komercyjnych oraz eksperymentalnych a uzyskiwanymi efektami protekcyjnymi. Oceniany rozdział jest aktualnym przeglądem piśmiennictwa głównie anglojęzycznego wyczerpująco omawiającym zagadnienia będące tematem rozprawy doktorskiej.

Rozdział „Założenia i cel badań” został przedstawiony bardzo syntetycznie, bez powtarzania informacji zawartych we wstępie pracy. Założonym przez Autora celem zrealizowanych badań była ocena efektywności przekazywania odporności siarowej skierowanej przeciwko czynnikom etiologicznym zespołu oddechowego cieląt pochodzących od krów nieszczepionych oraz ocena supresyjnego efektu swoistych przeciwciał biernych, w stosunku do najbardziej istotnych w etiopatogenezie syndromu antygenów *M. haemolytica* na efektywność odporności czynnej. Ostatnim elementem celu badań była analiza porównawcza wybranych białek ostrej fazy w ocenie statusu zdrowotnego w odniesieniu do wieku cieląt.

Oceniając rozdział „Materiał i metody” jestem przekonana, że Doktorant opanował wzorowo wykorzystywany w pracy warsztat badawczy. Bardzo szczegółowy opis metodyki, w którym wyodrębniono jedenaście podrozdziałów obejmuje szczegółowy opis schematu doświadczenia wraz z kompleksową charakterystyką zastosowanej w dysertacji metodyki badań. Należy podkreślić, że Doktorant precyzyjnie opisał sposób wykonania testów

immunoenzymatycznych, kolorymetrycznych oraz mikrobiologicznych, co w konfrontacji z zastosowanymi metodami statystycznymi, należy ocenić pozytywnie. Opis zastosowanych technik sprawia pozytywne wrażenie i chociaż w niektórych przypadkach wydaje się zbyt drobiazgowy np. „uzyskiwanie surowicy”, w ocenianej pracy należy ocenić pozytywnie. Ponadto, forma przedstawienia omawianego rozdziału umożliwia powtórzenie zastosowanych technik oraz konfrontację z wynikami uzyskanymi w innych ośrodkach badawczych.

W dziesięciostronicowym rozdziale „Wyniki”, który podzielono na sześć podrozdziałów Autor przedstawia adekwatną do części metodycznej pracy dokumentację w formie tabel, fotografii oraz rycin. Podrozdział pierwszy zawiera szczegółowy opis wyizolowanych od cieląt w pierwszych 4 tyg. opasu drobnoustrojów wraz z kompleksową oceną profili antybiotykowych przedstawioną w tabeli 2. W kolejnych podrozdziałach Doktorant prezentuje rezultaty uzyskane w efekcie pomiaru koncentracji immunoglobulin różnych klas, białka całkowitego oraz wybranych białek ostrej fazy w surowicach uzyskanych od cieląt i krów oraz serwatkach siary. Prezentowane rezultaty zostały opracowane statystycznie i przedstawione w postaci 6 rycin oraz 2 tabel. W przypadku Ryc. 4 należałoby usystematyzować legendę, ponieważ zawiera prawdopodobnie przekopowany z programu STATISTICA wykaz liczbowy, który nie jest wymagany przy takiej formie prezentacji wyników. Zaistniała sytuacja spowodowała również rozrzucenie legendy w obrębie całego wykresu, co utrudnia jego analizę.

Z punktu widzenia recenzenta sugeruję również zwrócenie szczególnej uwagi na kolejność numeracji poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów dotyczy to m.in. podrozdziału piątego i szóstego, w rozdziale „Wyniki” które powinny posiadać numery 6.5 oraz 6.6- podczas gdy Autor błędnie oznaczył je nr 5.5 i 5.6, co spowodowało, że kolejny rozdział „Omówienie wyników” zamiast nr 7, oznaczony został nr 6. Dotyczy to również kolejnych rozdziałów- „Wnioski”, streszczenia w jęz. polskim oraz angielskim, a także rozdziału „Piśmiennictwo”.

Warto również zwrócić uwagę na prawidłowość podpisów pod rycinami, dotyczy to np. ryc. 10, pod którą Autor napisał, że przedstawia koncentrację przeciwciał w serwatkach siary oraz surowicach cieląt. Podczas gdy w legendzie zawarte wyjaśnienia wyraźnie wskazują, że na wykresie przedstawiono koncentrację przeciwciał w surowicach pochodzących od krów i cieląt. Potwierdza to również informacja zawarta w tekście opisującym w/w rycinę.

Rozdział „Dyskusja” stanowi poprawnie napisaną analizę uzyskanych przez doktoranta wyników badań w konfrontacji z danymi aktualnego piśmiennictwa. Na jej podstawie jestem

przekonana, zarówno o dobrej znajomości przez Doktoranta badanych zagadnień, jak i zdolności porównania wyników badań własnych z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Autor ustosunkowuje się do analizowanych wyników i w sposób czytelny komentuje własne osiągnięcia, przeprowadzając podsumowania i sugestie dotyczące znaczenia uzyskanych wyników badań.

Drobne błędy językowe, które oznaczono w egzemplarzu pracy będącej w dyspozycji recenzenta można łatwo skorygować.

Zasadniczą część pracy kończy pięć wniosków, w których Autor zawiera całość zagadnień ujętych w przedstawionej do recenzji dysertacji. W poszczególnych wnioskach, Doktorant wskazuje, że przy wczesnym odsadzeniu cieląt, bezpośrednio po porodzie gwarancją właściwego transferu odporności siarowej jest odpajanie ze smoczka adekwatnymi porcjami siary dobrej jakości, tak aby uzyskany poziom przeciwciał we krwi cieląt w 48 godz. życia osiągał stężenie powyżej 10 mg/ml. Doktorant potwierdza jednocześnie, że poziom odporności biernej u cieląt w 2-gim mies. życia nie wpływa istotnie na indukcję humoralnej odpowiedzi immunologicznej w efekcie immunizacji antygenami *M. haemolytica*, co należy uznać za wartościowy efekt zrealizowanych badań. Wniosek trzeci stanowi kontynuację wniosku drugiego i potwierdza brak istotnego wpływu przeciwciał siarowych u cieląt w poszczególnych dniach opasu na indukcję odpowiedzi immunologicznej wywołanej wybranymi antygenami bakteryjnymi *M. haemolytica* Lkt i OMPs. Interesujące spostrzeżenie wynikające z przeprowadzonych badań Doktorant zawarł we wniosku czwartym, w którym wskazuje istotny wpływ uwarunkowań rasowych na efektywność uzyskiwanej przez cielęta odporności siarowej oraz poszczepiennej. W ostatnim, wniosku Autor formułuje spostrzeżenie, że ocena poziomu haptoglobiny oraz SAA u cieląt w pierwszych dniach życia jako wybranych markerów statusu ostrej fazy, z uwagi na brak różnic istotnych statystycznie nie może stanowić podstawy do oceny statusu immunologicznego cieląt.

Pracę kończy rozdział „Piśmiennictwo” liczący 111 pozycji aktualnych (ponad 60% publikacji z ostatnich 10 lat), anglojęzycznych prac eksperymentalnych, ściśle związanych z zagadnieniami prezentowanymi w recenzowanej pracy doktorskiej. Jestem przekonana, że błędy językowe oraz zróżnicowanie w skrótach tytułów niektórych czasopism zostanie skorygowane przy opracowywaniu pracy do druku.

Dostrzeżone nieścisłości w tym także błędy literowe, zostały naniesione w recenzowanym egzemplarzu pracy, do ewentualnego wykorzystania przez Autora przy przygotowaniu pracy do druku. Należy podkreślić, że nie mają one istotnego wpływu na wartość merytoryczną ocenianej dysertacji.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do recenzji dysertacja doktorska Pana lek. wet. Adama Żurka pt.: „Ocena swoistej odporności humoralnej cieląt na wybrane antygeny szczepów *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.), co upoważnia mnie do przedłożenia Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosku, o dopuszczenie lek. wet. Adama Żurka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Renata Urban-Chmiel