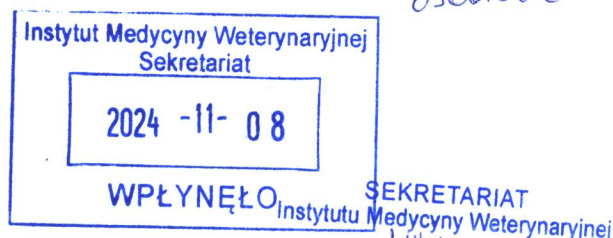


Dr hab. Magdalena Larska, prof. nadzw.  
Zakład Wirusologii  
Państwowy Instytut Weterynaryjny  
– Państwowy Instytut Badawczy



Puławy, 5 listopada 2024 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej

lekarza weterynarii Kingi Domrazek

pod tytułem

### **Wpływ różnych gatunków *Mycoplasma* spp., Herpesvirus canis typu 1 i *Chlamydia* spp. na jakość nasienia psa domowego (*Canis familiaris*)**

Ocena została wykonana na zlecenie Rady Dyscypliny Weterynaria, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie na podstawie uchwały z dnia 17 września 2024 r.

Niepłodność zwierząt towarzyszących staje się rosnącym problemem w ostatnich kilkunastu latach, podobnie jak u ich właścicieli. Na zdrowie psów, podobnie jak i ludzi wpływ mają zmiany cywilizacyjne tj. globalizacja, intensyfikacja przemieszczania, czy dostęp do opieki zdrowia oraz zmiany środowiska, np. kryzysy klimatyczne. W odróżnieniu od zwierząt gospodarskich, badania przeglądowe dotyczące zagrożeń epidemiologicznych u zwierząt towarzyszących są rzadko inicjowane, gdyż do każdego psa podchodzi się najczęściej jak do indywidualnego przypadku. Tym samym skala zagrożeń jest mało poznana, a co może nawet częstsze, może być źle interpretowana. Dlatego wybór kierunku i zastosowana metodyka badań lek. wet Kingi Domrazek wydają się bardzo trafne i mające na względzie zarówno aspekty poznawcze, jak i praktyczne. Interesariuszy takich badań, czyli właścicieli psów, zrzeszonych w Związku Kynologicznym w Polsce (ZKwP) jest ponad 30 tys., a problemy w rozrodzie psów są jednymi z częstszych powodów interwencji weterynaryjnych u psów rasowych. Charakter podjętych przez doktorantkę badań dotyczących zakażeń *Mycoplasma* spp., herpeswirusem psim typu 1 i *Chlamydia* spp. u psów jest oryginalny w skali kraju, a nawet pionierski w skali międzynarodowej, gdyż danych na temat wpływu tych zakażeń na płodność samców właściwie brak. Mimo, że Doktorantka nie wykazała takiego wpływu przy zakażeniach mykoplazmami, a wyniki dla pozostałych dwóch patogenów wskazują raczej na sporadyczne siewstwo u psów, wynik ujemny nie umniejsza wartości tych badań. Patogeny te znane są jako czynniki etiologiczne zakażeń układu oddechowego i oczu u dorosłych psów, a u ciężarnych suk mogą

prowadzić do resorpcji zarodków, ronień, mumifikacji płodów, czy urodzeń martwych szczeniąt. CHV-1 znany jest również z wywoływania wysokiej śmiertelności u szczeniąt w pierwszym miesiącu życia. Nie ma dowodów, że do transmisji tych patogenów u psów dochodzi drogą weneryczną, gdyż dane na temat roli samca w rozprzestrzenianiu się zakażeń mykoplazmami, chlamydiami i CHV-1 nigdy nie zostało jednoznacznie udowodnione. Dlatego należy podkreślić, że przeprowadzone badania mają charakter prac oryginalnych, pierwszych w kraju i stanowią dobry wstęp do dalszych badań.

Rozprawa doktorska lek. wet. Kingi Domrazek składa się z monotematycznego cyklu czterech publikacji, w tym jednej przeglądowej stanowiącej niejako wstęp do badań własnych. Wszystkie prace zostały opublikowane w języku angielskim w czasopismach z listy JCR i były poddane recenzji na zasadzie peer-review. We wszystkich publikacjach lek. wet. Kinga Domrazek jest pierwszą autorką, a jej wkład jest określony między 65% a 80%. Doktorantka przeanalizowała wyniki poszczególnych prac, które są spójne z tematem rozprawy i zaprezentowała je zbiorczo na 52 stronach tekstu z podziałem na następujące części: Streszczenia w języku polskim i angielskim; Wykaz skrótów; Wykaz publikacji stanowiących dysertację; Wstęp; Cel pracy; Materiały i Metody; Wyniki; Wnioski i Piśmiennictwo składające się z 90 nienumerowanych pozycji.

Streszczenia przedstawiają skrótowo i jasno cel i wyniki badań. Jedyna uwaga dotyczy wniosku podsumowującego streszczenie o treści: *„Mycoplasma spp. występuje powszechnie w różnych częściach układu rozrodczego psów i jej obecność nie jest związana z występowaniem niepłodności”* (str. 9), który nie jest poparty prezentowanymi badaniami. Doktorantka badała tylko wpływ na jakość nasienia samców, nie na płodność, a nie jest to jednoznaczne. Nie analizowała np. użytkowości badanych samców jako reproduktorów, czy liczebności miotów. Dodatkowo mycoplazmy są jednym z głównych czynników, które mogą mieć wpływ na rozrodczość suk hodowlanych wywołując u nich ronienie, czy resorpcje zarodków. Podobnie w streszczeniu angielskim istnieje tylko „infertility”, a nie „semen quality” (str. 11).

We wstępie Doktorantka przedstawiła ogólnie aktualną wiedzę dotyczącą problemów rozrodu samców i nowe techniki oceny jakości nasienia (CASA). Następnie przeanalizowała dostępną wiedzę dotyczącą każdej z grup badanych patogenów. W podrozdziałach dotyczących oddzielnie *Mycoplasma spp.*, herpeswirus psów typu 1 i *Chlamydia spp.* podała ich systematykę, charakterystykę, patogenność, drogi szerzenia się, dostępne metody diagnostyki, możliwości leczenia, czy profilaktyki.

W Materiałach i Metodach do oceny wpływu drobnoustrojów na jakość nasienia psa domowego wykorzystano 78 próbek wymazów z napletka i od 52 do 63 (w zależności od

patogenu) próbek wymazów z nasienia. Weryfikacja psów zdrowych do dalszych badań przeprowadzana była na podstawie kryteriów klinicznych i badania poziomu hormonów płciowych. Próbkę pobierano od psów zdrowych z poziomem hormonów w surowicy krwi nie odbiegających od normy. Jakość nasienia była oceniana makroskopowo, mikroskopowo i za pomocą wspomaganą analizy komputerowej CASA. Badania obecności materiału genetycznego *Mycoplasma* spp., Herpeswirusa psów typu 1 i *Chlamydia* spp. wykonywano w laboratorium komercyjnym za pomocą PCR i real-time PCR. Identyfikację poszczególnych gatunków mykoplazm przeprowadzono za pomocą PCR wykorzystując startery opisane w pracy przeglądowej. Dodatkowo do identyfikacji bakterii tlenowych zlecono badanie bakteriologiczne poszerzone o identyfikację gatunkową w aparacie MALDI-TOF w laboratorium komercyjnym. Wyniki tych badań nie były przedmiotem rozprawy doktorskiej, ale znalazły się w ostatniej publikacji cyklu. Dobór testów do badań statystycznych obejmujący testy nieparametryczne był prawidłowy, szczególnie, że badania objęły nierównie liczebnie grupy samców, a rozkłady zmiennych ilościowych nie spełniały warunków normalności. Podstawowym bowiem kryterium świadczącym o niepłodności była obecność i brak plemników w ejakulacie, i tak w grupie psów, u których badano wpływ obecności mykoplazm w napletku to było 6 psów z azospermią do 72 osobników z liczbą plemników w normie, a w przypadku badań wpływu obecności mykoplazm w nasieniu było to 6 (jeden z azoospermią i 5 z oligospermią) do 46 lub 57 psów z prawidłowym nasieniem. Warto jednak mieć na uwadze wpływ takich dysproporcji w liczebności grup w interpretacji wyników badań pod względem ich statystycznej istotności.

Wyniki. Mykoplazmy stanowią komensalną mikroflorę nabłonka układu rozrodczego zwierząt, dlatego badając wpływ ich obecności na zaburzenia w reprodukcji u psów, powinno się brać pod uwagę metodykę pozyskiwania nasienia, tak aby nie zanieczyścić go podczas ejakulacji mikroflorą napletka. Moją uwagę zwrócił bardzo duży odsetek określanych jako *Mycoplasma* spp.-dodatnie samce, czyli te które posiadają bakterie w napletku bądź nasieniu. Gatunkiem dominującym w napletku był *M. cynos*, który stwierdzono w ponad 60% wymazów. Gatunek ten zasiedlający układ oddechowy uznawany jest za potencjalny patogen biorący udział w CIRDC (z ang. Canine Infectious Respiratory Disease - zakaźna choroba układu oddechowego psów). W nasieniu natomiast dominował *M. HRC689* oraz *M. canis*. Dlatego mam dwie wątpliwości: 1) czy obecność takiej różnorodności gatunków mykoplazm nie jest związana na przykład z kontaminacją błony śluzowej napletka przez te samo zwierzę lub inne znajdujące się w hodowli/schronisku; 2) w jaki sposób zabezpieczono nasienie przed zanieczyszczeniem mikroflorą śluzówki napletka przy pobieraniu ejakulatu? W badaniach aż u

38 z 63 psów (60%) stwierdzono obecność materiału genetycznego bakterii w nasieniu, co sugeruje, że namnażają się one w układzie rozrodczym samców. Dodatkowo w przypadku 10 z 38 nie możliwa była identyfikacja gatunku mykoplazm. Doktorantka nie porównała wyników badań wymazów z napletka i nasienia, a przedstawiła je jako dwie oddzielne grupy tak jak zostały opublikowane. Może warto by było je porównać, jeśli część próbek pochodziłaby od tych samych osobników? Należy również zaznaczyć, że Doktorantka w pracy nie określała żywych mykoplazm, tylko wykrywała materiał genetyczny za pomocą PCR bezpośrednio z wymazów, więc nawet jeśli zastosowano by ilościowy PCR w czasie rzeczywistym, należałoby zachować ostrożność w stawianiu zależności między składem mykoplazm w mikrobiomie układu rozrodczego samców a ich niepłodnością. W badaniach bakteriologicznych wykonywanych dodatkowo przez Doktorantkę już tylko z 13% próbek wymazów z nasienia namnożono bakterie tj. *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus vitulinus*, *E. coli* i *Pseudomonas* sp.. Niemniej jednak wszystkie badania podjęte lub zainicjowane przez Doktorantkę mają bardzo dużą wartość poznawczą i referencyjną, szczególnie w czasach kiedy tradycyjne metody mikrobiologiczne ze względu na trudności w wykonaniu wypierane są przez szybkie i czułe metody biologii molekularnej.

W badaniach CHV-1 Doktorantka skoncentrowała się również na wykrywaniu materiału genetycznego wirusa i nie wybrała testów serologicznych, najczęściej wykorzystywanych do określenia ekspozycji i/lub latencji alfaherpeswirusami. W podsumowaniu wyników (str. 44) Doktorantka stwierdza, że cytując: „*istnieje ryzyko, że uzyskano wyniki fałszywie ujemne, gdyż niektórzy autorzy sugerują, iż siewstwo wirusa w stanie latencji jest niewielkie. Z drugiej jednak strony, diagnostyka metodami molekularnymi jest niezwykle czuła i zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych jest niezwykle małe*”. Myślę, że taki wniosek wynika to z nieprecyzyjnie określonego celu pracy: „*Ocena wpływu drobnoustrojów na jakość nasienia psa domowego*”. Bo, w przypadku badań mikroflory tj. mykoplazmy i chlamydie, sama obecność bakterii w badanym materiale jest miarodajna. Do tego badania zostały realizowane poprzez: „*Ocenę i porównanie jakości nasienia psów-nosicieli [...] Herpesvirus canis [...]*”, (str. 28), czyli psów zakażonych. W przypadku zakażenia CHV-1 u psów, jak w przypadku wielu innych alfaherpeswirusów dochodzi do zakażenia latentnego i wirus zostaje uśpiony w tkance limfatycznej w formie związanej z komórkami. Jego siewstwo w stanie wolnym związane jest z wystąpieniem czynników immunosupresyjnych. Nie zgadzam się, że badanie serologiczne jest niemiarodajnym dla CHV-1, bo jest z sukcesem używane np. do doboru buhajów w centrach unasieniania, których status dotyczący BoHV-1 oparty jest na badaniu surowicy na obecność

specyficznym przeciwciał. Oczywiście badanie serologiczne nie powie kiedy doszło do ekspozycji, ale siewstwo z nasieniem tym bardziej będzie miało charakter przejściowy, dlatego nawet przy zastosowaniu najczulszych metod biologii molekularnej, możemy uzyskać wynik fałszywie ujemny badając zakażonego samca jednokrotnie. Reaktywacja CHV-1 u latentnie zakażonych psów i jego siewstwo, podobnie jak u bydła, nawet po zastosowaniu immunosupresyjnie kortykosterydów jest najczęściej bezskuteczna. Trudno znaleźć na to dowody, gdyż prace lek. wet. Kingi Domrazek są prawdopodobnie jedynymi w najnowszej literaturze, w których badano siewstwo wirusa u psów z nasieniem. Istnieje tylko praca Ledbettera i wsp. (2010) o próbie eksperymentalnej reaktywacji CHV-1 u psów zakażonych latentnie po miejscowym zastosowaniu prednizolonu do worka spojówkowego, która jednak nie zakończyła się sukcesem. Dlatego moją sugestią jest włączenie serologii w badania przesiewowe psów w przyszłości i zachęcam do kontynuowania przez lek. wet Kingę Domrazek tych bardzo potrzebnych badań.

Na podstawie wyników badań Doktorantka sformułowała pięć syntetycznych i trafnych wniosków końcowych. Pomimo, że występowanie CHV-1 w nasieniu u polskich psów-samców było sporadyczne, zachęcam Panią lek. wet. Domrazek do dalszych badań i objęcie również niepłodności u suk i rolę w etiologii śmiertelności i zachorowań u młodych szczeniąt. Należy podkreślić nie tylko wartość merytoryczną rozprawy, ale także zaangażowanie się Doktorantki w próbkobranie i pozyskanie tak licznej próby psów, co wymagało współpracy i zaufania ze strony właścicieli reproduktorów. Może niewiele osób o tym wie, ale Autorka rozprawy jest aktywną hodowczynią i członkiem ZKwP, a jako lekarz weterynarii zaangażowana jest w popularyzację wiedzy o problemach w rozrodzie zarówno dla lekarzy, jak i hodowców.

Drobne uwagi redakcyjne, które nie umniejszają wartości naukowej dysertacji dotyczą:

- w tytule jak i w tekście powinna być nazwa polska: herpeswirus psów typu 1;
- braku wydruku artykułu 2, jednak znajduje się on w wersji elektronicznej;
- brak Supplementary Materials w ostatnim artykule w wersji drukowanej i elektronicznej rozprawy.

**Podsumowując, przeanalizowawszy udostępnione mi materiały, mimo drobnych uwag i sugestii, oceniam rozprawę doktorską Pani lek. wet. Kingi Domrazek pt. Wpływ różnych gatunków *Mycoplasma* spp., Herpesvirus canis typu 1 i *Chlamydia* spp. na jakość nasienia psa domowego (*Canis familiaris*)” bardzo wysoko. Stwierdzam, że w pełni odpowiada ona warunkom stawianym rozprawom doktorskim określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.) i wnoszę**

do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Kingi Domrazek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie w związku z tym, że prace stanowiące cykl są unikalne i mają duże szanse być szeroko cytowane, wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą Rektora SGGW.



.....

dr hab. Magdalena Laska, prof. nadzw. PIWet-PIB