

Dr hab. Magdalena Larska, prof. PIWet-PIB
Dział Wirusologii i Wirusowych Chorób Zwierząt
Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy
Al. Partyzantów 57
24-100 Puławy
m.larska@piwet.pulawy.pl

Puławy, 20 sierpnia 2026 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

lekarza weterynarii **Hanny Turlewicz-Podbielskiej**

pod tytułem

„Przydatność płynu technologicznego pozyskanego wyłącznie z jąder w diagnostyce wybranych zakażeń wirusowych u świń”

Podstawą do oceny jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, nr 9/2026 z dnia 29 maja 2026 r.

Praca została wykonana w Katedrze Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach UP w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Pomorskiej-Mól, przy współudziale promotora pomocniczego dr. n. wet. Arkadiusza Dorsa. Rozprawa została przygotowana w dziedzinie nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie weterynaria.

Tematyka pracy wpisuje się w aktualny kierunek badań nad poszukiwaniem alternatywnych materiałów biologicznych, które mogą być wykorzystywane w diagnostyce i monitorowaniu zakażeń w dużych populacjach świń. Tradycyjne pobieranie indywidualnych próbek krwi, szczególnie w przypadku bardzo młodych prosiąt, wiąże się z nakładem pracy, kosztami oraz określonymi ograniczeniami dobrostanowymi. Z tego względu zainteresowanie budzą matryce pozyskiwane podczas rutynowo wykonywanych zabiegów zootechnicznych, w tym płyn technologiczny. Szczególne znaczenie ma płyn ustny pobierany za pomocą lin zawieszonych w kojcach. Materiał ten może zawierać kwasy nukleinowe patogenów oraz swoiste przeciwciała i jest szeroko stosowany m.in. w monitoringu zakażeń PRRSV i PCV2. Jego zaletą jest nieinwazyjne pobieranie i możliwość jednoczesnego reprezentowania wielu zwierząt. Innymi użytecznymi matrycami są płyny technologiczne (zabiegowe) uzyskiwane podczas rutynowych zabiegów wykonywanych u prosiąt oraz sok mięsny, które mogą stanowić alternatywę dla surowicy w badaniach serologicznych. W zależności od charakteru zakażenia

wykorzystuje się także kał, wymazy z nosa lub powierzchni ciała oraz próbki środowiskowe. Zastosowanie takich materiałów umożliwia zwiększenie liczby monitorowanych zwierząt przy ograniczeniu kosztów, nakładu pracy i stresu związanego z pobieraniem próbek, choć ich przydatność diagnostyczna zależy od badanego patogenu, metody laboratoryjnej i strategii pobierania próbek. W przedstawionej rozprawie Doktorantka skoncentrowała się na płynie pozyskiwanym wyłącznie z jąder kastrowanych prosiąt (TOPF) i podjęła próbę oceny jego przydatności w diagnostyce dwóch istotnych zakażeń wirusowych świń: wirusa zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRSV) i cirkowirusa świń typu 2 (PCV2). Zakres badań obejmował zarówno wykrywanie materiału genetycznego wirusów, jak i swoistych przeciwciał, a także ocenę wpływu pulowania próbek oraz możliwość wykorzystania TOPF do wnioskowania o statusie zdrowotnym miotów czy stad.

Rozprawę stanowi jednotematyczny cykl trzech opublikowanych artykułów naukowych. Pierwsza praca opublikowana w 2020 r. ma charakter przeglądowy i dotyczy alternatywnych strategii monitorowania chorób wirusowych świń, natomiast dwie kolejne są pracami oryginalnymi poświęconymi odpowiednio zastosowaniu TOPF w diagnostyce PRRSV oraz PCV2. Publikacje ukazały się w *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *Journal of Veterinary Research* oraz *Frontiers in Veterinary Science*. Badania były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM nr 2020/37/N/NZ7/00084, którego kierownikiem była Doktorantka. Projekt dotyczył szerszego zastosowania płynu zabiegowego w postaci dwóch matryc, czyli płynu z ogonków i jąder.

Na rozprawę składa się 81-stronicowe opracowanie tekstowe oraz indywidualne oświadczenia współautorów i kopie publikacji wchodzących w skład cyklu. Należy zaznaczyć, że Doktorantka była pierwszym autorem we wszystkich pracach i jej wkład szacowany na 70% był znaczący. Rozprawa jest dość obszerna i tekst w dużej mierze jest powtórzeniem publikacji przetłumaczonym na język polski, w którym dysertacja została przygotowana.

Ocena ogólna. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że autorka nie ograniczyła badań jedynie do wykazania obecności wirusa lub przeciwciał, lecz podjęła próbę określenia praktycznej wartości diagnostycznej nowej matrycy. Takie podejście świadczy o dojrzałości projektowania badań. Streszczenia przedstawiają skrótowo i jasno cel i wyniki badań. Jedyna uwaga dotyczy sformułowania „niewykrycie próbek o niskim mianie wirusa” (str. 5) i odpowiadające mu „low viral titer” (str. 7), gdyż test qPCR wykorzystano do jakościowej klasyfikacji próbek na podstawie wartości Ct, bez ilościowego oznaczenia liczby kopii materiału genetycznego wirusa.

Cele pracy są logiczną konsekwencją hipotez. Obejmują one ocenę: możliwości wykrywania przeciwciał przeciwko PRRSV i PCV2; wykrywania materiału genetycznego obu wirusów; wpływu pulowania próbek; porównania wyników uzyskanych z TOPF i surowicy; możliwości wykorzystania TOPF do monitorowania całych miotów. Pierwsze trzy cele zostały sformułowane w sposób umożliwiający ich bezpośrednią realizację eksperymentalną. Czwarty cel, odnoszący się do całego miotu, wymagał natomiast analizy na poziomie miotu, której w przedstawionych badaniach nie przeprowadzono.

Pomimo że we Wstępie szeroko omówiono znaczenie PRRSV i PCV2, ich patogenezę, konsekwencje kliniczne oraz zasady diagnostyki i monitoringu, zabrakło syntetycznej analizy aktualnej sytuacji epizootycznej dotyczącej obu zakażeń. W przypadku PCV2 ograniczono się przede wszystkim do stwierdzenia jego szerokiego rozpowszechnienia w Europie i na innych kontynentach, natomiast dla PRRSV nie przedstawiono nawet analogicznej charakterystyki epidemiologicznej. Ma to znaczenie dla całej logiki rozprawy: skoro jednym z głównych argumentów za TOPF ma być jego wykorzystanie do monitorowania zakażeń i oceny sytuacji w stadzie, należałoby oczekiwać, że Wstęp pokaże nie tylko biologię obu wirusów, lecz również skalę problemu epizootycznego, który proponowane narzędzie diagnostyczne ma pomagać rozwiązywać. Dodatkowo widzę tu pewną dysproporcję: sporo miejsca poświęcono taksonomii, patogenezie i genotypom, natomiast znacznie mniej informacji bezpośrednio uzasadniających potrzebę monitoringu z punktu widzenia aktualnej epidemiologii zakażeń.

Materiałem do badań były próbki surowic od 3-5-dniowych loszek i knurków oraz próbki TOPF z 62 wybranych miotów z 18 stad z 11 powiatów. Dane geograficzne i mapa wydają się zbędne, gdyż nie badano wpływu lokalizacji fermy na występowanie zakażeń. Liczby reprezentujące obie płci prosiąt były porównywalne i do badań użyto aż 703 osobników, co jest mocną stroną pracy. Jednak dostrzegłam fragmentaryczność danych dotyczących statusu epizootycznego, zdrowotnego, czy stosowanych szczepień. Metadane na poziomie miotu były niepełne i nie zostały wykorzystane do analiz, które prowadzono na indywidualnych zwierzętach. Opisy zastosowanych testów komercyjnych są zbyt obszerne. Brakuje danych dotyczących SE i SP deklarowanych przez producentów testów lub przy ich braku z piśmiennictwa. Również przedstawianie sposobu pulowania dla każdej z metod i każdego wirusa oddzielnie wydaje się zbędne, gdyż można by te informacje przedstawić tabelarycznie, a nie opisowo.

Do oceny zastosowania TOPF obliczano czułość, swoistość, PPV, NPV i κ Cohena. W metodach Autorka podaje, że wyniki surowicę traktowano jako „złoty standard”, a dla czterech komercyjnych testów zastosowano analizę ROC w celu wyznaczenia optymalnego punktu

odcienia dla TOPF. Może warto by było padać w tym miejscu w jaki sposób obliczano PPV i NPV? W pracy nie przedstawiono ani nie uwzględniono czułości i swoistości diagnostycznej zastosowanych komercyjnych testów ELISA, RT-qPCR i qPCR dla materiału referencyjnego. Tym samym założono stuprocentową poprawność klasyfikacji próbek surowicy. Założenie takie nie jest uzasadnione, ponieważ również test referencyjny może generować wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne. W konsekwencji obliczone dla TOPF wartości SE, SP, PPV i NPV należy interpretować raczej jako parametry względne względem wyników uzyskanych z surowicy, a nie jako bezwzględne parametry diagnostyczne względem rzeczywistego statusu zakażenia zwierząt. Problemem nie jest użycie surowicy jako komparatora, lecz nazwanie wyniku testu komercyjnego wykonanego w surowicy złotym standardem, mimo że nie wykazano, iż metoda referencyjna ma 100% czułości i swoistości diagnostycznej ani nie określono rzeczywistego statusu zakażenia inną niezależną metodą.

W wynikach w pierwszej kolejności przedstawiono dane seroprewalencji i prewalencji obu wirusów, jednak ponieważ nie przeprowadzono żadnej analizy epizootycznej i nie dostarczono danych o reprezentatywności badanych prosiąt, właściwszym byłoby określenie „odsetków” jak to przedstawiono na Rycinach 6 (str. 39), 7 (str. 41), 8 (str. 44) i 9 (str. 46) w tekście rozprawy. W wynikach pokazano, że odsetki seropozytywnych i RT-PCR/PCR dodatnich próbek surowic nie różniły się pomiędzy knurkami i loszkami, co pokazuje, że płęć prosiąt nie miała wpływu na zakażenie, a co za tym idzie próbki TOPF są reprezentatywne dla całego miotu. Niestety wyników nie analizowano na poziomie miotu, a jedynie jako niezależne próbki pojedyncze. Doktorantka porównywała surowicę danego knurka z odpowiadającym mu TOPF, a więc są to dane sparowane, natomiast zastosowała m.in. test niezależności χ^2 . Sama rozprawa mówi wprost o teście niezależności χ^2 . Dla binarnych wyników sparowanych właściwszy byłby test McNemara. Analogicznie porównanie wartości ciągłych pochodzących od tego samego zwierzęcia powinno uwzględniać sparowanie. Ponadto prosięta są zhierarchizowane w w miotach, a mioty w stadach. Następnie Doktorantka przeszła do określania ROC i optymalizacji wartości odcięcia przy użyciu wszystkich dostępnych próbek od knurków. I tak na przykład dla PRRSV RT-qPCR materiał obejmował 348 par surowica/TOPF, z czego referencyjne surowice dodatnie stanowiły jedynie 21,26% (74/348). Jeszcze większa dysproporcja występowała w przypadku PCV2 qPCR. Spośród 361 surowic samców jedynie 47 (13,02%) było dodatnich. Sama nierówna liczebność grup nie unieważnia ROC. Problem jest bardziej subtelny. Przy stosunkowo niewielkiej liczbie przypadków dodatnich punkt odcięcia może być mniej stabilny, a wysokie wartości swoistości szczególnie dobrze określone dzięki dużej liczbie próbek ujemnych. Podczas gdy oszacowana wartość

czułości opiera się na znacznie mniejszej liczbie obserwacji i co za tym idzie jest obciążona większą niepewnością. Dodatkowo, w znalezionym opisie wyników podano pojedyncze wartości AUC i wyznaczone optymalne cut-offy, natomiast nie obliczano dla nich przedziałów ufności. Nie przeprowadzono też formalnego statystycznego porównania AUC. Pewne wątpliwości budzi optymalizacja i ustalenie sztywnego punktu odcięcia dla ELISA PCV2 dla TOPF jako stałej bezwzględnej wartości 0,23, gdyż próg producenta jest wyznaczany dla konkretnej płytki jako OD kontroli ujemnej + 0,25. Niestabilność związana z dysproporcją próbek ujemnych i dodatnich szczególnie dla wykrywania PCV2 zakażonych knurków można zaobserwować w przedziałach ufności (PU) w Tabeli 6 pracy 3, gdzie 95% PU dla wartości SE qPCR wahały się od 74,26 do 95,17%, przy znacznie węższym zakresie 95% PU dla SP. Lepszym rozwiązaniem byłoby losowe dobranie podobnej liczby próbek ujemnych i dodatnich, a jeszcze idealniej wybranych na podstawie metody referencyjnej do testu komercyjnego o nieokreślonych SE i SP. Można by również lepiej oszacować stabilność wyznaczonych wartości odcięcia jeśli Doktorantka przedstawiłaby rozkład wartości OD, S/P i Ct w kategoriach próbek dodatnich i ujemnych dla PRRSV. Rozkład danych w formie wykresów pudełkowych przedstawiono dla wartości OD w ELISA PCV2 (Rycina 1, praca 3) dla poszczególnych rodzajów próbek, bez podziału na matryce klasyfikowane jako dodatnie i ujemne, co przy dużej liczbie wyników ujemnych nie jest zbyt pomocne. Wartości podawane są sumarycznie jako minimalna, średnia i maksymalna wartość dla rodzaju matrycy w obu publikacjach, jednak ma to małą wartość informacyjną, szczególnie w pracy która ma na celu ocenę możliwości różnicowania zwierząt zakażonych od niezakażonych. Doktorantka pokusiła się o zbadanie korelacji wartości Ct w qPCR dla PCV2 w 67 parach surowic i TOPF, stwierdzając średnią (współczynnik Spearmana $\rho=0.53$), ale istotną ($p<0.05$) zależność tych wartości (Ryc. 4, praca 3). Pewne wątpliwości budzi jednak sposób przeprowadzenia tej analizy. Do obliczeń włączono wszystkie próbki, w których DNA PCV2 wykryto przynajmniej w jednej z matryc, a wynikiem niewykrywalnym arbitralnie przypisano wartość $Ct = 45,1$. Z danych w tabeli uzupełniającej pracę 3 (nie ujętą w monografii) wynika, że aż 26 z 67 par zawierało wynik ujemny w jednej z dwóch matryc, a tylko 41 par posiadało rzeczywiście oznaczone wartości Ct zarówno w surowicy i TOPF. Po ograniczeniu analizy do tych 41 par, współczynnik ρ wynosiłby około 0,07 i nie były istotne statystycznie. Wskazuje to, że obserwowana korelacja jest w znacznym stopniu zależna od sposobu zakodowania wyników niewykrywalnych, a nie od rzeczywistej zależności pomiędzy zmierzonymi wartościami Ct w obu matrycach.

Dyskusja jest obszerna, może nawet za obszerna i została oparta na szerokim piśmiennictwie, a Doktorantka w sposób szczegółowy konfrontuje uzyskane wyniki z

wcześniejszymi badaniami dotyczącymi wykorzystania PF i TOPF w diagnostyce zakażeń wirusowych świń. Co warto podkreślić, Autorka dostrzega także szereg ograniczeń praktycznych, w tym możliwość uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych przy niskim mianie patogenu, wpływ etapów przedanalizacyjnych oraz ryzyko kontaminacji przy pobieraniu próbek TOPF. Problem ten można byłoby znacznie lepiej uwzględnić, analizując hierarchiczną strukturę danych: 1) prosię; 2) miot; 3) stado. Dyskusja pozostawia jednak pewien niedosyt w zakresie krytycznej interpretacji części wyników. Nie omówiono konsekwencji traktowania wyniku testu wykonanego w surowicy jako bezwzględnego standardu referencyjnego, nie uwzględniono wpływu statusu epizootycznego badanych stad i programów szczepień. Jest to szczególnie istotne wobec przyjęcia wyników uzyskanych w surowicy za złoty standard służący do oceny czułości, swoistości oraz wyznaczenia optymalnego punktu odcięcia dla TOPF. Dla przykładu, w niecytowanej pracy Palya i wsp. (2018), w której zastosowano ten sam zestaw ELISA Ingezim Circo IgG 11.PCV.K1 do wykrywania przeciwciał przeciw PCV2 porównano jego wyniki z testem neutralizacji wirusa i uzyskano dla niego SE 82,81% i SP tylko 50%. Badania co prawda dotyczyły starszych prosiąt, wskazują jednak jednoznacznie, że wynik tego testu w surowicy nie powinien być automatycznie utożsamiany z klasyfikacją statusu serologicznego przez złoty standard. Nieuwzględnienie niedoskonałości metody referencyjnej może wpływać na interpretację rozbieżności pomiędzy TOPF i surowicą oraz na oszacowane parametry diagnostyczne nowej matrycy. Zacytowane badania dotyczyły zakażeń PCV2d-2, co przypomina również o braku weryfikacji wyników zastosowanych w dysertacji QRT-PCR i qPCR. Wrywkowe nawet potwierdzenie poprzez sekwencjonowanie, pozwoliłoby Doktorantce ustalić specyfikę genotypową krążących szczepów, a w przyszłości pozwolić na analizę filogenetyczną i możliwości diagnostyczne użytych metod. Ponieważ nie było to celem badań, proszę potraktować tę uwagę jako sugestię pogłębiania tej wiedzy w przyszłości i jako komplement, że udało się Pani mnie zaintrygować perspektywą dalszych badań. Kolejną niepodjętą w dyskusji kwestią jest wykrywanie u badanych prosiąt w pierwszym tygodniu życia obecności przeciwciał matczynych, raczej niż przeciwciał powstałych po ich zakażeniu i serokonwersji. Doktorantka częściowo dostrzega ten problem, szczególnie w publikacji 3, wskazując, że PF reprezentuje pojedynczy, wczesny punkt pobrania oraz że wyniki serologiczne mogą odzwierciedlać biernie nabyte przeciwciała matczyne. Nie przedyskutowano jednak szerzej, w jakim stopniu wiek zwierząt może wpływać na właściwości TOPF, zgodność z surowicą oraz możliwość uogólnienia zaproponowanych punktów odcięcia na inne grupy wiekowe. Po raz kolejny powtarzam, że można by tego uniknąć hierarchizując dane do poziomu miotów, czy stad. Zastrzeżenia budzi również postawienie wniosku o

możliwości oceny statusu całego miotu na podstawie braku istotnych różnic pomiędzy zagregowanymi odsetkami wyników dodatnich w TOPF i surowicy prosiąt obu płci. Brak istotności statystycznej nie stanowi dowodu równoważności ani zgodności na poziomie konkretnego miotu. W tym kontekście bardziej przekonująca byłaby analiza, w której jednostką epidemiologiczną i statystyczną byłby miot o niezależnie określonym statusie zakażenia. Brak klasyfikacji oraz analizy poszczególnych miotów utrudnia rozdzielenie wpływu odporności biernej, rzeczywistego zakażenia i potencjalnej kontaminacji, a także ogranicza możliwość zweryfikowania deklarowanej przydatności TOPF do oceny statusu całego miotu.

W Podsumowaniu Doktorantka odniosła się bezpośrednio do czterech postanowionych na początku pracy celów i według mojej oceny w pełni zrealizowała trzy pierwsze. Czwarty cel określony jako: „Analizę możliwości wykorzystania wyników uzyskanych z TOPF w ocenie statusu zdrowotnego całego miotu (knurków i loszek) w odniesieniu do badanych wirusów”, w mojej opinii, nie został w pełni zrealizowany. Nie zweryfikowano również ostatniej hipotezy, która mówiła o wynikach uzyskanych z analiz TOPF jako reprezentatywnych dla całego miotu. W przedstawionych badaniach nie prowadzono oceny klinicznej, nie klasyfikowano miotów jako zdrowe lub chore i nie zastosowano niezależnego kryterium referencyjnego pozwalającego określić ich status zdrowotny. Analizy dotyczyły natomiast występowania przeciwciał i materiału genetycznego PRRSV oraz PCV2, a więc statusu serologicznego i/lub zakażenia. W konsekwencji uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do rozważań nad możliwością wykorzystania TOPF do oceny ekspozycji lub statusu zakażenia badanymi wirusami, lecz nie pozwalają, w mojej ocenie, na realizację celu w takim zakresie, w jakim został on sformułowany.

Na koniec Doktorantka sformułowała sześć wniosków, które w większości zgodne są z wynikami badań i zostały zinterpretowane prawidłowo. Jedyną wątpliwość budzi ostatni, gdzie Doktorantka znów podkreśla, że brak wpływu różnic płciowych na wykrywanie zakażeń PCV2 i PRRSV wskazuje na możliwość ekstrapolacji wyników TOPF na cały miot.

Od strony redakcyjnej rozprawa została przygotowana starannie, niemniej w tekście występują pojedyncze literówki, uchybienia interpunkcyjne oraz pewne niekonsekwencje w stosowanej terminologii i oznaczeniach statystycznych, które wymagają korekty. Drobne uwagi redakcyjne, które nie umniejszają wartości naukowej dysertacji dotyczą:

- niejednolitego oznaczenia różnic statystycznie istotnych między kolumnami w rycinach 6 (str. 39), 7 (str. 41), 8 (str. 44) i 9 (str. 46). W Ryc. 6 są to litery „a” i „b” (mimo że obie pokazują wartość $p < 0,05$), a w pozostałych zaznaczone są jako „*”. Dodatkowo nie określono, co oznaczają słupki błędów, które wyglądają identycznie dla każdego odsetka.

- niespójności w podawanej wartości punktu odcięcia RT-qPCR dla PRRSV (43,96 vs 44,96 Ct) oraz związanych z nim parametrów diagnostycznych. Dla PRRSV prawidłowy punkt ROC jest w wynikach podany jako Ct 43,96. Tymczasem w dyskusji pojawia się Ct <44,96 (str. 54). Co więcej, dalej podano, że po zmianie cut-off SE spadła z 67,57% do 64,86%, podczas gdy w innym miejscu stwierdzano, że SE pozostawała na poziomie 67,57% (Tabela 5, praca 2).
- braku tabeli ujętej jako Supplementary Materials w pracy 3.

Podsumowując, przeanalizowawszy udostępnione mi materiały, mimo uwag i sugestii, oceniam rozprawę doktorską Pani lek. wet. Hanny Turlewicz-Podbielskiej bardzo dobrze. Rozprawa ta stanowi oryginalny wkład w rozwój dyscypliny i ma duży potencjał praktyczny. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością w planowaniu badań, czego dowodem jest pozyskanie ich finansowania z NCN i skrupulatne realizowanie założeń projektu. Uwagi krytyczne odnoszą się przede wszystkim do zakresu interpretacji wyników i możliwości ich uogólnienia na poziom miotu lub stada, nie podważają natomiast wartości przeprowadzonych badań ani ich znaczenia dla dalszego rozwoju metod monitoringu zakażeń świń.

Stwierdzam, że odpowiada ona warunkom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Hanny Turlewicz-Podbielskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z wyrazami szacunku,



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