

Prof. dr hab. Tadeusz Frymus
Kierownik Zakładu Chorób Zakaźnych
Katedra Chorób Małych Zwierząt z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

17.04.2017.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej lek. wet. Ewy Kwit
pod tytułem**

WYKRYWANIE I CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW WIRUSA MYKSOMATOZY KRÓLIKÓW Z ZASTOSOWANIEM METOD MOLEKULARNYCH

Charakterystyka rozprawy

Myksomatoza jest jedną z najważniejszych chorób zakaźnych królików. Ma duże znaczenie ekonomiczne przede wszystkim na fermach tych zwierząt, ale także w chowie drobnotowarowym. Zagraża wreszcie i królikom trzymanym jako zwierzęta towarzyszące.

Objawy tej choroby bywają nierzadko mało charakterystyczne, stąd często wymagane jest jej laboratoryjne potwierdzenie. Ponieważ myksomatoza może się bardzo szybko szerzyć, wczesne rozpoznanie ma kluczowe znaczenie dla jej zwalczania. I właśnie molekularnymi możliwościami wczesnej diagnostyki tej choroby zajęła się Doktorantka w swojej rozprawie. Wybór ten jest niewątpliwie trafny, tym bardziej, że w zespole w którym ona pracuje istnieje tradycja badań i osiągnięć w zakresie myksomatozy i innych chorób królików. Wykorzystując zgromadzone w zespole przez ponad 30 lat 54 izolaty wirusa z 33 ognisk myksomatozy z różnych rejonów Polski, a także szczepy szczepionkowe, Doktorantka postawiła sobie następujące cele pracy:

1. Zbadanie zmienności genetycznej krążących w Polsce szczepów i pokrewieństwa z izolatami zagranicznymi i ich analiza filogenetyczna;
2. Dobranie starterów oraz opracowanie metody PCR z wewnętrzną kontrolą amplifikacji i sprawdzenie jej przydatności do rozpoznawania myksomatozy w polskich warunkach;
3. Dobranie starterów tej metody do różnicowania zjadliwych izolatów terenowych od atenuowanych szczepów szczepionkowych tego wirusa.

Doktorantka podała ponadto, że jej celem było też „zastosowanie” opracowanej metody PCR do diagnostyki myksomatozy, ale nie wydaje się, by zastosowanie metody mogło być samym w sobie celem pracy naukowej.

W części poświęconej zmienności genetycznej i analizie filogenetycznej szczepów wirusa myksomatozy Doktorantka porównała bardzo zmienny fragment genu M036L o długości 1055 par zasad sześciu szczepów wirusa wyizolowanych z różnych rejonów Polski w latach 1983-2006 oraz 18 szczepów z Brazylii, Australii, Wielkiej Brytanii i Hiszpanii wyizolowanych w latach 1949-1999. Analiza ta

ujawniła wysokie (ponad 90%) podobieństwo krajowych i zagranicznych izolatów, jak i szczepu szczepionkowego, choć dało się w nich wyróżnić 2 gałęzie filogenetyczne – europejską i australijską. Na tej podstawie Doktorantka wyciągnęła nie budzące zastrzeżeń 3 wnioski, iż europejskie i polskie szczepy wirusa są ze sobą spokrewnione, że wywodzą się ze szczepu Lausanne oraz że krążące w Polsce zarazki wykazują niewielką zmienność genetyczną, co według niej pozwala przypuszczać, iż istniejące na rynku szczepionki będą nadal chroniły króliki przed tą chorobą.

Przystępując do opracowania testu PCR Doktorantka najpierw przebadła 24 fragmenty genów krajowych izolatów wirusa i jedynie we fragmencie genu M071L wszystkich 23 zjadliwych szczepach nie stwierdziła mutacji w porównaniu do szczepu referencyjnego. Sekwencje te posłużyły jej więc do zaprojektowania własnej pary starterów do PCR wykrywającej DNA wirusów myksomatozy. Włączając do powyższych badań także kilka atenuowanych szczepów szczepionkowych potwierdziła doniesienia literaturowe, że do różnicowania zjadliwych izolatów od atenuowanych najlepsze są sekwencje genu M009L, gdyż oparte na nich startery M9c i M9d nie powodowały amplifikacji DNA żadnego ze szczepów szczepionkowych. Oparty na tych wynikach jest inny uprawniony wniosek o możliwości wykrywania tą drogą myksomatozy poszczepiennej.

Kolejnym etapem była optymalizacja reakcji PCR, to znaczy dobór odpowiedniej temperatury przyłączenia, a także stężeń starterów, jonów $MgCl_2$, polimerazy i surowicy bydlęcej. Po wyborze najlepszych parametrów reakcji Doktorantka dobrała optymalną objętość roztworu DNA, a także zawartość enzymu HK-UNG, tak by najlepiej chronił przed zanieczyszczeniem obcym DNA, ale by jednocześnie nie upośledzał wydajności reakcji.

Odrębną częścią optymalizacji PCR było wbudowanie do niej wewnętrznej kontroli amplifikacji. Jej istotą jest wykonywanie, poza właściwą reakcją, jednocześnie PCR dla jakiegoś fragmentu kontrolnego DNA, który zawsze daje produkt niezależnie od obecności lub braku badanego amplikonu. Podnosi to znacznie wiarygodność wyników i jest coraz częściej stosowane w medycynie człowieka, w weterynarii natomiast jeszcze rzadko. Doktorantka wzbogaciła więc swoje startery o kontrolne sekwencje genomu *Salmonella* Enteritidis, a skuteczność tej procedury potwierdziła ich wklonowaniem w wektor plazmidowy, transfekcją do *E. coli*, izolacją z nich plazmidowego DNA i sekwencjonowaniem. Ostatnim etapem wbudowywania wewnętrznej kontroli amplifikacji było dobranie optymalnego stężenia DNA w reakcji PCR.

Wstępna ocena opracowanej metody PCR do wykrywania sekwencji wirusa myksomatozy obejmowała wpływ zanieczyszczeń DNA białkami pochodzącymi z badanych tkanek królików oraz wpływ niedokładności pipetowania i wahań temperatury przyłączenia starterów na wynik reakcji.

Następnie używając standardowych próbek ujemnych i dodatnich o różnej koncentracji wirusa myksomatozy, a także próbek zawierających kwasy nukleinowe 5 innych wirusów chorobotwórczych dla królików i zajęcy oraz kilka kultur bakterii, dermatofitów i pierwotniaków Doktorantka określiła podstawowe

parametry opracowanej metody PCR. Były to swoistość analityczna (czyli wybiórczość wykrywania poszukiwanego DNA), selektywność tego procesu (to znaczy jego efektywność przy działaniu różnych możliwych czynników zakłócających) oraz czułość analityczna (czyli najmniejsza ilość DNA możliwa do wykrycia). Wreszcie na 100% określiła każdy z trzech bardzo istotnych klinicznie parametrów: diagnostyczną czułość i swoistość (czyli odsetek trafnie rozpoznanych próbek spośród prawdziwie dodatnich i prawdziwie ujemnych) oraz dokładność (odsetek wszystkich trafnych wyników). Podobnie 100% okazały się powtarzalność i odtwarzalność metody. Owocem tej części badań jest kolejny wniosek o wysokiej czułości i swoistości opracowanej metody PCR.

Wykorzystując homogenaty tkanek o znanej zawartości wirusa, jak i niebadane dotychczas 23 próbki od królików z ognisk myksomatozy, Doktorantka następnie porównała przydatność opracowanej metody PCR z dość powszechnie używanym w rozpoznawaniu tej choroby testem immunodyfuzji w żelu agarowym wykrywającym antygen zarazka (AGID). Opracowana przez nią metoda PCR okazała się znacznie czulsza, co potwierdziła obliczeniami statystycznymi i umieściła w kolejnym wniosku.

Uwagi krytyczne

Wniosek nr 3 brzmi „Wysoka konserwatywność genu M071L... wskazuje na trafność jego wyboru do diagnostyki myksomatozy...”. Wydaje mi się, że w tym sformułowaniu tkwi błąd logiczny. Dla mnie za trafnością tego wyboru zdecydowanie przemawia nie konserwatywność genu, lecz eksperymenty, które Doktorantka wykonała nad czułością i swoistością opracowanej przez nią metody PCR. Zostało to jednak jasno i poprawnie stwierdzone w następnym wniosku (nr 4), któremu nic nie można zarzucić, poza tym, że w dużym stopniu dubluje go wniosek nr 1, więc proponuję je scalić, a wniosek 3 wyeliminować.

Również wniosek nr 6 „Kontrola wewnętrzna amplifikacji pozwala skutecznie monitorować przebieg analiz ograniczając możliwość uzyskiwania fałszywych wyników” jest dla mnie nieuprawniony, gdyż Doktorantka nie porównywała opracowanego przez siebie PCR z wewnętrzną kontrolą z PCR-em bez tej kontroli, więc nie wykazała, iż wyników fałszywych jest mniej. To przypuszczenie jest zapewne słuszne, ale wypływa z badań innych autorów, zatem jego miejsce jest w dyskusji, a nie we wnioskach z własnych badań.

Wnioski 1 i 2 grzeszą ogólnikowością mówiąc o jakichś bliżej nieokreślonych „metodach molekularnych”, a tych jest bardzo dużo, więc metody powinny być konkretnie nazwane.

Na str. 49 w opisie wzorów do obliczania czułości i swoistości metody diagnostycznej wkradły się błędy. Wartość N- została opisana jako „ogólna liczba ujemnych wyników uzyskanych OCENIANĄ metodą”, a powinno być „ogólna liczba ujemnych wyników uzyskanych REFERENCYJNĄ metodą”, czyli innymi słowy liczba próbek prawdziwie ujemnych. To samo dotyczy wartości N+. Sądzę, że jest to tylko pomyłka redakcyjna, a nie błędne zastosowanie wzoru, co w wynikach tej pracy byłoby zresztą niemożliwe, gdyż opracowana metoda PCR rozpoznawała trafnie 100% próbek prawdziwie dodatnich i prawdziwie ujemnych.

W pracy nie znalazłem informacji jakimi metodami potwierdzano myksomatozę u królików służących do sprawdzania opracowanej przez nią metody PCR. Można się domyślić, że – przynajmniej częściowo – była to izolacja wirusa, bo Doktorantka dysponowała szczepami, ale czy we wszystkich przypadkach tak było?

Pewne niejasności są też w opisie metodyki wyboru i projektowania starterów. Autorka stwierdza na str. 37, że „badaniami łącznie objęto 17 krajowych szczepów wirusa...”. Następnie dodaje, że użyła jeszcze 6 dodatkowych izolatów, a ponadto jeszcze szczepy atenuowane. Więc było ich łącznie 17, czy więcej? W rozdziale „Materiał i metody” Autorka podała, że użyła do badań 3 szczepy szczepionkowe, natomiast w wynikach na str. 64 stwierdza, że były to 4 szczepy.

Doktorantka pisze, że porównując przydatność metody PCR z testem AGID użyła „dwie pule próbek, każda składająca się z 20 próbek”. Z tego określenia nie wynika jasno, czy użyła dwie próbki spulowane, czy też dwie grupy próbek.

Atenuowany szczep wirusa MAV Autorka w analizie filogenetycznej potraktowała jako szczep polski, natomiast a rozdziale „Materiał i metody” napisała, iż pochodził on ze Słowacji.

Nadmiernym i w efekcie chyba błędnym skrótom myślowym jest stwierdzenie, iż „wirus jest wrażliwy na niskie i wysokie pH (4-12)”. Jeśli Autorce chodziło o to, że zarazek jest w stanie przetrzymać pH od 4 do 12, to bym go nazwał opornym na niskie i wysokie pH, gdyż z jednej strony chodzi tu o silny kwas, a z drugiej – o silną zasadę.

Praca zawiera wykaz skrótów, objaśniający także tak powszechnie znane skróty jak np. centymetra, minuty, mililitra, grama, godziny itp. Nie ma w tym oczywiście niczego złego, gdyby nie to, że być może skoncentrowawszy się nadmiernie na powszechnie znanych skrótach Doktorantka zapomniała objaśnić wiele specjalistycznych i zdecydowanie mniej znanych pojęć, jak np. ORF, sekwencje konsensusowe, flankowanie, próbki fortyfikowane.

Miejscami nie udało się Doktorantce oprzeć naporowi żargonu prawno-administracyjnego, stąd zamiast „szczepionka” napisała „preparat leczniczy weterynaryjny immunologiczny przeznaczony do czynnej immunizacji królików przeciwko myksomatozie”. Pisząc o rekombinowanym szczepie szczepionkowym zapomniała wyjaśnić, na czym ta rekombinacja polegała.

W pracy powielany jest też częsty błąd mylący miano wirusa, to znaczy np. 10^{-2} TCID₅₀/ml z koncentracją wirusa, to znaczy 10^2 TCID₅₀/ml.

Podział pracy na rozdziały jest nie do końca konsekwentny. Brakowało mi we wstępie wyjaśnienia, co to jest wewnętrzna kontrola amplifikacji i uzasadnienia, dlaczego Doktorantka postanowiła opracować PCR z tą kontrolą. Pojawia się to dopiero w dyskusji, która powinna być omówieniem własnych wyników, a nie zamierzeń. Z kolei prawie 2 pierwsze strony rozdziału „Dyskusja” ponownie jakby wprowadzają czytelnika w problematykę myksomatozy, dublując w dużym stopniu wstęp. Wreszcie w rozdziale „Wyniki” znajdują się nierzadko elementy ich omówienia, szczególnie w zakresie sekwencji nukleotydowych, mutacji i doboru starterów.

Wreszcie chciałbym przypomnieć słowa wieszczka „...iz Polacy nie gęsi, iz swój język mają” i zachęcić Doktorantkę do używania rdzennie polskich określeń, a nie anglicyzmów, a więc zamiast: „elucja” – wyplukanie, „detekcja” – wykrycie, „sekwencja targetowa” – sekwencja docelowa, „wirulencja” – zjadliwość itp. Jeśli na nowe byty nie ma nazwy w polskim języku, logicznym wydaje się zapożyczenie angielskiego określenia (np. komputer), ale jeśli są ugruntowane polskie określenia nie powinno się ich wypierać anglicyzmami nie – albo nie tylko – ze względów emocjonalno-patriotycznych, lecz czysto pragmatycznych. Polskie określenia zostaną bowiem zrozumiane przez większą rzeszę czytelników, a w końcu pisze się po to, by być zrozumianym. I nie wykluczam, że w niejednym czytelniku „specyficzność” metody, jak to Autorka pisze, może wzbudzić niepewność, czy jest to aby to samo, co on zna jako ugruntowaną w polskim języku „swoistość”, czy też jest to coś innego. Na marginesie, i we mnie powstała niepewność, czym się różni „przemrażanie” albo „wymrażanie” od zwykłego zamrażania.

Podsumowanie

Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego i pracochłonnego zadania analizy filogenetycznej i zbadania pokrewieństwa genetycznego oraz zmienności polskich szczepów myksomatozy, opracowania na tej podstawie starterów do reakcji PCR wykrywającej ten zarazek oraz PCR pozwalającej na odróżnienie naturalnych zachorowań od poszczepiennych i wszechstronnego sprawdzenia przydatności opracowanej metody.

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne odnoszą się do redakcyjnej strony rozprawy, a nie do uzyskanych wyników. Podobnie zastrzeżenia do trzech wniosków dotyczą ich dublowania się bądź umieszczenia pewnych stwierdzeń we wnioskach zamiast w dyskusji, a więc mają także charakter redakcyjny, a nie merytoryczny. Natomiast 6 pozostałych wniosków jest poprawnych, merytorycznie w pełni uprawnionych, i – co więcej – ważnych dla nauki oraz praktyki weterynaryjnej. Dla rozwoju nauki duże znaczenie ma zbadanie przez Doktorantkę pokrewieństwa i pochodzenia krążących w Polsce szczepów wirusa myksomatozy, a dla praktyki – opracowanie czułego narzędzia do wczesnego rozpoznawania tej choroby, a także różnicowania zachorowań naturalnych od poszczepiennych. Praca została poprawnie zaplanowana, właściwie wykonana i imponuje wielością zastosowanych metod biotechnologicznych. Wreszcie jest to jedno z nielicznych znanych mi zastosowań w PCR wewnętrznej kontroli amplifikacji do diagnostyki chorób zwierząt w Polsce.

Biorąc to wszystko pod uwagę stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Ewy Kwit pod tytułem WYKRYWANIE I CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW WIRUSA MYKSOMATOZY KRÓLIKÓW Z ZASTOSOWANIEM METOD MOLEKULARNYCH spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.