

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzi
Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena
rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Iwony Kozyry
p.t. „Molekularna charakterystyka zoonotycznych szczepów rotawirusa świń”

Biegunki w okresie postnatalnym stanowią przyczynę znacznych strat ekonomicznych, zwłaszcza w intensywnej hodowli zwierząt. Wiążą się one głównie z zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej, obniżeniem przyrostów masy ciała oraz padnięciami osesków i zwierząt w okresie odsadzeniowym. Wśród czynników zakaźnych odpowiedzialnych za występowanie biegunek u młodych zwierząt, a także u dzieci istotną rolę odgrywają wirusy należące do rodzaju *Rotavirus*, rodziny *Reoviridae*. Postępowanie w zakażeniach rotawirusowych powinno uwzględniać swoistą profilaktykę, która w przypadku trzody chlewnej realizowana jest poprzez immunizację prosiąt osesków lub szczepienie ciężarnych loch w okresie okołoporodowym. Jednym z problemów związanych z profilaktyką tych zakażeń u zwierząt i ludzi jest występowanie zarasków w postaci wielu serotypów, a także związana z segmentowaną strukturą genomu rotawirusów zmienność genotypowa i fenotypowa. Ponadto, styczność świata zwierząt i ludzi sprzyja tworzeniu hybrydowych cząstek zarasków powstających w efekcie mieszania się w zakażonych komórkach materiału genetycznego różnych gatunków, analogicznie jak ma to miejsce w przypadku grypy. Wytwarzane wówczas zoonotyczne szczepy wirusów cechujące się zdolnością przekraczania bariery międzygatunkowej stanowią ważny problem z punktu widzenia diagnostyki, kliniki i profilaktyki zakażeń rotawirusowych. Uwzględniając te fakty podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących epidemiologii molekularnej zakażeń rotawirusowych świń oraz charakterystyki zoonotycznych szczepów rotawirusów uważam za aktualne i interesujące tak z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia. O wartości tych badań przesądza dodatkowo skąpe piśmiennictwo z tego zakresu, tak światowe jak i krajowe.

Przedstawiona do recenzji praca ma postać opracowanego maszynopisu liczącego 205 stron, w tym obszerną część stanowią załączniki z wartościami podobieństwa sekwencji nukleotydowych szczepów zaraska pochodzących od świń i ludzi. Rozprawa posiada formę i układ tekstu typowe dla prac doktorskich i zawiera standardowo wyodrębnione rozdziały

łącznie ze streszczeniem w języku polskim i angielskim. Część dotycząca metodyki badań poprzedzona jest sprecyzowaniem celu pracy. Celem głównym było określenie częstości występowania zoonotycznych szczepów RVA u świń. Realizacji tego celu służyło zaplanowanie i wykonanie kilku zadań dodatkowych, w tym m.in. ocena występowania zakażeń rotawirusowych w stadach świń w Polsce oraz identyfikacja genotypów G i P. Ta część koncepcji badawczej nie jest w pełni oryginalna, ponieważ analogiczne badania były już wykonywane w warunkach krajowych, chociaż miały miejsce w latach 90-tych ubiegłego wieku. Za słusznością ich realizacji może natomiast przemawiać odniesienie do aktualnej sytuacji epizootycznej zakażeń rotawirusowych u świń, która mogła ulec zmianie. Ponadto, w pracy zaplanowano identyfikację ludzkich szczepów rotawirusów pochodzących z przypadków zakażeń stwierdzanych w regionach kraju, w których wykrywano szczepy zarazka o genotypie wskazującym na potencjał zoonotyczny. Dodatkowo Autorka zaplanowała dokonanie oceny pokrewieństwa filogenetycznego między szczepami RVA świń i człowieka. Pośrednim celem, odnoszącym się do całości kształtu badań, było określenie roli świń jako rezerwuaru szczepów RVA o potencjale zoonotycznym. Te elementy koncepcji badań należy uznać za oryginalne.

Doktorantka użyła do badań ogółem 920 próbek kału od świń zdrowych i chorujących z objawami biegunki, pochodzących ze 131 ferm zlokalizowanych na terenie 107 powiatów, w tym 804 próbki pochodziły od zwierząt zdrowych, a 116 od chorych. Dodatkowo zbadano 166 próbek kału dzieci i dorosłych z potwierdzoną infekcją rotawirusową, pobranych z terenów w których stwierdzano u świń szczepy RVA o potencjale zoonotycznym. Antygen rotawirusowy w próbkach kału wykrywano testem ELISA natomiast identyfikację molekularną genotypów w próbkach dodatnich i wątpliwych przeprowadzano metodą RT-PCR z użyciem starterów komplementarnych do fragmentu 4 i 9 segmentu genomu wirusa, kodujących odpowiednio białka VP4 (genotyp P) i VP7 (genotyp G). Dodatkowo produkty amplifikacji genów kodujących białka VP7, VP4 i NSP4 poddawano sekwencjonowaniu w celu dokonania analizy filogenetycznej. Metodę izolacji wirusów w hodowli komórkowej zastosowano tylko w odniesieniu do szczepów dla których nie określono genotypu G lub P oraz uznawanych za zoonotyczne.

Biorąc pod uwagę zasadniczy cel pracy najistotniejszym elementem badań było określenie wzajemnej zgodności sekwencji nukleotydowej w obrębie genotypów G i P szczepów RVA izolowanych od świń i człowieka oraz ocena pokrewieństwa filogenetycznego między nimi. Na tej podstawie dokonywano identyfikacji szczepów świń potencjalnie zoonotycznych i zoonotycznych. Tę część badań wykonywano przy użyciu

specjalistycznych programów komputerowych. Uzyskiwane wyniki badań poddawano analizie statystycznej.

Doktorantka wykazała obecność antygeny RV w 353 spośród 920 próbek kału świń, tj. średnio w 38% badanych próbek, przy czym częstość występowania dodatnich wyników w teście ELISA była wyraźnie zróżnicowana w poszczególnych grupach wiekowych i była najwyższa (do 58%) w grupie prosiąt ssących w wieku 1-4 tyg.

Odnosząc się do tej części pracy mam wątpliwości, czy na podstawie wykazania wyłącznie obecności antygeny RV w próbkach kału można mówić, że zwierzęta te były zakażone. Tutaj warto przywołać jedną z definicji zakażenia, która mówi m.in. o pobudzeniu mechanizmów obronnych gospodarza, a tego w pracy nie badano. Warto także przypomnieć, że większość próbek kału od świń pochodziła od zwierząt zdrowych. Ponadto, biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych badań dotyczących występowania zakażeń rotawirusowych w krajowych fermach trzody chlewnej (Winiarczyk i wsp. 1993), szkoda, że Doktorantka nie ustaliła zależności pomiędzy liczbą próbek dodatnich w teście ELISA a wielkością pogłowia danego stada. Przypomnę, że wspomniane badania wykazały wyraźną wprost proporcjonalną zależność pomiędzy liczbą wyników dodatnich i liczebnością stada. Uważam, że byłoby interesujące sprawdzenie czy i w jakim stopniu opisane w latach 90-tych zależności uległy zmianie w warunkach współczesnej hodowli świń.

Produkty amplifikacji obydwu genów (VP7 i VP4) uzyskano w przypadku 217 próbek kału na 377 dodatnich i wątpliwych w teście ELISA. W przypadku 77 próbek uzyskano produkt tylko dla jednego genu, natomiast w przypadku 83 próbek nie uzyskano produktów amplifikacji. Analizując interpretację tej części wyników warto zwrócić uwagę na zróżnicowane wyniki reakcji RT-PCR i zapytać dlaczego w wielu przypadkach nie uzyskiwano produktów reakcji? Ponadto, zwraca uwagę zróżnicowanie w liczbie genotypów G i P w poszczególnych województwach. Należy się zastanowić czym można wytłumaczyć ten fenomen w odniesieniu do szczepów świńskich i ludzkich? Wprawdzie Autorka próbuje tłumaczyć to zjawisko w rozdziale „Dyskusja” na str. 93, ale jest ono mało przekonujące.

Metodą sekwencjonowania obydwu genotypy (G i P) zidentyfikowano u 145 szczepów, w przypadku 72 izolatów ustalono tylko genotyp G, a w przypadku 12 szczepów tylko genotyp P. Ogółem w populacji świń w Polsce zidentyfikowano szczepy RVA należące do 8 genotypów (G1-G6, G9, G11). Największa liczba szczepów wykazywała obecność genotypów G5, G4 i G3. Istotną zależność wykazano pomiędzy występowaniem genotypów G u świń i wiekiem zwierząt.

Dokumentacja tej części badań obejmuje m.in. ryc. 11, na której diagramy przedstawiają odsetek określonych genotypów G z uwzględnieniem liczby wykrytych szczepów. Chcę zwrócić uwagę, że dane na tej rycinie pozostają w sprzeczności z opisem zamieszczonym na str. 43, odnoszącym się do odsetka genotypów G5.

W przypadku genotypów P dominowały P6, P13 i P7. Łącznie w krajowej populacji świń potwierdzono obecność 145 szczepów RVA należących do 33 potwierdzonych genotypów GP. W przypadku 84 szczepów udało się określić tylko jeden genotyp (G lub P). Szczepy zoonotyczne należały do genotypów G4P6, G5P6 i G9P6.

Dokonując molekularnej identyfikacji genotypów RVA człowieka uzyskano produkty PCR dla obydwu genów (VP7 i VP4) w przypadku 160 spośród 166 próbek kału. Metodą sekwencjonowania ustalono genotyp G i P dla 144 szczepów wirusa, w przypadku 12 szczepów ustalono tylko genotyp G, a w przypadku 4 tylko genotyp P. W przypadku zoonotycznego szczepu G4P6 określono pełny genotyp. W tej części badań wykazano, że zachorowania u ludzi w Polsce wywołują rotawirusy należące do 6 różnych genotypów G, tj. G1-G4, G8 i G9. Najwięcej szczepów należało do genotypu G1, G4 i G9, a najmniej do G8. Analogicznie jak w przypadku szczepów izolowanych od świń w przypadku szczepów ludzkich także stwierdzono zróżnicowanie odnośnie liczby genotypów G i P wywołujących zachorowania w poszczególnych województwach. W przypadku genotypów P wykazano, że zakażenia u ludzi wywoływały szczepy należące do 4 genotypów, a najbardziej rozpowszechniony był genotyp P8 i P4. Wśród szczepów ludzkich zidentyfikowano 144 szczepy należące do 8 genotypów GP oraz 16 szczepów dla których określono tylko jeden genotyp (G lub P).

W odniesieniu do szczepu zoonotycznego G4P6 potwierdzono terytorialną zależność pomiędzy występowaniem zakażeń u świń i u człowieka. Analiza sekwencji nukleotydowej szczepów o genotypie G1 wykazała wysokie podobieństwo sekwencji w przypadku szczepów izolowanych od świń oraz nieco niższe w przypadku szczepów ludzkich. Niskie wzajemne pokrewieństwo wykazano natomiast w porównawczej analizie sekwencji szczepów G1 pochodzących od świń i człowieka. Odwrotną zależność wykazano w odniesieniu do szczepów o genotypie G2. W przypadku szczepów świń o genotypie G3 wykazano duże zróżnicowanie genetyczne izolatów należących do tego genotypu, natomiast szczepy ludzkie mające ten sam genotyp cechowały się 100% podobieństwem sekwencji i występowały na terenie różnych województw. Nie wykazano także pokrewieństwa pomiędzy krajowymi szczepami G3 izolowanymi od świń i człowieka. Tym niemniej wyniki analizy filogenetycznej wskazują na obecność w krajowej populacji świń szczepów o potencjale

zoonotycznym. Podobne zależności jeśli chodzi o podobieństwo sekwencji wykazano dla szczepów o genotypie G4. W tej grupie wykazano ponadto obecność w krajowej populacji świń szczepów zoonotycznych wywołujących zachorowania u ludzi.

Wzajemne podobieństwo sekwencji pomiędzy szczepami G5 świń było zróżnicowane (81-100%). W tej grupie szczepów wykazano podobieństwo sekwencji do szczepów ludzkich izolowanych na świecie, co wskazuje na ich potencjał zoonotyczny. Podobne zależności wykazano w odniesieniu do szczepów o genotypie G9.

Odnosząc się do oceny pokrewieństwa RVA świń i człowieka na podstawie analizy sekwencji genu kodującego białko VP4 wykazano, że wśród szczepów świńskich o genotypie P6 odnotowano największą zmienność sekwencji nukleotydowej badanego fragmentu genu z wahaniami podobieństwa od 79-100%. W tej grupie wykazano jednak także wysokie podobieństwo do szczepów P6 izolowanych od ludzi, co świadczy o ich potencjale zoonotycznym lub charakterze zoonotycznym.

Szczepy o genotypie P8 były częściej identyfikowane u ludzi niż u świń. Wzajemne podobieństwo sekwencji szczepów ludzkich przekraczało 92%. Podobne podobieństwo wykazywały szczepy o genotypie P8 izolowane od świń i człowieka. Analiza drzewa filogenetycznego tych szczepów potwierdza zoonotyczny potencjał wirusów izolowanych od świń. Badania molekularne pozostałych segmentów szczepów zoonotycznych G4P6, kodujących białka strukturalne i niestrukturalne wykazały, że należą one do tych samych genotypów z wyjątkiem segmentu 1, kodującego białko niestrukturalne NSP1.

Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła 8 wniosków. Analiza ich treści zmusza recenzenta do bardziej krytycznej oceny tej części pracy w porównaniu do pozostałych rozdziałów. Wnioski 1 i 2 wynikają wprawdzie z przeprowadzonych badań, ale w zasadzie stanowią potwierdzenie wyników wcześniejszych badań dotyczących występowania zakażeń rotawirusowych w krajowych fermach trzody chlewnej. Wniosek 3 stanowi inną formę przedstawienia wyników badań własnych. Wniosek 4 także odnosi się do wyników badań, przy czym część interpretacyjna wniosku nie jest do końca przekonująca, o czym jest mowa także na str. 3 niniejszej oceny. Podobne zastrzeżenia odnoszą się do wniosków 5, 6 i 7. Wniosek 8 sformułowany jest właściwie i wypływa z przeprowadzonych badań oraz analizy uzyskanych wyników. Podsumowując ten fragment recenzji uważam, że Doktorantka przyjęła niesłuszne założenie, aby każdą część badań „uhonorować” odrębnym wnioskiem. Myślę, że nie ma takiej potrzeby, natomiast ograniczenie się do najważniejszych uogólnień, formułowanych w oparciu o dogłębną analizę uzyskanych wyników badań, z reguły jest korzystne dla recenzowanej rozprawy i jej potencjalnych czytelników.

Z obowiązku recenzenta zwracam także uwagę na stronę redakcyjną pracy, do której nie mam większych zastrzeżeń. Wyjątek to określenie „upadki” w odniesieniu do padnięć zwierząt na str. 8. Ponadto, w treści rozdziału 4.6.3. na str. 54 Autorka pisze, że szczepy o genotypie G1P8 odpowiedzialne były za 46% zachorowań. Z analizy ryc. 25 wynika, że wartość liczbowa 46 odnosi się do liczby szczepów o określonym genotypie, a nie odsetka zachorowań.

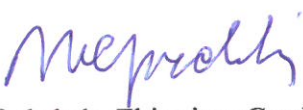
Podsumowując, uważam że recenzowana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Zawiera precyzyjnie określone cele badawcze, realizowane konsekwentnie poprzez wykonanie serii pracochłonnych eksperymentów angażujących nowoczesny warsztat metodyczny z zakresu wirusologii klasycznej i molekularnej. Do oryginalnych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć dokonanie oceny rozpowszechnienia zoonotycznych szczepów rotawirusów w krajowej populacji świń, charakterystykę genotypową szczepów RVA izolowanych od ludzi oraz ocenę pokrewieństwa filogenetycznego szczepów zwierzęcych i ludzkich, wskazujące na znaczenie świń jako rezerwuaru szczepów rotawirusów o potencjale zoonotycznym.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani lek. wet. Iwony Kozyry p.t. “Molekularna charakterystyka zoonotycznych szczepów rotawirusa świń” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Iwony Kozyry do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę aktualność problematyki badawczej ujętej w recenzowanej rozprawie doktorskiej, spójność koncepcyjną oraz rzetelność realizacji badań wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Lublin, 24 sierpnia 2017 r.


Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki