

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego

w Lublinie

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Ewy Kwit

**p.t. “Wykrywanie i charakterystyka szczepów wirusa myksomatozy królików
z zastosowaniem metod molekularnych”**

Myksomatoza jest zakaźną i zaraźliwą chorobą królików o interesującej historii w kontekście jej występowania w formie masowych zachorowań w różnych regionach świata. Co ciekawe, stanowi ona jeden z najwcześniejszych przykładów wykorzystywania czynnika etiologicznego jakim jest wirus w charakterze broni biologicznej, ale skierowanej nie przeciwko człowiekowi tylko przeciwko zwierzętom tego samego gatunku.

Z uwagi na znaczenie epidemiologiczne, kliniczne i ekonomiczne choroba przypisana jest aktualnie do listy Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (dawniej OIE), a w świetle ustawodawstwa krajowego podlega obowiązkowi rejestracji. Szczyt zachorowań na myksomatozę w Polsce przypadał na lata 80-te i 90-te ubiegłego wieku. Obecnie choroba notowana jest sporadycznie, głównie z uwagi na wprowadzenie szczepień profilaktycznych, które ograniczają populację zwierząt podatnych na zakażenie. Myksomatoza cechuje się zróżnicowanym przebiegiem klinicznym w zależności od gatunku królików. W Europie i Australii stwierdzane były najczęściej przypadki o przebiegu ostrym, cechujące się wysokim współczynnikiem śmiertelności.

Wirus myksomatozy wykazuje interesujące właściwości z punktu widzenia możliwości terapii innych chorób. Wykazano m.in., że efektywnie zakaża on komórki nowotworowe, namnaża się w nich, a następnie niszczy. Stąd perspektywa wykorzystywania wirusa w terapii przeciwnowotworowej. Ponadto, poprzez oddziaływanie na komórki zakażone wirus prowadzi do uwalniania substancji immunoregulatorowych, które hamują procesy zapalne towarzyszące chorobom z autoagresji. Stąd także możliwość wykorzystania tego wirusa w terapii przeciwzapalnej. Warto dodać, że wirus nie jest patogenny dla człowieka. Niezależnie jednak od wymienionych pozytywnych właściwości zarazka warto pamiętać, że działa on silnie immunosupresyjnie, co stanowi istotny problem z punktu widzenia klinicznego przebiegu zakażenia u królików.

Ciągłe utrzymywanie się wirusa myksomatozy w populacji królików oraz związane z tym występowanie zakażeń jawnych i atypowych wymagają podejmowania działań mających na celu szybkie rozpoznanie choroby oraz ograniczenie rozprzestrzeniania się wirusa w obrębie stada. Diagnostyka laboratoryjna myksomatozy opiera się głównie na metodach z obszaru klasycznej wirusologii. Konwencjonalne metody wirusologiczne, takie jak izolacja wirusa w

hodowli komórkowej, odczyn IF pośredniej, AGID i próba biologiczna są pracochłonne i czasochłonne oraz cechują się niską czułością. Niewielkie znaczenie w diagnostyce myksomatozy mają także testy serologiczne z uwagi na powszechne aktualnie stosowanie szczepień profilaktycznych. Wyjściem naprzeciw może być natomiast zastosowanie w diagnostyce tych zakażeń metod biologii molekularnej, w tym reakcji PCR, na co zwraca się m.in. uwagę w podręczniku diagnostycznym firmowanym przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt. Wykorzystywanie swoistych i wysoko czułych metod molekularnych wskazane jest zwłaszcza wtedy, gdy pojawiają się atypowe postaci choroby, w przebiegu których objawy kliniczne są mało charakterystyczne. Dzięki zastosowaniu reakcji PCR do wykrywania materiału genetycznego wirusa myksomatozy uzyskuje się wiarygodny wynik badania, a ponadto w przypadku konieczności odróżnienia terenowych, zjadliwych szczepów wirusa od atenuowanych, stosowanych w produkcji szczepionek, można odstąpić od wykorzystywania zwierząt doświadczalnych do badań diagnostycznych. Ten aspekt dobrze wpisuje się w aktualne tendencje i priorytety diagnostyki laboratoryjnej chorób zwierząt pozostając jednocześnie zgodnym z rekomendacjami Komisji Etycznych ds. Badań na Zwierzętach. Nie bez znaczenia jest także możliwość wykorzystania metod molekularnych w przyżyciowej diagnostyce choroby, co ma istotne znaczenie w przypadku zakażeń wywoływanych przez szczepy o niskiej zjadliwości lub w atypowych postaciach choroby.

W przedstawionym kontekście podjęcie przez Doktorantkę badań nad wykrywaniem wirusa myksomatozy królików z zastosowaniem metod molekularnych należy uznać za pomysł wartościowy i interesujący tak z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia zwłaszcza, że zakażenia tym zarazkiem mimo sporadyczności występowania nadal stanowią problem dla hodowców królików oraz są niebezpieczne dla dziko żyjących zwierząt tego gatunku.

Recenzowana praca ma układ typowy dla prac doktorskich. Zawiera 114 stron tekstu w formie jednostronnego wydruku komputerowego, podzielonego na 9 głównych rozdziałów, w obrębie których wyodrębniono dodatkowe podrozdziały. Pracę poprzedza wykaz użytych w tekście skrótów. Stanowi on ważny element z uwagi na fakt częstego pojawiania się w opracowaniach naukowych określeń zapożyczonych z terminologii anglojęzycznej, od których najczęściej tworzone są skroty. Ich transformacja do terminologii polskojęzycznej ułatwia czytanie i analizę tekstu. Rozprawa opatrzona jest także streszczeniem przedstawionym w języku polskim i angielskim, zawierającym syntetyczny opis wykonanych badań i uzyskanych wyników.

Praca dotyczy wykorzystania jednego z licznych wariantów reakcji PCR, tzw. IAC PCR do wykrywania materiału genetycznego wirusa myksomatozy królików oraz do różnicowania zjadliwych szczepów zarazka z atenuowanymi, wykorzystywanymi do produkcji szczepionek przeciwko tej chorobie. Od lat 80-tych ubiegłego wieku, kiedy reakcja PCR została po raz pierwszy opisana przez Mullisa i wsp. i Saiki i wsp. stanowi ona multipotencjalne narzędzie diagnostyczne i badawcze wykorzystywane w wielu dziedzinach wiedzy, w tym w weterynarii i medycynie. Pomimo niedoskonałości dotyczących powtarzalności i odtwarzalności metody, związanych m.in. z technicznymi możliwościami termocyklerów, aktywnością różnych polimeraz DNA oraz obecnością w środowisku reakcyjnym inhibitorów reakcji enzymatycznych PCR nadal jest szeroko wykorzystywana w diagnostyce chorób zakaźnych i w badaniach epidemiologicznych.

IAC PCR stanowi nową strategię reakcji PCR, umożliwiającą niezależną amplifikację w tej samej mieszaninie reakcyjnej sekwencji docelowej (target) i kontroli wewnętrznej (IAC)

przy wykorzystaniu tego samego zestawu starterów. Zastosowana w tej odmianie PCR wewnętrzna kontrola amplifikacji (IAC) jest niezależną od matrycy DNA sekwencją, umieszczoną w tej samej próbce co badana próbka, ulegającą w przebiegu reakcji równoczesnej amplifikacji z sekwencją docelową (target). Podstawową zaletą tej metody jest zwiększenie czułości testu PCR. Jednocześnie zapobiega ona pojawianiu się wyników fałszywie ujemnych, związanych z obecnością inhibitorów reakcji PCR. Warto podkreślić, że idea wykorzystywania tej odmiany reakcji PCR znalazła odzwierciedlenie w uregulowaniach formalno-prawnych odnoszących się do diagnostyki laboratoryjnej. Europejski Komitet Standaryzacyjny w porozumieniu z Międzynarodową Organizacją ds. Standardów Laboratoryjnych zaproponowali opracowanie przewodnika do diagnostyki drobnoustrojów metodą PCR z wykorzystaniem wewnętrznej kontroli amplifikacji.

Z technicznego punktu widzenia wyróżnia się dwie główne strategie konstrukcji IAC. Różnica pomiędzy nimi dotyczy sposobu amplifikacji kontroli wewnętrznej w odniesieniu do sekwencji docelowej (target), który może być konkurencyjny lub niekonkurencyjny. W przypadku strategii konkurencyjnej obydwie sekwencje, tj. target i IAC ulegają amplifikacji z udziałem tych samych, wspólnych starterów w analogicznych warunkach reakcyjnych. W przypadku tej strategii ilość IAC w mieszaninie reakcyjnej ma istotne znaczenie dla prognozy wykrywania sekwencji docelowej, ponieważ dochodzi do konkurencji pomiędzy tą sekwencją i IAC w reakcji amplifikacji. W układzie niekonkurencyjnym obydwie sekwencje, tj. target i IAC ulegają amplifikacji z udziałem oddzielnych par starterów. Mankamentem tej strategii jest obniżenie wydajności jednej lub obydwu reakcji PCR, co wiąże się z trudnościami w optymalizacji warunków przebiegu reakcji, które muszą być dla nich wspólne.

W większości przypadków praktycznych zastosowań tej odmiany reakcji PCR konstrukcja IAC oparta jest na strategii konkurencyjnej. Dzięki temu unika się ryzyka wystąpienia niepożądanych interakcji pomiędzy różnymi parami starterów, a amplifikacja sekwencji docelowej i IAC zachodzą z udziałem tego samego zestawu starterów i w identycznych warunkach reakcji. Taki też wariant wybrała Doktorantka w swoich badaniach. Jednakże, pomimo wspomnianych zalet tej strategii zawsze istnieje ryzyko współzawodnictwa pomiędzy sekwencją docelową i IAC. Przykładowo, wysokie stężenie IAC w mieszaninie reakcyjnej może na zasadzie współzawodnictwa hamować amplifikację sekwencji docelowej i w ten sposób generować wyniki fałszywie ujemne, zwłaszcza w przypadkach gdy koncentracja sekwencji docelowej jest niska. Wychodząc naprzeciw tym zagrożeniom Doktorantka uwzględniła w swoich badaniach cały wachlarz dodatkowych metod mających na celu standaryzację i optymalizację reakcji IAC PCR.

W praktyce laboratoryjnej w konstrukcji DNA IAC wykorzystuje się najczęściej system klonowania w wektorze plazmidowym, którego zaletą jest wygodne i łatwe przechowywanie konstruktów po transfekcji rekombinowanych plazmidów do komórek bakteryjnych. System taki zapewnia ciągłą dostępność sekwencji IAC do badań laboratoryjnych oraz nie zmienioną jakość konstruktów, co ma istotne znaczenie dla powtarzalności wyników reakcji PCR.

Do badań Doktorantka wykorzystowała 54 szczepy wirusa myksomatozy wyizolowane w latach 1983-2013 od królików z przypadków chorobowych stwierdzanych w różnych regionach geograficznych Polski. W celach porównawczych wykorzystywano szczep referencyjny ATCC VR-115. W konstruowaniu starterów reakcji PCR uwzględniono fragmenty aż 24 różnych genów. Odnosząc się do oceny tej części pracy chcę zwrócić uwagę na dokładność i precyzję,

jaką można dostrzec w opisach metodyki badań w odniesieniu do reakcji PCR. Należy także podkreślić dbałość Autorki o poprawność wykonywania poszczególnych etapów reakcji PCR poprzez wprowadzenie czterech różnych kategorii kontroli, w tym dwóch kontroli izolacji DNA, dodatniej i ujemnej, kontroli mieszaniny reakcyjnej i kontroli środowiska.

W badaniach wstępnych dokonano optymalizacji składu mieszanin reakcyjnych i warunków prowadzenia reakcji PCR, dzięki czemu w trakcie właściwych badań wykorzystywano wariant najbardziej optymalny, umożliwiający uzyskiwanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników.

Z punktu widzenia metodyki zaplanowanych badań najważniejszym etapem fazy przygotowawczej było stworzenie konstruktów IAC stanowiących kontrolę wewnętrzną reakcji amplifikacji. Niewątpliwie ten etap należał do najbardziej pracochłonnych w realizowanej rozprawie doktorskiej, a w trakcie jego realizacji Doktorantka wykorzystywała większość spośród klasycznych technik biologii molekularnej, takich jak klonowanie, a w nim ligację, transfekcję komórek kompetentnych, izolację plazmidowego DNA i inne. Dzięki zastosowaniu starterów o podwójnej komplementarności, tj. do sekwencji DNA wirusa myksomatozy i *Salmonella enteritidis* w reakcji PCR z użyciem tych starterów uzyskiwano produkty IAC będące fragmentami DNA bakteryjnego *S. enteritidis*, zawierającymi odcinki komplementarne do sekwencji starterów właściwych dla wirusa myksomatozy.

Ważnym etapem badań była walidacja opracowanych metod IAC PCR poprzez określenie czułości, specyficzności, powtarzalności i odtwarzalności. Opracowany przez Doktorantkę test IAC PCR spełnił wszystkie oczekiwane kryteria odnośnie specyficzności i czułości diagnostycznej i umożliwiał wykrywanie wirusa na poziomie 10 TCID₅₀/ml zawiesiny. Procedury walidacyjne potwierdziły także skuteczność metody w wykrywaniu wirusa w próbkach świeżego materiału klinicznego i w próbkach archiwalnych. Analiza wyników badania próbek zawierających zjadliwe i atenuowane szczepy wirusa myksomatozy przy użyciu diagnostycznego i różnicującego testu IAC PCR w pełni potwierdziła przydatność opracowanych metod do wykrywania i różnicowania wirusa myksomatozy w materiale biologicznym. Uzyskane wyniki badań są zatem w pełni zgodne z przyjętymi celami pracy. Warto także podkreślić, że opracowane metody IAC PCR cechowały się znacznie wyższą czułością i specyficznością diagnostyczną w porównaniu do testu AGID. Świadczą o tym uzyskane wartości DSe, tj. czułość diagnostyczna i DSp, specyficzność diagnostyczna dla obydwu metod, które dodatkowo poddane zostały analizie statystycznej. Ta część wyników jednoznacznie wskazuje, że test AGID jest w stanie wykrywać wirusa myksomatozy w badanych próbkach z mniejszym prawdopodobieństwem w porównaniu do metod IAC PCR.

Na podstawie wyników analizy filogenetycznej szczepów wirusa myksomatozy izolowanych z krajowej populacji królików Doktorantka stwierdza, że cechują się one wysokim podobieństwem sekwencji nukleotydowej, sięgającym 99% (fragment genu M036L). Wyjątek stanowił szczep oznaczony symbolem 1/06 wykazujący tylko 91% podobieństwo. Na uwagę zasługuje także fakt wysokiego podobieństwa (95%) szczepów krajowych do szczepów zagranicznych. Pomimo wykazanego podobieństwa genetycznego szczepów izolowanych w różnych regionach świata przeprowadzona analiza filogenetyczna wskazuje na możliwość wyodrębnienia oddzielnych kładów dla wirusów europejskich, brazylijskich i australijskich.

W porównawczych badaniach sekwencji nukleotydowych fragmentów 24 wybranych genów krajowych szczepów wirusa myksomatozy Autorka wykazała metodą sekwencjonowania obecność licznych mutacji punktowych skutkujących zmianą sekwencji aminokwasowych w produktach białkowych kodowanych przez te geny. Typy mutacji obejmowały substytucję, insercję i delecję. Jednocześnie wykazano jednak, że w jednym z genów nie stwierdza się mutacji u wszystkich spośród analizowanych zjadliwych szczepów wirusa. Co więcej, taka sama prawidłowość dotyczyła także szczepów atenuowanych. Na tej podstawie Doktorantka dokonała słusznego wyboru tego konserwatywnego genu do zaprojektowania starterów „diagnostycznej” reakcji IAC PCR, pozwalającej na wykrywanie DNA wirusa myksomatozy tak w odniesieniu do szczepów terenowych jak i szczepionkowych. Posługując się przeciwstawną logiką Doktorantka wykorzystwała zmienne fragmenty istniejące w obrębie badanych genów do zaprojektowania starterów „różnicującej” reakcji IAC PCR, umożliwiającej różnicowanie szczepów terenowych i atenuowanych, szczepionkowych. Opracowanie takiej metody ma istotne znaczenie w kontekście prowadzenia swoistej profilaktyki myksomatozy z użyciem szczepionek.

Rozdział „Dyskusja” Doktorantka podzieliła na liczne podrozdziały. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę, że treść niektórych podrozdziałów posiada jedynie luźny związek z prowadzonymi badaniami własnymi, natomiast bardziej odnoszą się one treścią do ogólnych aspektów stosowania technik molekularnych w diagnostyce chorób zakaźnych, w tym, myksomatozy. Przykładem może być podrozdział na stronie 81 oraz znaczna część podrozdziału ze strony 82. Ponadto, Doktorantka wielokrotnie odwołuje się do wyników badań innych autorów, którzy także podejmowali próbę opracowania testów molekularnych do diagnostyki i różnicowania zakażeń wywoływanych przez szczepy zjadliwe i atenuowane. W tym celu opracowano m.in. takie warianty metody PCR jak multiplex PCR oraz PCR-RFLP. Uwagę recenzenta zwraca natomiast brak w cytowanym piśmiennictwie publikacji prezentujących wyniki podobnych badań przy wykorzystaniu analogicznej metody IAC PCR.

Dysertacja zakończona jest 9 wnioskami. W większości są one prawidłowo sformułowane i wypływają z przeprowadzonych badań. Drobne zastrzeżenia można mieć do wniosku nr 4 i 5, które stanowią raczej powtórzenie uzyskanych wyników badań.

Uwagi redakcyjne i pozostałe uwagi do tekstu:

Chcę podkreślić, że praca napisana jest starannie i takich uwag jest niewiele, a ponadto nie wpływają one na ogólną, pozytywną ocenę dysertacji. Mam nadzieję, że będą one natomiast pomocne Doktorantce w przygotowywaniu ostatecznych wersji tekstu do opublikowania zważywszy, że praca ma aktualnie formę wydruku komputerowego.

Na str.10 (Wstęp) Autorka pisze, że myksomatoza została po raz pierwszy „rozpoznana” w Urugwaju w 1896 r. Mam wątpliwości czy faktycznie chodziło o rozpoznanie choroby, czy o stwierdzenie przypadku z typowymi objawami klinicznymi zważywszy, że nie określono wówczas czynnika etiologicznego oraz nie potwierdzono identity objawów klinicznych ze stwierdzanymi wcześniej u innych zwierząt tego samego gatunku lub innych gatunków.

Także na str.10 pojawia się określenie „masowe upadki”, które winno być zastąpione słowem „padnięcia”. Ta sama nieścisłość pojawia się także w dalszych częściach tekstu.

W wykazie skrótów poszczególne skróty tłumaczone są od razu na język polski, co nie oddaje w pełni ich istoty. Są natomiast wyjątki, np. „MEM” i „TIR” – na str. 13

Także na str.10 pojawia się określenie „masowe upadki”, które winno być zastąpione słowem „padnięcia”. Ta sama nieścisłość pojawia się także w dalszych częściach tekstu.

W wykazie skrótów poszczególne skróty tłumaczone są od razu na język polski, co nie oddaje w pełni ich istoty. Są natomiast wyjątki, np. „MEM” i „TIR” – na str. 13

Zakładając, że głównym celem pracy było opracowanie i walidacja jednego z licznych wariantów metody PCR, tj. IAC PCR, co też Autorce się w pełni udało, zdaniem recenzenta należało we wstępie dysertacji poświęcić trochę uwagi na przedstawienie istoty tej metody, a tego niestety w pracy zabrakło.

Wielkość sekwencji DNA wyrażana jest w pracy w „kb”. Proponuję zachowanie terminologii polskiej, tj. „kpb”. Ponadto, oznaczenia „kb” i „pb” pojawiają się w pracy naprzemiennie. Należy je ujednoczyć korzystając z wersji polskojęzycznej.

Na str.14 Autorka pisze, „genom koduje 171 genów”. Powinno być raczej „genom zawiera 171 genów”. Kodowanie przez geny odnosi się do białek.

Na str.19 sformułowanie „zmiany kliniczne” proponuję zastąpić wyrażeniem „objawy kliniczne”

Niekiedy pojawia się niezręczność stylistyczna w tytułach rozdziałów – np. 3.10 do wykrywania i różnicowania szczepów zjadliwych „od” atenuowanych (raczej winno być „z” atenuowanymi). Uwaga ta dotyczy także innych fragmentów tekstu.

Różnicowanie szczepów zjadliwych „od” atenuowanych - analogicznie, drobny dysonans stylistyczny.

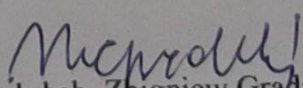
Swoista immunoprofilaktyka – winno być „swoista profilaktyka” lub „immunoprofilaktyka”

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani lek. wet. Ewy Kwit p.t. “Wykrywanie i charakterystyka szczepów wirusa myksomatozy królików z zastosowaniem metod molekularnych” 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. Ewy Kwit do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

Lublin, 24 kwietnia 2017 r.


Prof. dr hab. Zbigniew Grądziński