

Dr hab. Kazimierz Tarasiuk prof. UR

Kraków, 6.11.2017 r.

Uniwersyteckie Centrum

Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

Al. Mickiewicza 24/28

30-059 Kraków

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Frączyk pt. "Opracowanie alternatywnych metod diagnostyki afrykańskiego pomoru świń oraz charakterystyka molekularna izolatów wirusa w populacji dzików i świń"**

Promotorem pracy jest dr hab. Grzegorz Woźniakowski prof. nadzw., a promotorem pomocniczym dr Artur Jabłoński z Zakładu Chorób Świń PIWet-PIB w Puławach.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. wet. Magdaleny Frączyk jest cyklem czterech publikacji (jedna przeglądowa i trzy oryginalne).

**I. Praca przeglądowa**

1. Woźniakowski G., **Frączyk M.**, Niemczuk K., Pejsak Z.: Selected aspects related to epidemiology, pathogenesis, immunity and control of African swine fever. *Journal of Veterinary Research* 2016, 60, 119-125.

**II. Prace oryginalne**

1. **Frączyk M.**, Woźniakowski G., Kowalczyk A., Niemczuk K., Pejsak Z.: Development of cross-priming amplification for direct detection of the African Swine Fever Virus in pig and wild boar blood and sera samples. *Letters in Applied Microbiology* 2016, 62, 386-391.
2. **Frączyk M.**, Woźniakowski G., Kowalczyk A., Bocian Ł., Kozak E., Niemczuk K., Pejsak Z.: Evolution of African Swine Fever Virus genes related to evasion of host immune response. *Veterinary Microbiology* 2016, 193, 133-164.
3. Woźniakowski G., **Frączyk M.**, Kowalczyk A., Pomorska-Mól M., Niemczuk K., Pejsak Z.: Polymerase cross-linking spiral reaction (PCLSR) for detection of African Swine Fever Virus (ASFV) in pigs and wild boars. *Scientific Reports* 2017, 7, 1-10.

W opracowaniu przeglądowym przedstawiono dane na temat epidemiologii, patogenezy, diagnostyki i zwalczania afrykańskiego pomoru świń (ang. African Swine Fever – ASF). Publikacje oryginalne (II.1 i II.3) poświęcone są opracowaniu alternatywnych i innowacyjnych metod diagnostyki ASF. W pracy (II.2) przedstawiono charakterystykę molekularną izolatów wirusa ASF, krążących na terenie Polski. W publikacjach oryginalnych zawarty jest cel i zakres badań, szczegółowy opis materiałów i metodyk oraz uzyskanych wyników wraz z wyczerpującą dyskusją nt. uzyskanych danych.

Wszystkie prace, opublikowano w latach 2016-2017 w **recenzowanych** czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w tym jeden artykuł przeglądowy w *Journal of Veterinary Research* (pkt 15; IF 0,46), pozostałe trzy publikacje oryginalne ukazały się w *Letters in Applied Microbiology* (pkt 20; IF 1,57), *Scientific Reports* (pkt 40; IF 5,52) oraz w *Veterinary Microbiology* (pkt 35; IF 2,56). Łącznie powyższe publikacje uzyskały 110 pkt wg MNiSW oraz Impact Factor wynoszący 10,1.

Wszystkie artykuły są wieloautorskie, a przedłożone do recenzji dokumenty zawierają oświadczenia współautorów opisujące ich wkład do tych czterech publikacji. W dwóch pracach oryginalnych Doktorantka jest pierwszym autorem (przy niealfabetycznej kolejności autorów). W publikacji przeglądowej oraz jednej pracy oryginalnej lek. wet. Magdalena Frączyk jest drugim autorem. Doktorantka oświadczyła, że w pracy przeglądowej jej udział wynosił 55%. Polegał na zebraniu piśmiennictwa, współuczestnictwie w pisaniu manuskryptu oraz korekcie pracy po recenzji. W pracach eksperymentalnych wkład Doktorantki polegał na współplanowaniu doświadczeń, wykonaniu analiz laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych wyników badań, napisaniu manuskryptów i ich korekcie po recenzji. Zadeklarowany udział procentowy (55% - przy pracy przeglądowej i odpowiednio 65%, 60% i 55% przy pracach oryginalnych) wskazuje na wiodącą rolę Doktorantki, jeśli uwzględnić udział w pracy zespołów liczących od 5 do 7 osób.

Przedłożone oświadczenia współautorów są zgodne z deklaracją Doktorantki o Jej udziale w pracach, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Wkład współautorów polegał głównie na udziale w wykonaniu wyspecjalizowanych obliczeń teoretycznych, udziale w dyskusjach nad interpretacją wyników oraz korekcie redakcyjnej tekstów przed wysłaniem do druku. Dr. hab. Grzegorz Woźniakowski prof. nadzw. – promotor pracy - współautor wszystkich publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, jako kierownik zespołu współuczestniczył w planowaniu poszczególnych doświadczeń, sprawował nadzór nad przeprowadzeniem badań w laboratorium, a następnie brał udział w interpretacji uzyskanych wyników badań i ich opracowaniu przy przygotowywaniu manuskryptów.

We wstępie pracy, która znacznie wykracza poza obszar artykułu przeglądowego, wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej Autorka bardzo szczegółowo przedstawia wybrane aspekty z zakresu epidemiologii, patogenezy, immunologii, możliwości diagnostyki oraz zwalczania afrykańskiego pomoru świń. Autorka wykazała się dobrą znajomością



piśmiennictwa z tego zakresu. Warto podkreślić, że we wstępie pracy wykorzystano najnowsze dane literaturowe.

Celem badań podjętych w ramach rozprawy doktorskiej, przedstawionej w spójnym cyklu publikacji naukowych było:

1. Opracowanie i zastosowanie alternatywnych technik biologii molekularnej do wykrywania materiału genetycznego wirusa ASF, przeprowadzone z wykorzystaniem próbek pobranych od dzików i świń pochodzących od potwierdzonych, referencyjnymi metodami, przypadków i ognisk choroby w Polsce:
  - a. Metoda amplifikacji krzyżowej (ang. Cross-priming amplification - CPA) jako prosty test służący do szybkiego wykrywania DNA wirusa ASF (praca II.1).
  - b. Metoda amplifikacji spiralno-krzyżowej (ang. Polymerase cross-linking spiral reaction – PCLSR) jako kolejna metoda biologii molekularnej, przeprowadzana w warunkach stałej temperatury, opracowana po raz pierwszy na świecie w Krajowym Laboratorium Referencyjnym ds. ASF PIWet-PIB (praca II.3).
2. Badanie właściwości molekularnych polskich izolatów ASF z wykorzystaniem par specyficznych starterów – komplementarnych do następujących genów: MGF505 – 2R, EP153R, A238L i EP402R. Uzyskane fragmenty amplifikacji poddano analizie sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej w celu określenia zróżnicowania genetycznego rodzimych szczepów ASF pomiędzy sobą, a także pomiędzy tymi, izolowanymi w innych krajach, zamieszczonymi w bazie danych GenBank (praca II.2).

Szczegółowy opis materiałów i metod zastosowanych do przeprowadzenia badań Doktorantka zawarła w publikacjach oryginalnych, składających się na niniejszą rozprawę doktorską. W badaniach dotyczących opracowania i zastosowania alternatywnych metod biologii molekularnej do diagnostyki ASF użyto 75 próbek pochodzących z przypadków ASF u dzików oraz 3 próbek pobranych od świń domowych. Obecność wirusa ASF w badanym materiale potwierdzono w Krajowym Laboratorium Referencyjnym – KLR ds. ASF w PIWet-PIB w Puławach. Do badań użyto także materiał genetyczny innych patogenów występujących u trzody chlewnej takich jak wirus klasycznego pomoru świń, wirus PRRS oraz wirus PED. Podczas opracowywania metody amplifikacji spiralno-krzyżowej wykorzystano ponadto kolekcję referencyjnych szczepów, reprezentujących poszczególne genotypy (I, II, V, VIII, IX, X) wirusa ASF. Skuteczność metody badano dodatkowo na próbkach zawierających DNA wirusa ASF występującego w Estonii. Kontrolę dodatnią stanowił skonstruowany plazmid z

wprowadzonym produktem amplifikacji fragmentu genu P72 dla szczepu Ba71V, pochodzącego z Europejskiego Laboratorium Referencyjnego w Hiszpanii. Jako kontrolę ujemną wykorzystano tkanki i materiał genetyczny od świń wolnych od zakażenia wirusem ASF.

W pracy II.1 została opisana technika amplifikacji krzyżowej kwasów nukleinowych w warunkach stałej temperatury (CPA). Próbkę krwi i surowicy pochodzące od 10 zakażonych wirusem ASF świń oraz 76 dzików wykorzystano w celu sprawdzenia skuteczności metody CPA. Optymalizacja warunków, w jakich zastosowano metodę CPA pozwoliła na uzyskanie wyników już po 45 minutach w temp. 56,2°C. Czulość diagnostyczna CPA wynosiła 7,2 kopii i była porównywalna z wartością czulości diagnostycznej uzyskanej przy użyciu RT-PCR. Przy użyciu tej metody potwierdzono obecność DNA wirusa ASF we wszystkich badanych próbkach. Nie zaobserwowano reakcji fałszywie dodatnich. Należy podkreślić, że metoda CPA służąca do identyfikacji ASFV została opracowana i opisana po raz pierwszy w KLR ds. ASF w PIWet-PIB w Puławach.

W pracy II.3 przedstawiono warunki łańcuchowej reakcji spiralno-krzyżowej (PCLSR) i wykazano, że amplifikacja była możliwa w szerokim zakresie temperatur od 55°C do 66°C w czasie od 45 do 90 minut. Metoda ta charakteryzuje się wysoką specyficznością i pozwoliła na wykrycie obecności DNA wirusa ASF we wszystkich próbkach pobranych od zakażonych świń i dzików. Technikę PCLSR zastosowano do przebadania łącznie 20 próbek pochodzących od zakażonych ASFV świń (3 próbki) oraz od zakażonych dzików (17 próbek). Otrzymane wyniki były w 100% zgodne z rezultatami uzyskanymi konwencjonalną metodą PCR oraz w systemie RT-PCR. Zdolność techniki PCLSR do wykrywania szczepów wirusa ASF innych, niż te należące do genotypu I sprawdzono również w odniesieniu do szczepów tego wirusa reprezentujących genotypy: I, II, V, VIII, IX i X. Do sprawdzenia potencjalnej krzyżowej reaktywności starterów użyto również materiału genetycznego wirusa epidemicznej biegunki świń. PCLSR jest najnowszą modyfikacją dotychczas używanych metod badawczych, w warunkach stałej temperatury, zastosowaną po raz pierwszy na świecie, jako innowacyjna technika diagnostyczna w KLR ds. ASF w PIWet-PIB w Puławach.

Praca II.2 przedstawia badania filogenetyczne przeprowadzone dla genu MGF505-2R izolatów terenowych, uzyskanych z 64 przypadków oraz 3 ognisk ASF. Na podstawie uzyskanych wyników oraz dostępnych w bazie GenBank sekwencji kompletnych genomów (Georgia oraz Odintsovo) dokonano analizy filogenetycznej oraz skonstruowano odpowiednie dendrogramy



izolatów ASF. Badania filogenetyczne przeprowadzono także na innych sekwencjach wybranych genów związanych z odpowiedzią immunologiczną gospodarza, pochodzących ze zmiennych fragmentów genomu (EP153R, A238L, EP402R). Na mapę Polski, przedstawiającą sytuację epidemiologiczną w odniesieniu do wirusa ASF naniesiono poszczególne przypadki i ogniska ASF, oznaczone wg przynależności do odpowiedniej grupy z uwzględnieniem wyników analizy filogenetycznej. Wykonane badania filogenetyczne szczepów wirusa ASF, na podstawie genu MGF505-2R, wykazały wysoki stopień podobieństwa genetycznego pomiędzy nimi (99,47%), co pozwala przypuszczać, że wirus ASF był kilkakrotnie zawleczony na terytorium Polski wraz z dzikami z terenu Białorusi. Ponadto analiza molekularna genów A238L oraz EP153R ujawniła jednorodność genetyczną izolatów krajowych wirusa ASF, jak również szczepów Georgia i Odintsovo wynoszącą 100%. W odniesieniu do genów EP402R i MGF505-2R stwierdzono pewne zróżnicowanie szczepów ASF w wyniku mutacji punktowych, co pozwoliło na wyodrębnienie kilku grup genetycznych. Analiza danych czasowo-przestrzennych dotyczących czasu i miejsca wystąpienia poszczególnych ognisk ASF u świń i przypadków u dzików wykazała ograniczoną możliwość „śledzenia” pochodzenia poszczególnych izolatów ASF, jak również powiązania pomiędzy nimi na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej genu MGF505-2R oraz genu EP402R.

Uzyskane wyniki badań wnoszą istotny wkład do diagnostyki i epidemiologii afrykańskiego pomoru świń. Do szczególnych osiągnięć recenzowanej rozprawy doktorskiej, zarówno z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia zaliczyć należy opracowanie szybkiego testu molekularnego do identyfikacji wirusa ASF z krwi i surowicy zwierząt zakażonych tzw. testu amplifikacji krzyżowej (CPA). Innowacyjność tej metody w porównaniu do metod tradycyjnych (PCR, RT-PCR) polega na zastosowaniu m.in. odpowiedniego buforu, co umożliwia wykorzystanie badanych próbek bezpośrednio do reakcji z pominięciem izolacji materiału genetycznego, a czas wykonania testu ulega wyraźnemu skróceniu w porównaniu do tradycyjnych metod.

W ramach prezentowanej pracy doktorskiej opracowano, mając na uwadze potrzebę poprawy specyficzności tradycyjnych metod amplifikacji w warunkach stałej temperatury, nowatorską metodę łańcuchowej amplifikacji spiralno-krzyżowej (PCLSR). Technika ta łączy prostotę wykonania z poziomem czułości i specyficzności zbliżonym do referencyjnej techniki real-time PCR. Zarówno CPA jak też PCLSR pozwalają na otrzymanie wyniku badania w czasie krótszym niż standardowo przeprowadzane procedury laboratoryjne. Prostota ich

przeprowadzenia, krótki czas badania oraz możliwość jednoznacznej interpretacji uzyskanych wyników przemawiają bez wątpienia za ich przydatnością w diagnostyce ASF.

Kolejnym celem rozprawy doktorskiej była charakterystyka molekularna krążących na terenie Polski szczepów wirusa ASF. Użyte do tego celu takie geny jak: A238L, EP153R, EP402R oraz MGF505-2R pozwoliły na bardziej szczegółową analizę rodzimych szczepów ASF w porównaniu do klasycznego genotypowania. Badania filogenetyczne krajowych izolatów ASF w oparciu o inne fragmenty genomu niż te wykorzystywane w podstawowej klasyfikacji (p72, MGF505-9R) przeprowadzono w Polsce po raz pierwszy. Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki analizy genów A238L oraz EP153R wskazują na jednorodnie genetycznie grupy wirusa, w których poziom identyczności pomiędzy sekwencjami nukleotydowymi szczepów Georgia i Odintsovo i szczepów krajowych wirusa ASF wynosił 100%. Pewien stopień różnorodności stwierdzono jedynie w sekwencjach genów EP402R i MGF505-2R na poziomie odpowiednio 0,8% i 0,5%, co potwierdza ich zmienny charakter w obrębie sekwencji genomu wirusa ASF.

Uzyskane w Krajowym Laboratorium Referencyjnym ds. ASF w PIWet-PIB w Puławach wyniki badań dotyczące analizy sekwencji nukleotydowej genów wirusa ASF mających wpływ na modulację odpowiedzi immunologicznej u zakażonego gospodarza wskazują, że badane regiony genomu wirusa okazały się skutecznymi markerami w analizie różnorodności blisko spokrewnionych szczepów ASF krążących w Polsce. Ponadto na podstawie danych czasowo-przestrzennych dotyczących występowania poszczególnych ognisk ASF u świń domowych i przypadków u dzików na terenie kraju stwierdzono, że na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej genu EP402R i MGF505-2R możliwe jest częściowe „śledzenie” pochodzenia poszczególnych szczepów ASF oraz analiza powiązań pomiędzy nimi.

Wyniki badań przedstawionych w cyklu publikacji stały się podstawą do wnikliwej dyskusji, w której Autorka dokonuje oceny własnych danych w konfrontacji z rezultatami otrzymanymi przez zespoły badawcze z innych krajów. Chciałbym podkreślić wysoką wartość naukowo-badawczą publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Uzyskane wyniki badań oprócz znaczenia naukowego wnoszą istotny element poznawczy o znaczeniu praktycznym, z możliwością jego zastosowania w diagnostyce ASF w Polsce. Warto podkreślić, że alternatywne metody diagnostyczne, będące wynikiem prowadzonych badań mają charakter innowacyjny. Biorąc pod uwagę łatwość wykonania, wysoką czułość i specyficzność oraz stosunkowo krótki czas badania czynią CPA i PCLSR bardzo atrakcyjnymi i pożądanymi



metodami w szybkiej diagnostyce tak ważnej i groźnej choroby, jaką od 4 lat w Polsce jest afrykański pomór świń.

Przedstawiona przez lek. wet. Magdalenę Frączyk rozprawa doktorska nie budzi zastrzeżeń ani pod względem formalnym ani merytorycznym. Niestety nie udało się uniknąć pewnych błędów rzeczowych. Mianowicie w rozdziale 3.1. Materiał do badań w akapicie „do diagnostyki ASF dodatkowo wykorzystano materiał genetyczny innych patogenów występujących u trzody chlewnej: DNA wirusa zespołu rozrodczo-oddechowego (PRRS) oraz DNA wirusa epidemicznej biegunki świń (PED)”. Oczywiście oba wirusy są wirusami RNA. W trakcie czytania moją uwagę zwróciły błędy interpunkcyjne oraz tzw. literówki stwierdzone w tekście pracy. We wstępie pracy pojawił się również błąd ortograficzny. Afryka subsacharyjska – właściwa pisownia **Afryka Subsaharyjska**. Brak jest pełnych danych bibliograficznych jednej z pozycji piśmiennictwa (piąta w kolejności): Andreani J., i wsp.: Journal of Virology 201....

Powyższe uwagi nie umniejszają w najmniejszym stopniu merytorycznej wartości dysertacji, którą oceniam bardzo wysoko. Doktorantka zrealizowała założone cele pracy i uzyskała oryginalne i wartościowe wyniki, które pozwoliły na prawidłowe sformułowanie sześciu wniosków. Wyniki pracy, oprócz aspektu naukowego mają charakter poznawczy i praktyczny, co może znaleźć zastosowanie w szybszej diagnostyce ASF oraz zaoferować nowe możliwości oceny filogenetycznej izolatów wirusa ASF występujących na terytorium Polski. Jest to szczególnie ważne biorąc pod uwagę obecną sytuację epidemiologiczną ASF w naszym kraju. Ocena filogenetyczna szczepów ASF, wyosobnionych w Polsce pozwoli na bardziej precyzyjne śledzenie łańcucha epidemiologicznego zakażeń ASF, a w konsekwencji bardziej skuteczną kontrolę i zwalczanie tej choroby.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Magdaleny Frączyk odpowiada warunkom stawianym na stopień doktora nauk w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 2i 4 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Komisji Przewodów Doktorskich Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Magdaleny Frączyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kazimierz Tarasiuk

