

**Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki**

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP

w Lublinie

### **Ocena**

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

W recenzowanej rozprawie Autorka wykorzystała wyniki badań opublikowanych w latach 2016-2017 w anglojęzycznych czasopismach naukowych zagranicznych i krajowych. Zgodnie z obowiązującą ustawą taka formuła może stanowić podstawę ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora. W tym przypadku rola recenzenta sprowadza się przede wszystkim do oceny indywidualnego wkładu kandydata do stopnia naukowego w powstanie pracy zbiorowej oraz wykazania, że oceniany cykl publikacji dowodzi jego kompetencji w zakresie formułowania koncepcji i hipotez badawczych, umiejętności planowania badań naukowych, wykonywania prac eksperymentalnych, analizy wyników badań i wyciągania wniosków. Spełnienie tych kryteriów stanowi dowód dojrzałości pracownika naukowego jako badacza, co jest jednym z warunków ubiegania się o stopień naukowy doktora.

W skład cyklu publikacji wchodzi 3 prace oryginalne i 1 artykuł przeglądowy. Łączny współczynnik wpływu (IF) prac wchodzących w skład cyklu wynosi 10,1, a sumaryczna punktacja czasopism zgodnie z wykazami MNiSW 110. W dwóch publikacjach oryginalnych Doktorantka jest pierwszym autorem, w pozostałych dwóch, w tym w artykule przeglądowym, drugim autorem. Przedstawione dane bibliometryczne świadczą o wysokiej randze czasopism w jakich Doktorantka opublikowała wyniki swoich badań i stanowią dowód ich dobrego poziomu naukowego.

Cykl artykułów tematycznie związany jest z afrykańskim pomorem świń i odnosi się do dwóch obszarów badawczych, tj. doskonalenia metod diagnostyki choroby oraz charakterystyki molekularnej szczepów wirusa ASFV izolowanych w kraju. ASF stanowi aktualnie najważniejszą chorobę zakaźną świń domowych i dzików, zwłaszcza dla krajów Europy Wschodniej. Rozprzestrzenianie zakażenia wśród obydwu gatunków rodziny *Suidae* stanowi wyzwanie nie tylko dla służb weterynaryjnych, ale także dla całej sfery rolnictwa, hodowli i gospodarki państw, w których choroba występuje oraz krajów ościennych dotychczas wolnych od choroby. W warunkach krajowych ASF podlega obowiązkowi urzędowego zwalczania, a na świecie obowiązkowi zgłaszania do Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE). Rygorystyczne postępowanie administracyjne dotyczące ASF związane jest przede wszystkim z wysokimi kosztami zwalczania choroby w ogniskach jej występowania oraz stratami wtórnymi wynikającymi z konieczności wdrażania administracyjnych procedur ograniczających ryzyko rozprzestrzeniania się zakażenia. Pojawienie się w roku 2014 pierwszych przypadków i ognisk ASF w krajach położonych na wschodzie UE oraz konsekwentne rozprzestrzenianie się wirusa w kierunku południowym i zachodnim uruchomiło w kraju system urzędowych procedur administracyjnych, których celem jest likwidacja ognisk

choroby występujących u świń, stałe monitorowanie zakażeń u dzików oraz przeciwdziałanie rozprzestrzenianiu się wirusa na tereny wolne. Niestety, mimo dużego wysiłku służb weterynaryjnych i organów administracji państwowej efektywność tych działań pozostaje ograniczona. Świadczą o tym m.in. zaprezentowane w rozprawie doktorskiej dane dotyczące liczby przypadków i ognisk choroby oraz ich konfrontacja z danymi aktualnymi, z których wynika, że w okresie niespełna roku liczba przypadków choroby u dzików zwiększyła się o 34% natomiast liczba ognisk aż o blisko 60%. Dane te wskazują niestety na ryzyko dalszego szerzenia się choroby na terenie kraju oraz rodzą obawy odnośnie konsekwencji ekonomicznych i gospodarczych, których wielkość trudno jest dzisiaj przewidzieć i oszacować.

Wstęp rozprawy zawiera informacje nt. historii występowania oraz epidemiologii ASF na świecie i w Europie, charakterystyki czynnika etiologicznego choroby, obrazu klinicznego zakażenia u świń domowych i dzików i rozpoznawania choroby. Odnosząc się do diagnostyki laboratoryjnej Doktorantka zwraca uwagę na znaczenie metod biologii molekularnej, w tym zwłaszcza ilościowej odmiany PCR, tzw. real-time PCR, wykorzystywanej rutynowo w badaniach urzędowych i rekomendowanej przez OIE i laboratorium referencyjne UE. Jednocześnie Autorka zwraca uwagę na niedoskonałość stosowanych aktualnie metod wykrywania kwasu nukleinowego ASFV wiążącą się z koniecznością korzystania ze specjalistycznej aparatury laboratoryjnej oraz angażowania wysoko kwalifikowanego personelu, co przekłada się także na wysoki koszt badań. Wymagania te ograniczają możliwość prowadzenia diagnostyki do odpowiednio wyposażonych laboratoriów, wykluczając tym samym jej wykonywanie w warunkach terenowych.

Biorąc pod uwagę sformułowane zastrzeżenia dotyczące rutynowych metod diagnostyki ASF Doktorantka obrała jako jeden z celów badań realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej opracowanie alternatywnych metod wykrywania wirusa ASF cechujących się porównywalną czułością i swoistością i jednocześnie szybkich i mniej skomplikowanych technicznie. Jedną z tych metod jest technika amplifikacji krzyżowej (CPA) oraz łańcuchowa reakcja spiralno-krzyżowa (PCLSR), obie wykonywane w warunkach stałej temp. mieszaniny reakcyjnej, a więc bez konieczności wykorzystywania tradycyjnych termocyklerów. Odpowiedni dobór starterów reakcji, komplementarnych do wybranego fragmentu genomu wirusa w założeniu ma zagwarantować wysoką specyficzność i czułość metody oraz jej wydajność.

Kolejny cel badań, jakim jest charakterystyka molekularna krajowych szczepów wirusa ASF Doktorantka uzasadnia niepełną dotychczasową wiedzą nt. patogenezы zakażenia oraz zjawisk immunologicznych zachodzących w organizmie na bazie interakcji zarazek – gospodarz. Autorka zakłada, że poznanie i charakterystyka molekularna wybranych genów zaangażowanych w patogenezę oraz mechanizmy odpornościowe organizmu przyczyni się do udoskonalenia metod zwalczania choroby oraz wniesie nowe dane do systemu klasyfikacji wirusów ASFV.

Badania genetyczne wykonano z użyciem materiału pochodzącego od dzików z 75 potwierdzonych przypadków ASF oraz od świń z 3 ognisk choroby diagnozowanych w kraju na przestrzeni blisko 2 lat, tj. od lutego 2014 r. do września 2015 r. W części badań dotyczącej opracowania nowych metod biologii molekularnej do wykrywania materiału genetycznego ASFV wykorzystywano także materiał genetyczny innych drobnoustrojów występujących u świń, w tym wirusa pomoru klasycznego, PRRS i PEDV. W celach porównawczych

wykorzystano szczepy referencyjne ASFV reprezentujące poszczególne genotypy (I, II, V, VIII, XI, X) oraz próbki DNA szczepów izolowanych w Estonii. Dodatkowo do badań włączono 55 próbek dodatnich pochodzących z 23 ognisk choroby u świń i z 22 przypadków u dzików, stwierdzonych w okresie do grudnia 2016 r. na terenie kraju. Kontrolę ujemną stanowiły tkanki i materiał genetyczny pochodzące od zwierząt wolnych od ASF.

Wykorzystana w pracy technika amplifikacji krzyżowej (CPA) jest prostą metodą wykrywania materiału genetycznego drobnoustrojów w próbkach bez konieczności izolacji DNA. Adaptując tę metodę do wykrywania materiału genetycznego ASFV Doktorantka dokonała optymalizacji warunków reakcji amplifikacji oraz określenia czułości i specyficzności testu, przyjmując jako „złoty standard” metodę referencyjną real-time PCR. Efektywność metody w wykrywaniu materiału genetycznego ASFV kontrolowano z wykorzystaniem próbek krwi i surowicy pochodzących od zakażonych świń i dzików z ognisk i przypadków odnotowanych na terenie kraju.

Drugą metodą, bazującą na łańcuchowej reakcji polimerazowej, opracowaną przez Doktorantkę do wykrywania ASFV jest łańcuchowa reakcja spiralno-krzyżowa (PCLSR). Tę metodę zastosowano do zbadania 20 próbek z lat 2014-2016 pochodzących od zakażonych świń i dzików i dodatkowo próbek z 23 ognisk i 22 przypadków odnotowanych do końca 2016 r. Ocenę parametrów metody wykonywano analogicznie jak w przypadku testu CPA. Użycie w badaniach porównawczych szczepów reprezentujących inne genotypy, poza II pozwoliło na ocenę uniwersalności metody w odniesieniu do różnych genotypów zarazka.

Analizę filogenetyczną krajowych szczepów ASFV prowadzono w odniesieniu do genu MGF 505-2R. W badaniach tych wykorzystano szczepy wirusa wyizolowane z 64 przypadków i 3 ognisk choroby. Do amplifikacji wybranego fragmentu genu wykorzystywano konwencjonalną metodę PCR, a do analizowania sekwencji nukleotydowej uzyskiwanych produktów reakcji specjalistyczne programy komputerowe. Dodatkowo analizę sekwencji nukleotydowej oraz badania filogenetyczne wykonano w odniesieniu do trzech innych genów, zlokalizowanych w zmiennych fragmentach genomu, zaangażowanych w odpowiedzi immunologicznej gospodarza (EP153R, A283L, EP402R). Efektem tej części badań było opracowanie mapy ognisk i przypadków ASF odnotowanych w Polsce zintegrowanej z danymi pochodzącymi z analizy filogenetycznej poszczególnych wirusów informującymi o przynależności izolatów do określonej grupy.

Wyniki dotyczące zastosowania metody CPA potwierdziły możliwość postawienia rozpoznania ASF w ciągu 45 min. w warunkach stałej temp. reakcji, co pozwala na zbadanie przy użyciu tej metody w ciągu jednego dnia roboczego znacznie większej liczby próbek niż jest to możliwe metodami tradycyjnymi. Przeprowadzone badania wykazały także porównywalną czułość metody CPA do uzyskiwanej testem referencyjnym. Warto podkreślić, że metoda CPA została po raz pierwszy zaadaptowana do wykrywania materiału genetycznego ASFV w KLR ds. ASF w PIW-PIB w Puławach, co stanowi oryginalne osiągnięcie Doktorantki i zespołu, w którym pracuje.

Podobne wyniki uzyskano w odniesieniu do łańcuchowej reakcji spiralno-krzyżowej. Przy użyciu tej metody wynik badania uzyskiwano w czasie 45-90 min. w warunkach temp. mieszaniny reakcyjnej w zakresie 55-66 °C. Czułość metody wynosiła 720 kopii DNA/μl, a zatem była niższa w porównaniu do uzyskiwanej metodą CPA i real-time PCR. Podobnie do metody CPA metoda PCLSR zastosowana do wykrywania wirusa ASF w próbkach materiału

biologicznego stanowi przykład innowacyjnego i nowatorskiego podejścia do diagnostyki ASF poprzez modyfikację techniki amplifikacji DNA w warunkach stałej temperatury. Wykazaną w badaniach efektywność tej metody w rozpoznawaniu zakażeń ASFV, potwierdzoną i udokumentowaną w odniesieniu do próbek pochodzących od zakażonych świń i dzików należy traktować jako osiągnięcie oryginalne oraz autorski wkład Doktorantki w proces doskonalenia metod diagnostyki ASF.

W recenzowanej rozprawie dokonano także analizy molekularnej szczepów ASFV wyizolowanych z przypadków i ognisk choroby na terenie kraju. Badania te wykazały wysoki stopień homologii sekwencji nukleotydowej analizowanych szczepów wirusa oraz potwierdziły fakt kilkukrotnego wprowadzenia zarazka z zewnątrz na terytorium Polski. Godnym podkreślenia jest fakt wykazania krążenia na terenie kraju jednorodnych genetycznie grup wirusów o pełnej identyczności sekwencji w zakresie badanych genów ze szczepami referencyjnymi oraz pomiędzy szczepami. Równocześnie wykazane zostały różnice sekwencji pomiędzy izolatami krajowymi oraz należącymi do genotypu innego niż II. Dowiedziono także, że krajowe izolaty ASFV ulegają procesowi zmienności genetycznej przyjmującej formę mutacji punktowych, co uprawnia do wyodrębnienia różnych grup genetycznych. Niestety, zapewne wbrew oczekiwaniom Doktorantki, nie udało się ustalić korelacji pomiędzy różnicami w sekwencji nukleotydowej badanych genów oraz pochodzeniem szczepów, co dałoby podstawę do ustalania źródła pochodzenia wirusa, ważnego w badaniach epidemiologicznych. Tym niemniej uzyskane w tej części badań wyniki wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym kierunku z użyciem technik sekwencjonowania następnej generacji (NGS).

W rozdziale „Dyskusja” Autorka podkreśla, że skuteczna i szybka diagnostyka ASF jest podstawą efektywnego zwalczania choroby. W opinii Doktorantki wyjściem naprzeciw takim oczekiwaniom ma być realizacja jednego z celów rozprawy, jakim było opracowanie alternatywnych metod wykrywania materiału genetycznego ASFV w materiale biologicznym. Jako główną zaletę tych metod Doktorantka traktuje możliwość ich wykonywania w warunkach terenowych. Warto się zastanowić, czy rzeczywiście obydwie techniki użyte w pracy doktorskiej można wykonywać w warunkach zbliżonych do terenowych, zwłaszcza jeśli mamy na myśli warunki krajowe. Nasuwa się ponadto zasadnicze pytanie, czy możliwe jest stosowanie w diagnostyce urzędowej metod nie rekomendowanych przez OIE oraz prawodawstwo UE i krajowe? Nie jest to jedyna wątpliwość nasuwająca się po lekturze dysertacji. Kolejna jest natury bardziej ogólnej i dotyczy spójności przyjętych celów badawczych. Wątpliwości recenzenta wynikają z faktu, że o ile obydwie cele traktowane rozdzielnie należy uznać za w pełni uzasadnione, to zespolenie ich pod szyldem rozprawy doktorskiej rodzi pewien dysonans. Jest on także widoczny w tytule rozprawy, który stanowi połączenie dwóch zagadnień mogących w zupełności stanowić odrębne tematy badawcze, dla których jedynym wspólnym ogniwem jest wirus ASFV. Wątpliwości te wymieniam świadomie zważywszy, że jednym ze wskazań ustawowych branych pod uwagę w ocenie cyklu publikacji jako podstawy ubiegania się o nadanie stopnia naukowego jest jego spójność tematyczna. Przyjmuję natomiast, że o spójności tej przesądza nadrzędny w stosunku do przyjętych celów badawczych obszar, jakim jest wiedza nt. ASF. Podtrzymuję jednak zastrzeżenie odnośnie spójności celów będąc przekonany, że obydwie cele potraktowane szerzej mogłyby stanowić odrębne tematy badawcze, tak jak stanowiły inspirację do napisania odrębnych publikacji. Jest oczywiste, że każda praca oryginalna wchodząca w skład cyklu publikacji stanowi wartość

samą w sobie, natomiast kompozycje takich prac nie w każdym układzie będą gwarantowały wspomnianą wcześniej spójność.

Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła 6 wniosków, z których cztery pierwsze odnoszą się do pierwszego celu badań, a dwa ostatnie do celu drugiego. Wniosek 3 stanowi powtórzenie wyników i można go pominąć.

Z uwagi na zbiorowe autorstwo cyklu prac, którego część stanowi podstawę ubiegania się Doktorantki o nadanie stopnia naukowego doktora, integralną część rozprawy doktorskiej stanowią oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac cyklu. Z załączonych oświadczeń wynika, że w przypadku wszystkich publikacji współautorski udział Doktorantki był większościowy i wynosił od 55%-65%. W tym zakresie wkładu pracy mieścił się udział w planowaniu doświadczenia, wykonywaniu analiz laboratoryjnych i bioinformatycznych, interpretacji wyników badań i pisaniu manuskryptu. Indywidualny udział pozostałych współautorów, w liczbie od 3-6 w zależności od publikacji, był zróżnicowany i wahał się od 35%-2,5%. Wkład pracy współautorów polegał na współdziałaniu w planowaniu doświadczenia, nadzorze nad wykonywaniem analiz laboratoryjnych, interpretacji wyników badań, przygotowaniu prac do druku oraz korekcie tekstu po recenzjach. Największy wkład własny współautorów, wynoszący 30% i 35% dotyczył publikacji, w których Doktorantka jest drugim współautorem spośród odpowiednio 6 i 4 autorów pracy. Analiza dołączonych do rozprawy doktorskiej oświadczeń współautorów wskazuje na istotny udział Doktorantki w pracy na każdym z etapów realizacji cyklu publikacji. Warty podkreślenia jest większościowy wkład pracy kandydata do stopnia naukowego w tworzenie koncepcji badań, precyzowanie celu pracy, wykonywanie analiz laboratoryjnych, a także interpretację uzyskiwanych wyników i pisanie prac. Analiza i ocena przytoczonego zestawienia procentowego wkładu pracy współautorów w powstawanie poszczególnych prac eksperymentalnych upoważniają recenzenta do stwierdzenia, że Doktorantka jest uprawniona do uznawania prezentowanego cyklu publikacji jako podstawy ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora na podstawie rozprawy naukowej stanowiącej część pracy zbiorowej.

Podsumowując uważam, że recenzowana praca doktorska dotyczy interesującego, z poznawczego i praktycznego punktu widzenia, problemu zakażeń wirusem ASFV u świń i dzików. Analiza i ocena prac eksperymentalnych ujętych w rozprawie dowodzi oryginalności rozwiązań problemu naukowego oraz ugruntowanej wiedzy Doktorantki z zakresu diagnostyki chorób zakaźnych i badań epidemiologicznych. Świadczy także o dobrym opanowaniu metodyki badań naukowych, zwłaszcza w odniesieniu do technik biologii molekularnej oraz wykorzystywania specjalistycznych programów komputerowych w analizie sekwencji nukleotydowych drobnoustrojów, co stanowi ważny atrybut umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Zaprezentowane badania wnoszą nowe dane nt. doskonalenia metod rozpoznawania zakażeń ASFV u świń i dzików oraz stwarzają perspektywę podjęcia w przyszłości szerszej zakrojonych badań epidemiologicznych, pozwalających na śledzenie źródeł zarazki i dróg szerzenia się zakażenia tym wirusem.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pani lek. wet. Magdaleny Frączyk pt. „Opracowanie alternatywnych metod diagnostyki afrykańskiego pomoru świń oraz charakterystyka molekularna izolatów wirusa w populacji dzików i świń” odpowiada warunkom określonym w art. 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. Magdaleny Frączyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

1

Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Magdaleny Frączyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie doceniając wkład pracy Doktorantki w rozwój nauk weterynaryjnych, udokumentowany cyklem wartościowych publikacji opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Lublin, 08 listopada 2017 r.

  
Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki