

dr hab. Kazimierz Tarasiuk, prof. UR

Kraków, 18.06.2020 r.

Uniwersyteckie Centrum

Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

Al. Mickiewicza 24/28

30-059 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Mazur-Panasiuk pt.: "Wpływ czynników środowiskowych na przeżywalność i szerzenie się wirusa afrykańskiego pomoru świń oraz analiza genomu szczepów wirusa"

Promotorem pracy jest dr hab. Grzegorz Woźniakowski, prof. instytutu, a promotorem pomocniczym dr hab. Jacek Żmudzki, prof. instytutu. Obaj Panowie Profesorowie pracują w Zakładzie Chorób Świń PIWet-PIB w Puławach.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Natalii Mazur-Panasiuk jest spójnym cyklem tematycznym czterech publikacji (trzy oryginalne i jedna przeglądowa).

Prace oryginalne (1.1, 1.2, 1.3)

- 1.1 Natalia Mazur-Panasiuk, Grzegorz Woźniakowski, Krzysztof Niemczuk:** The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Scientific Reports*. 9:4556, 2019. (Liczba pkt. MNiSW =100; IF = 4,122); DOI: [org/10.1038/s41598-018-36823-0](https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0)
- 1.2 Natalia Mazur-Panasiuk, Grzegorz Woźniakowski:** The unique genetic variation within the 0174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Archives of Virology*. 164:1667-1672, 2019. (Liczba pkt. MNiSW = 70; IF = 2,16); DOI: [DOI.org/10.1007/s00705-019-04224-x](https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x)
- 1.3 Natalia Mazur-Panasiuk, Grzegorz Woźniakowski:** Natural inactivation of African swine fever virus in tissues: Influence of temperature and environmental conditions on virus survival. *Veterinary Microbiology*. 242, 2020. (Liczba pkt. MNiSW = 100; IF = 2,791); DOI: [org/10.1016/j.vetmic.2020.108609](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108609)

Praca przeglądowa (2.1)

- 2.1 Natalia Mazur-Panasiuk, Jacek Żmudzki, Grzegorz Woźniakowski:** African swine fever virus – persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission. *Journal of Veterinary Research*. 63, 303-310, 2019. (Liczba pkt. MNiSW = 40; IF = 0,829); DOI: [10.2478/jvetres-2019-0058](https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0058)

Wszystkie prace, opublikowano w latach 2019-2020 w **recenzowanych** czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w tym trzy publikacje oryginalne ukazały się w *Scientific Reports*, *Archives of Virology* oraz w *Veterinary Microbiology*; artykuł przeglądowy w *Journal of Veterinary Research*. Łącznie, przedstawione prace uzyskały 310 pkt. MNiSW oraz Impact Factor, wynoszący 9,902 wg Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania.

Wszystkie artykuły są dwu lub trzy-autorskie, przy czym we wszystkich publikacjach pierwszym autorem jest Doktorantka. Z przedstawionych oświadczeń współautorów i ich wkładu w realizację prac wynika jednoznacznie, że udział Doktorantki w zaplanowaniu badań, ich przeprowadzeniu w laboratorium, jak też udział w interpretacji uzyskanych wyników oraz napisaniu manuskryptów i wykonaniu korekty po ich recenzji był bardzo wysoki i wynosił od 75 do 85%.

We wstępie pracy doktorskiej Autorka szczegółowo przedstawia wybrane aspekty z zakresu obecnej sytuacji epizootycznej Afrykańskiego pomoru świń (APŚ) nie tylko w Polsce, ale także w wielu innych krajach europejskich oraz na terenie Azji Południowo-Wschodniej. Doktorantka opisuje dość szczegółowo rezerwuar wirusa APŚ, jak również jego potencjalne wektory, mające znaczenie w rozprzestrzenianiu się zarazka w środowisku. Autorka wskazuje na kleszcze miękkie z rodzaju *Ornithodoros* spp., które odgrywają kluczową rolę w rozprzestrzenianiu się wirusa APŚ w Afryce oraz w krajach południowej Europy. Znaczenie kleszczy twardych z rodziny Ixoidae, jak też owadów powszechnie występujących w klimacie umiarkowanym w ekspansji wirusa nie zostało, jak dotąd, jednoznacznie udowodnione. Dużo miejsca we wstępie pracy poświęcono budowie wirusa APŚ ze szczególnym uwzględnieniem genomu oraz zakodowanych w nim białek o różnorodnym znaczeniu i właściwościach. Sporo uwagi Doktorantka poświęciła zmienności genetycznej wirusa APŚ, co zostało dokładnie przedstawione w literaturze z ostatnich lat. Stwierdzone różnice w sekwencjach nukleotydowych pozwoliły na wyselekcjonowanie markerów molekularnych w obrębie szczepów wirusa krążących w krajach Eurazji. Niektóre z wykrytych mutacji są charakterystyczne dla konkretnych regionów geograficznych, w tym i w Polsce, co może pomóc w śledzeniu rozprzestrzeniania się wirusa. We wstępie pracy przedstawiono także wszystkie aspekty związane z metodami laboratoryjnymi, stosowanymi w diagnostyce APŚ. W końcowej części wstępu Doktorantka omawia oporność wirusa na czynniki fizyko-chemiczne, a co za tym idzie utrzymywanie się zarazka w środowisku. Szczegółowo stabilność wirusa w różnych warunkach środowiska została omówiona w pracy przeglądowej, wchodzącej w skład monotematycznego cyklu prac (1.3). Należy podkreślić, że we wstępie dysertacji Autorka wykazała się dobrą znajomością piśmiennictwa i wiedzy nt. APŚ, w szerokim tego słowa znaczeniu, oraz wykorzystwała najnowsze dane piśmiennictwa.

Celem zrealizowanych, w ramach rozprawy doktorskiej, badań było określenie wpływu czynników środowiskowych na przeżywalność wirusa APŚ w wybranych tkankach zakażonych

dzików i/lub świń oraz charakterystyka molekularna krajowych izolatów wirusa z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania następnej generacji.

Cele szczegółowe pracy określono w pięciu punktach:

1. Izolacja krajowych szczepów wirusa APŚ w hodowlach pierwotnych makrofagów płucnych świń oraz oszacowanie wrażliwości ciągłej linii komórkowej unieśmiertelnionych makrofagów płucnych świń na zakażenie tym wirusem (Praca 1.1).
2. Opracowanie metody przygotowania próbek DNA, wyosobnionego z krajowych szczepów wirusa APŚ do sekwencjonowania następnej generacji (NGS); analiza porównawcza z genomami wirusa APŚ, dostępnymi w bazie danych GenBank. Wytypowanie potencjalnych markerów molekularnych oraz ocena przydatności NGS do identyfikacji tych markerów (Praca 1.1).
3. Analiza obecności zidentyfikowanej insercji nukleotydowej w genomie wybranych izolatów APŚ, wyosobnionych w latach 2014 – 2018 oraz ocena jej przydatności do śledzenia rozprzestrzeniania się zakażenia na terenie Polski (Praca 1.2).
4. Wyznaczenie tempa inaktywacji wirusa w szczątkach padłych zwierząt w zależności od temperatury oraz rodzaju tkanki poprzez określenie okresu półtrwania i wskaźnika redukcji dziesiętnej wirusa zawartego w rozkładających się tkankach (Praca 1.3).
5. Oszacowanie wpływu czynników środowiskowych na przeżywalność wirusa APŚ w wybranych tkankach świń z uwzględnieniem warunków środowiska, w którym mogą znajdować się zwłoki padłych świń lub dzików (woda, gleba, ściółka leśna, słoma, siano, ziarno) (Praca 1.3).

Szczegółowy opis materiałów i metod zastosowanych do przeprowadzenia badań Doktorantka zawarła w publikacjach oryginalnych, składających się na niniejszą rozprawę doktorską.

Do przeprowadzenia badań podjętych w ramach pracy 1.1 wykorzystano materiał biologiczny, pochodzący z kolekcji Krajowego Laboratorium Referencyjnego ds. APŚ w PIWet-PIB w Puławach. Materiał ten stanowił panel 48 tkanek, bądź ich homogenatów, z których 34 pobrano od dzików i 14 od świń domowych. Materiał biologiczny pobrano z potwierdzonych przypadków i ognisk w latach 2014-2018. Pierwotne makrofagi płucne świń były dostarczone przez Duński Instytut Techniczny – Duński Instytut Weterynaryjny na wyspie Lindholm. Linia komórkowa unieśmiertelnionych makrofagów płucnych świń została zakupiona w Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych. Izolacji wirusa APŚ dokonano w hodowli makrofagów pierwotnych. Uzyskany, w procesie wieloetapowego oczyszczania, całkowity

DNA został poddany sekwencjonowaniu następnej generacji przez serwis zewnętrzny. Otrzymane sekwencje zamieszczono w dostępnej bazie GenBank. Następnie przeprowadzono analizę filogenetyczną otrzymanych pełnych sekwencji genomowych, które porównano z odnośnymi sekwencjami czterech innych, blisko spokrewnionych szczepów APŚ, dostępnych w bazie GenBank; zidentyfikowano miejsca wykazujące zmienność w sekwencji nukleotydowej, mogące stanowić potencjalne markery molekularne izolatów należących do II genotypu APŚ.

W pracy 1.2 Doktorantka przeanalizowała częstotliwość występowania 14-nukleotydowej insercji w obrębie genu O174L oraz ocenę przydatności tej mutacji, jako markera molekularnego, umożliwiającego śledzenie rozprzestrzeniania się choroby w czasie i przestrzeni. W badaniach użyła 46 reprezentatywnych szczepów wirusa APŚ, z których 16 pochodziło od dzików i 30 od świń domowych. Wszystkie szczepy wyizolowano w latach 2014-2018 w różnych regionach Polski, w których występował APŚ. Uzyskane sekwencje opracowano pod kątem analizy filogenetycznej genu O174L. Dodatkowo przeprowadzono analizę czasoprzestrzenną pochodzenia izolatów, a następnie, w zależności od obecności analizowanej mutacji, na mapie Polski naniesiono punkty symbolizujące występowanie szczepów APŚ, z podziałem na szczepy pochodzące z ognisk oraz te wyizolowane z przypadków.

Badania w ramach pracy 1.3 miały na celu określenie czasu przeżywalności wirusa APŚ obecnego w wybranych tkankach padłych świń domowych i dzików w warunkach zbliżonych do naturalnych, z uwzględnieniem m.in. temperatury otoczenia. Doktorantka do badań użyła skrawki śledziony, płuc i nerki, pobrane od świni padłej w wyniku zakażenia wirusem APŚ. Próbkę poszczególnych narządów umieszczano w temperaturze -20 °C, +4 °C, +23 °C, a następnie inkubowano przez okres 112 dni. W określonych odstępach czasu (7, 14, 28, 56, 112 dni od rozpoczęcia doświadczenia) próbki poddawano procedurze mianowania wirusa oraz określano zawartość wirusowego DNA w próbce techniką real-time PCR. Na podstawie wyników mianowania wyznaczono okres półtrwania oraz wskaźnik redukcji dziesiętnej dla każdej z badanych tkanek w odpowiedniej temperaturze. Kolejne badania, realizowane w ramach tej pracy miały na celu określenie wpływu temperatury otoczenia na tempo inaktywacji wirusa zawartego w naturalnie zanieczyszczonych wirusem APŚ tkankach w trakcie ich rozkładu gnilnego w zakresie temperatury +4 °C oraz +23 °C. Fragment śledziony pobranej od padłego zwierzęcia, po określeniu miana wirusa, umieszczano w wybranych matrycach, takich jak: woda, gleba, ściółka leśna siano, słoma i ziarno, imitujących warunki naturalne, w których

może dochodzić do kontaktu z wirusem APŚ. Po upływie 7, 14, 21 i 56 dni pobierano próbki tkanek w celu określenia w nich zawartości wirusowego DNA przy użyciu real-time PCR; określano miano zakaźne wirusa oraz obliczano okres półtrwania wirusa APŚ.

Uzyskane wyniki badań wnoszą istotny wkład do diagnostyki wirusologicznej oraz epidemiologii afrykańskiego pomoru świń. Doktorantka dokonała skutecznej izolacji wirusa APŚ w hodowli makrofagów pierwotnych, co pozwoliło na uzyskanie 12 izolatów wirusa z puli 48 testowanych próbek. Wykazała tym samym przydatność makrofagów pierwotnych do izolacji oraz namnażania wirusa APŚ. Wyekstrahowany z wyizolowanych szczepów DNA poddano sekwencjonowaniu następnej generacji, w wyniku czego otrzymano 7 kompletnych sekwencji genomu wirusa APŚ, wyosobnionego z obszaru Polski w latach 2016-2017. Analiza bioinformatyczna dowiodła, iż genom krajowych szczepów APŚ wykazuje od 99,941 do 99,956% podobieństwa do referencyjnego szczepu Georgia 2007/1, jak również wysoki stopień podobieństwa do 3 innych sekwencji genomowych wirusów APŚ, związanych z obecną epidemią w Eurazji, zdeponowanych w bazie GenBank. Porównanie sekwencji genomów krajowych szczepów z genomem wirusa gruzińskiego wykazało obecność 55 różnic w obrębie 35 sekwencji kodujących geny, z czego 26 mutacji zidentyfikowano we wszystkich sekwencjach szczepów krajowych. Wykryto też wiele unikalnych, dla polskich izolatów APŚ, mutacji, wśród których znalazło się 5 mutacji punktowych.

Kolejnym osiągnięciem Doktorantki było określenie przydatności zidentyfikowanej insercji w genie O174L w śledzeniu epidemiologicznym zakażenia wirusem APŚ w Polsce. Na liczbę 46 szczepów obecność mutacji stwierdzono w genomie 12 izolatów wirusa, których występowanie potwierdzono w kilku sąsiadujących ze sobą powiatach. Analiza czasowa wykazała, iż po raz pierwszy w Polsce mutację stwierdzono w szczepach wirusa, wyosobnionych w 2016 roku w pobliżu granicy z Białorusią. Występowanie kolejnych siedmiu izolatów z insercją w genie O174L potwierdzono w latach 2016-2018 w promieniu 50 km od ogniska pierwotnego. Cztery izolaty pochodziły z ognisk i przypadków zlokalizowanych w odległości ok. 100-140 km od ogniska pierwotnego. Należy podkreślić, że mutacji tej nie potwierdzono w przypadku innych izolatów APŚ, pochodzących z województwa podlaskiego, lubelskiego, mazowieckiego i warmińsko-mazurskiego.

W ramach prezentowanej dysertacji Doktorantka wyznaczyła okres półtrwania oraz wskaźnik redukcji dziesiętnej w tkankach, pobranych od zwierząt zakażonych wirusem APŚ, w zależności od temperatury. Wykazała, że okres półtrwania w temperaturze +4°C wahał się od

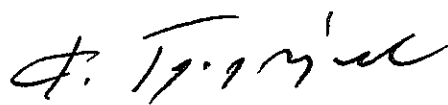
1,94 do ok. 9 dni, zaś wskaźnik redukcji dziesiętnej od 6,46 do prawie 21 dni. W temperaturze +23 °C wirus uległ szybkiej inaktywacji i już po 7 dniach miano wirusa, w badanych tkankach, spadło poniżej granicy wykrywalności. Kolejne badania miały na celu określenie wpływu temperatury otoczenia na tempo inaktywacji wirusa zawartego w naturalnie zanieczyszczonych wirusem APŚ tkankach, w trakcie ich rozkładu gnilnego, w zakresie temperatury +4 °C oraz +23 °C. W odniesieniu do temp. +23 °C nastąpił bardzo szybki rozkład tkanek, prowadzący do inaktywacji wirusa. W temperaturze +4 °C zakaźność wirusa w tkankach przechowywanych w słomie, sianie i ziarnie utrzymywała się przez co najmniej 56 dni. Zanotowano także znaczący spadek stabilności wirusa w tkankach przechowywanych w glebie, wodzie i ściółce leśnej w porównaniu do kontroli. Należy podkreślić, że w obu eksperymentach wyniki uzyskane przy użyciu metody real-time PCR nie były w pełni zgodne z rezultatami analiz wirusologicznych.

Wyniki badań przedstawionych w spójnym tematycznie cyklu prac 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 wirusologicznej oraz w epidemiologii wirusa APŚ. Przydatnym markerem molekularnym, co wykazała w niniejszej rozprawie Doktorantka, jest insercja nukleotydowa w obrębie sekwencji genu O174L. Obecność tej nietypowej sekwencji nukleotydowej stwierdzono w genomie 12 izolatów, wyosobnionych od dzików i świń w latach 2016-2018, w regionie na pograniczu województw podlaskiego, mazowieckiego, lubelskiego i Białorusi. W późniejszych latach tę mutację stwierdzano także w genomie wirusa APŚ, izolowanego od dzików w okolicach Warszawy. Innym markerem molekularnym, którego znaczenie w analizie filogeograficznej Doktorantka wykazała w odniesieniu do szczepów APŚ wyizolowanych od dzików w Polsce Zachodniej, gdzie choroba pojawiła się niespodziewanie w listopadzie 2019 roku. Szczegółowa analiza molekularna pierwszych wyizolowanych szczepów wirusa APŚ z tego regionu kraju wykazała obecność mutacji w genie O174L oraz typowej dla Polski zmienności w genach K145R i MGF 505-5R. Wyniki te wskazują na zawleczenie wirusa na obszar Zachodniej Polski prawdopodobnie z regionu warszawskiego lub obszaru na styku granic województwa podlaskiego, lubelskiego, mazowieckiego i Białorusi. Warto podkreślić, że Doktorantka kontynuuje badania dotyczące mutacji w sekwencji nukleotydowej genu O174L w ramach projektu badawczego, wykraczającego poza ramy niniejszej rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona przez mgr Natalię Mazur-Panasiuk rozprawa doktorska nie budzi zastrzeżeń pod względem formalnym oraz merytorycznym. Niestety nie udało się uniknąć pewnych błędów rzeczowych. Doktorantce zdarzało się używać terminu „zarażenie” wirusem. Uważam, że w odniesieniu do wirusów i bakterii bardziej właściwym jest termin „zakażenie”. W trakcie czytania moją uwagę zwróciły błędy interpunkcyjne, jak też tzw. „literówki” stwierdzone w tekście pracy.

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. Identyfikacja specyficznych markerów molekularnych poszerza spektrum możliwości oceny filogenetycznej oraz filogeograficznej izolatów wirusa APŚ, występujących na terytorium Polski. Jest to szczególnie ważne biorąc pod uwagę obecną sytuację epidemiczną ASF w naszym kraju. Ocena molekularna szczepów ASF, wyosobnionych w Polsce pozwoli na bardziej precyzyjne śledzenie łańcucha epidemiologicznego zakażeń ASF, a w konsekwencji bardziej skuteczną kontrolę i zwalczanie tej choroby. Doktorantka w badaniach *in vitro* dowiodła szybkiego tempa inaktywacji wirusa w naturalnie rozkładających się tkankach padłych zwierząt oraz wyznaczyła matematyczny model inaktywacji wirusa APŚ podczas rozkładu tkanek. Co więcej otrzymane wyniki badań podważają dotychczasowy pogląd wskazujący na wysoką oporność wirusa APŚ na warunki środowiska. Opracowana koncepcja w przyszłości może być przydatnym narzędziem w ocenie ryzyka związanego z występowaniem wirusa APŚ w środowisku.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Natalii Mazur-Panasiuk 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 Pani mgr Natalii Mazur-Panasiuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Kazimierz Tarasiuk