

Wrocław 25.06.2016

Dr hab. Andrzej Gawęł, prof. nadzw.
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków
i Zwierząt Egzotycznych
Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza weterynarii Karoliny Tarasiuk
p.t.: „Charakterystyka molekularna szczepów wirusa choroby Derzsy’ego izolowanych od
gęsi w Polsce”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Samorek-Salamonowicz
i dr hab. Grzegorza Woźniakowskiego, prof. nadzw.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 10.05.2016 roku, zgodne z uchwałą Rady
Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w
Puławach podjętej w dniu 21.11.2012r.

Polska jest liderem w produkcji gęsi w Europie, a „polska gęś owsiana” jest dobrze
znanym i cenionym produktem eksportowym. Wielkość produkcji gęsiny w Polsce sięga 22
mln ton, co plasuje nasz kraj na czwartym miejscu w świecie. Wielkotowarowy chów gęsi
związany z intensyfikacją i komasacją produkcji stwarza jednak realne zagrożenie wybuchu
wielu chorób zakaźnych. Wśród chorób wirusowych drobiu wodnego jedną z powszechniej
występujących jednostek chorobowych jest choroba Derzsy’ego, wywoływana przez wirusy z
rodziny *Parvoviridae*. Choroba ta występować może u gęsi i kaczek piżmowych i powoduje
wysoką śmiertelność ptaków dochodzącą do 100%.

Pierwsze doniesienia dotyczące tej choroby pochodzą z 1956 roku z Chin, gdzie obserwowano „ciężką chorobę gąsiąt” i masowe padnięcia. W latach 60. XX wieku w wielu krajach europejskich notowano podobne objawy spowodowane nieznanym wtedy jeszcze czynnikiem etiologicznym.

W Polsce wystąpienie choroby po raz pierwszy opisał profesor Zenon Wachnik. Nazwa „choroba Derzsyego” używana jest od roku 1974, na cześć węgierskiego uczonego, prof. Derzsy’ego dla uhonorowania jego pionierskich badań nad chorobą młodych gąsiąt.

Przebieg choroby Derzsy’ego i śmiertelność w stadzie są zależne od wieku i statusu immunologicznego ptaków. Ptaki 2-3 tygodniowe wykazują apatię, zmniejszone przyrosty, braki w upierzeniu, postawę pingwina, a śmiertelność w stadzie wynosi ok. 20%. Wysoka śmiertelność wskutek wystąpienia choroby Derzsyego ograniczona została poprzez wprowadzenie szczepień ochronnych, jednak choroba nadal stanowi istotne zagrożenie w stadach drobiu wodnego.

Lekarz weterynarii Karolina Tarasiuk podjęła wieloetapowe badania, mające na celu między innymi identyfikację materiału genetycznego parwowirusów gęsi w próbkach terenowych przy użyciu metody LAMP, izolację, charakterystykę i analizę filogenetyczną wirusa, otrzymanie rekombinowanych białek VP3 oraz opracowanie i optymalizację testu ELISA z użyciem rekombinowanych białek.

Manuskrypt ocenianej rozprawy ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich i liczy 83 strony wydruku komputerowego. Obszerną dokumentację dysertacji stanowi 14 tabel i 12 rycin umiejętnie wkomponowanych w tekst rozprawy.

„Wstęp” obejmujący 13 stron składa się z 7 podrozdziałów i zawiera informacje dotyczące produkcji gęsi w Polsce, przebiegu, profilaktyki i diagnostyki choroby Derzsy’ego oraz charakterystyki wirusów z rodziny *Parvoviridae*.

Celami pracy doktorskiej lek. wet. Karoliny Tarasiuk były:

- identyfikacja materiału genetycznego szczepów GPV w próbach terenowych od gęsi z podejrzeniem choroby Derzsyego przy użyciu metody LAMP
- izolacja, charakterystyka i analiza filogenetyczna szczepów wirusa choroby Derzsyego oraz porównanie danych dotyczących polskich szczepów z danymi dostępnymi w bazach danych

- otrzymywanie rekombinowanych białek VP3 parwowirusa gęsiego w systemie ekspresyjnym *E.coli*.
- opracowanie i optymalizacja testu ELISA z użyciem otrzymanych rekombinowanych białek

Zakres przeprowadzonych przez doktorantkę badań daleko wykracza poza temat pracy doktorskiej „Charakterystyka molekularna szczepów wirusa choroby Derzsy’ego izolowanych od gęsi w Polsce” która jest tylko częścią z przeprowadzonych badań. Zdaniem recenzenta, warto byłoby podkreślić również niezwykle istotny etap badań dotyczący opracowania i wdrożenia nowoczesnych testów diagnostycznych LAMP i ELISA.

Obszerny rozdział „Materiały i metody”, składa się z 16 podrozdziałów zatytułowanych: szczepy wirusowe stosowane do badań, hodowla fibroblastów zarodka gęsiego, namnażanie szczepów wirusa choroby Derzsyego, określanie miana TICD50 w hodowli fibroblastów zarodków gęsich, izolacja całkowitego komórkowego DNA, PCR, metoda amplifikacji w warunkach stałej temperatury (LAMP), analiza sekwencyjna badanych szczepów, konstrukcja bakteryjnego szczepu ekspresyjnego zawierającego plazmid z genem kodującym kapsydowe białko VP3, otrzymanie rekombinowanego białka VP3 oraz próby surowicy użyte do badań.

Rozdział zatytułowany „Przebieg doświadczeń i wyniki” podzielony został na 2 etapy – etap I „ Identyfikacja i analiza molekularna terenowych izolatów parwowirusa gęsiego” oraz etap II - „ Opracowanie testu ELISA”.

Doktorantka wykazała na podstawie analizy sekwencji białka VP3, iż polskie izolaty wykazały wysoki (96-100%) stopień pokrewieństwa w odniesieniu do izolatów europejskich. Niewątpliwą wartością badań jest opracowanie przez Doktorantkę testów LAMP i ELISA które mogą być wykorzystane do diagnostyki choroby Derzsyego.

Dyskusja jest wnikliwym omówieniem uzyskanych wyników badań w odniesieniu do danych zawartych w dostępnym piśmiennictwie i świadczy o dużej wiedzy i znajomości literatury z omawianego tematu.

Wnioski płynące z pracy doktorskiej lekarz weterynarii Karoliny Tarasiuk wskazują na możliwość zastosowania techniki LAMP i ELISA do identyfikacji szczepów terenowych GPV cechując się przy tym wysoką czułością i specyficznością, a przeprowadzona analiza

filogenetyczna potwierdziła wysokie podobieństwo polskich izolatów GPV do szczepów europejskich.

Uzupełnieniem pracy jest bogaty wykaz piśmiennictwa, który świadczy o zdolności Doktorantki do wyboru prac odpowiednich do analizy uzyskanych wyników i dyskusji w ramach tematyki, będącej przedmiotem badań. W pracy zawarto również syntetyczne streszczenie w języku polskim i angielskim.

W mojej ocenie rozprawa lekarz weterynarii Karoliny Tarasiuk stanowi wartościowe opracowanie naukowe dotyczące aktualnego problemu badawczego, a zastosowanie różnorodnych metod badawczych świadczy o dogłębnej analizie podjętego tematu. Praca bez wątpienia zawiera elementy innowacyjne i odpowiada wymogom naukowym i formalnym stawianym rozprawom doktorskim. Biorąc pod uwagę innowacyjność badań i konieczność poszukiwania nowych i doskonalenia istniejących metod diagnostycznych, pracę należy zaliczyć do prac o dużej wartości aplikacyjnej.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednakże zwrócić uwagę na następujące niedociągnięcia:

WSTĘP

- rycina 1 obrazująca liczbę gęsi w poszczególnych województwach wyraźnie odbiega jakością od pozostałych rycin przedstawionych w tym rozdziale

- w tabeli 1, w kolumnie opisanej jako „jednostka chorobowa, wiek wrażliwych ptaków” w wierszach 1 i 2 powinny być wpisane jednostki chorobowe – adenowiroza, cirkowiroza zamiast „immunosupresja”. Dla uczynienia jej bardziej czytelną, recenzent sugeruje rozdzielenie tej kolumny na 2 – z oddzielnym ujęciem „jednostka chorobowa” i „wiek wrażliwych ptaków”

MATERIAŁY I METODY

- recenzent sugeruje przedstawienie danych dotyczących materiału użytego do badań w tabeli uwzględniając w kolumnach: oznaczenie stada, gatunek, województwo z którego pochodzi stado, nr izolatu itd. Dane te, w stosunku do kilku stad pojawiają się w późniejszych rozdziałach

- w podrozdziale 3.8.1 brak jest informacji w jaki sposób amplifikowano gen VP3 (użyte startery, warunki reakcji itd.)

- dla tabeli 4 bardziej adekwatnym tytułem byłoby „sekwencje szczepów z bazy Genbank użyte do analizy molekularnej” zamiast „szczepy referencyjne zastosowane do analizy” gdyż doktorantka analizowała dostępne w bazie sekwencje

PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ I WYNIKI

- w podrozdziale 4.1.1 „Określenie czułości i specyficzności LAMP” doktorantka podaje że czułość metody to 0,1TCID50, natomiast na fotografii 3 w próbie 4 opisanej jako 0,1TCID50 brak jest drabinki amplikowanych fragmentów DNA co oznacza, że próba jest ujemna. Z czego wynikają te różnice?

- rycina 4 i 5 – wartości przy węzłach są niejasne i często mimo większego oddalenia gałęzi na których znajdują się szczepy wartości te są niższe (przykładem jest grupa 3 ryc.4, gdzie wartość 100 jest przy najbardziej oddalonym węźle, a wartości od 99 do 71 na bliższych węzłach). Z czego to wynika?

- na fotografii 12 brak jest widocznych prążków w przypadku prób dodatnich

DYSKUSJA

- Doktorantka powinna uściślić czy produkt VP3 ma 1604 czy 1605 par zasad (w różnych rozdziałach podawana jest różna wartość).

- „Flakowate serce” nie jest właściwym określeniem anatomopatologicznym.

WNIOSKI

Pierwszy wniosek powinien być zgodny z tytułem pracy – recenzent sugeruje umieszczenie wniosku drugiego jako pierwszego. Wniosek trzeci powinien być przeredagowany – należy uwzględnić jakie parametry wpływają na fakt że rekombinowane białko VP3ep4 jest najlepsze do przygotowania ELISA.

Pomimo wspomnianych niedociągnięć, aktualność poruszanego problemu badawczego, jego innowacyjność, nowoczesny i rzetelny warsztat badawczy oraz opracowanie użytecznych do diagnostyki choroby Derzsyego testów LAMP i ELISA, a także przeprowadzona z dużym znanstwem dyskusja i wyciągnięcie właściwych, adekwatnych do uzyskanych wyników wniosków sprawiają, iż praca ma duże znaczenie aplikacyjne i wnosi realny wkład w rozwój nauki.

O wartości wykonanych badań świadczy również fakt, iż część z nich została już opublikowana w dwóch czasopismach:

1. Polish Journal of Veterinary Sciences : “Expression of goose parvovirus whole VP3 protein and its epitopes in Escherichia coli cells”
2. Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy : “Loop-Mediated Isothermal Amplification as a Simple Molecular Method for the Detection of Derzsy’s Disease Virus”

Zaprezentowana dysertacja spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego przedkładam Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Karoliny Tarasiuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Dr hab. Andrzej Gawel prof. nadzw.

