

Lublin 1.06.2016

Prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń
Zakład Wirusologii i Immunologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19
20-033 Lublin

**Recenzja pracy doktorskiej lek wet. Karoliny Tarasiuk p.t.
„Charakterystyka molekularna szczepów wirusa choroby Derzsy`ego
izolowanych od gęsi w Polsce”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy oceny występowania różnych szczepów wirusa choroby Derzsy`ego w Polsce, ich charakterystyki molekularnej oraz opracowania testów do diagnostyki zakażeń tym wirusem.

Promotorem pracy jest prof. dr hab. Elżbieta Samorek-Salamonowicz, a promotorem pomocniczym dr hab. Grzegorz Woźniakowski, prof. nadzw. z Zakładu Chorób Wirusowych Drobiu, PIWet-PIB w Puławach.

Wirus choroby Derzsy`ego (DD), stanowiący przedmiot rozprawy doktorskiej należy do rodziny *Parvoviridae*, występującej u wielu gatunków zwierząt, w tym u ptactwa wodnego. W Polsce dostępna jest szczepionka przeciwko DD stosowana u gęsi i zawierająca w swym składzie inaktywowane szczepy GPV i MDPV, którą szczepi się ptaki w okresie nieśności. Pozwala to na przekazywanie przeciwciał matczynych gąsiętom. Stan odporności piskląt jest różny i powinien być sprawdzany przez badanie obecności przeciwciał. Ze względu na szczepienia, zakażenie wirusem DD w Polsce przyjmuje obecnie postać subkliniczną i chroniczną. Choroba ta podlega obowiązkowi rejestracji w PIWet-PIB w Puławach. Dlatego tak ważna jest szybka i precyzyjna diagnostyka tej choroby. Ważne jest także śledzenie zmienności tego wirusa wpływającej na jego właściwości patogenne. Konieczne jest więc prowadzenie

analizy filogenetycznej, w celu porównania szczepów w kraju i na świecie oraz wykrycie kierunków pochodzenia szczepów wirusa w kraju. Do molekularnej charakterystyki wirusa DD w pracy zastosowano szybką metodę LAMP opracowaną wcześniej, dla innych wirusów, w Zakładzie Chorób Wirusowych Drobiu, PIWet-PIB w Puławach. Doktorantka opracowała drzewo filogenetyczne izolatów polskich, wykazując ich europejskie pochodzenie, na podstawie sekwencji genu VP3. Do diagnostyki serologicznej, z kolei, potrzebne są badania poziomu przeciwciał u gęsi w hodowlach wielkostatdnych, konieczne było więc opracowanie szybkiego testu opartego na technice ELISA z zastosowaniem antygenów wirusa DD. Z wielu względów technicznych i ekonomicznych test oparty na całym wirusie, także opracowany w Zakładzie, nie jest korzystny. Doktorantka podjęła więc próby otrzymania antygenów wirusa metodami inżynierii genetycznej w systemie ekspresyjnym *E. coli*, pozwalającym na tanie otrzymanie dużej ilości antygenów wirusa. Prace po początkowych niepowodzeniach z klonowaniem całego genu VP3, zakończyły się pomyślnym opracowaniem czułego testu ELISA, opartego na fragmentach antygeny VP3ep4 wirusa DD.

Rozprawa doktorska obejmuje 83 strony starannego druku komputerowego i jest ilustrowana licznymi schematami, tabelami, wykresami i zdjęciami. Praca napisana jest ładnym i precyzyjnym językiem. Została zredagowana bardzo starannie i w tekście nie ma poważnych usterek językowych. Autorka wykazała się w niej dużą wiedzą z zakresu biologii molekularnej i wirusologii i porusza się w tym obszernym materiale z dużą swobodą. Prezentacja wyników jest dobrej jakości, a praca ma prawidłową strukturę charakterystyczną dla prac eksperymentalnych, zawiera komplet rozdziałów, a wyniki są dobrze udokumentowane.

Wstęp rozprawy oceniam bardzo pozytywnie, gdyż jest to przegląd najnowszego piśmiennictwa z pojedynczymi pozycjami o znaczeniu historycznym. Autorka przedstawiła w nim takie zagadnienia jak wstępne

informacje dotyczące hodowli gęsi w Polsce na tle globalnej skali produkcji a następnie skoncentrowała się na omówieniu charakterystyki rodziny *Parvoviridae*, mechanizmach replikacji, zmienności oraz epidemiologii i patogenezie choroby Derzsy`ego, profilaktyce i diagnostyce tej choroby.

W sumie we Wstępie oraz w Przebiegu Doświadczeń i Wynikach i Dyskusji Doktorantka wykorzystała 152 pozycje piśmiennictwa starannie dobranego tematycznie.

Cel pracy został sprecyzowany jasno, po długim wprowadzeniu uzasadniającym podjęcie badań. Cel pracy został przedstawiony w formie cząstkowej w 4 punktach opisujących poszczególne fazy pracy eksperymentalnej.

W rozdziale Materiały i Metody Doktorantka przedstawiła szczegółowo użyte materiały oraz procedury badawcze, co umożliwia dokładne śledzenie przebiegu doświadczeń. Pragnę też zwrócić uwagę na różnorodność metod, które Doktorantka stosowała w pracy, obejmujących techniki hodowli komórek *in vitro*, metody miareczkowania wirusów, seroneutralizacji, metody immunoenzymatyczne, western blot, oczyszczanie białek i inżynierii genetycznej takie jak PCR, LAMP, sekwencjonowanie, klonowanie.

Do istotnych osiągnięć tej pracy należy stwierdzenie wysokiej czułości i specyficzności metody LAMP (opracowanej w Zakładzie dla innego wirusa) do wykrywania i identyfikacji szczepów wirusa DD, stwierdzenie europejskiego pochodzenia polskich izolatów wirusa DD i jego rozprzestrzeniania w pobliskich farmach. Najważniejsze było opracowanie nowej techniki ELISA opartej na uzyskanym w systemie ekspresyjnym *E. coli* fragmencie antygeny VP3 wirusa DD która, jak się przypuszcza, znajdzie zastosowanie do badań serologicznych gęsi w hodowlach wielkostadnych. Opracowany test poddano wielostopniowej walidacji wykazując jego czułość, swoistość, skuteczność i powtarzalność. Ustalono także zgodność wyników uzyskanych z zastosowaniem innych opracowanych testów, w tym testu z użyciem całego winionu jako

antygeny (wartość kappa). Przebieg Doświadczeń i Wyniki ilustrowane są licznymi tabelami, wykresami i zdjęciami

Bez wątpienia silną stroną pracy jest także Dyskusja pozwalająca prześledzić uzyskane wyniki w świetle danych literaturowych. Jest ona wielowątkowa i dość szczegółowa. Autorka w tym rozdziale wykazała się swoją erudycją i umiejętnością krytycznej interpretacji wyników. Dyskusja, choć nie podzielona na podrozdziały ma kilka wątków. Pierwszy z nich dotyczy opracowania i zastosowania do wykrywania materiału genetycznego wirusa szybkiej metody LAMP. Próbkę zawierającą materiał genetyczny wirusa DD po zastosowaniu odpowiedniej polimerazy, barwnika SYBR Green i 3 par starterów, wykazują charakterystyczne świecenie w ultrafiolecie. Metoda ta jednak nie pozwala na różnicowanie szczepów wirusa. Autorka podkreśla jej czułość i porównuje z wynikami innych autorów stosujących tę metodę do detekcji innych patogennych wirusów. Następnie przechodzi do dyskusji na temat metod używanych do analizy filogenetycznej wirusa DD na podstawie genów kodujących VP1, VP2 i VP3, opisując istnienie rekombinantów wirusów GPV i MDPV. Następny wątek dyskutowany przez Autorkę dotyczy porównań różnych metod serodiagnostyki wirusa DD w tym seroneutralizacji, immunofluorescencji, testu immunoperoksydazowego oraz ELISA z zastosowaniem całego winionu jako antygeny i białek rekombinowanych w różnych systemach ekspresyjnych. Doktorantka zastanawia się także nad przyczyną niepowodzenia w otrzymaniu całego rekombinowanego białka VP3. Zakończoną sukcesem próbę otrzymania białek stanowiących fragmenty białka VP3 i optymalizacji testu ELISA opisuje dokładnie i porównuje z testem stosującym cały winion oraz podkreśla czułość i swoistość nowego testu.

Zastrzeżeń i uwag do recenzowanej pracy mam niewiele. Dotyczy to zbyt rozbudowanego omówienia zakończonych niepowodzeniem prób otrzymania całego antygeny VP3 wirusa DD w systemie ekspresyjnym *E. coli* i z kolei zbyt lakonicznego omówienia zakończonych powodzeniem otrzymania

rekombinowanych fragmentów tego antygeny. Brak jest podania struktury wektora, obrazów PCR izolowanych fragmentów genu i warunków uzyskania białek rekombinowanych, itp. Mam zastrzeżenia do Ryc 3, w której opisy nie odpowiadają użytym w tekście, a jest to istotne dla śledzenia wyboru primerów do metody amplifikacji DNA w warunkach stałej temperatury (LAMP). Poza tym drobne braki, np. w Fot. 5 , co to jest M, zła jakość Fot 12 czy brak wyjaśnienia dlaczego w Fot 8 jest kilka prążków reakcji PCR zamiast jednego.

Wymienione powyżej uwagi i wątpliwości mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na merytoryczną ocenę pracy. Praca lek wet. Karoliny Tarasiuk została bowiem prawidłowo zaplanowana, konsekwentnie realizowana i uwieńczona zarówno sporym wkładem w naszą wiedzę na temat rozprzestrzenienia wirusa DD jak i możliwych dróg jego transmisji, oraz opracowaniem dwóch metod do szybkiej diagnostyki molekularnej wirusa i do wykrywania oraz oznaczania ilościowego przeciwciał u gęsi po infekcji wirusem DD.

Praca kończy się prawidłowo pięcioma sformułowanymi wnioskami, które znajdują całkowite uzasadnienie w uzyskanych wynikach. Wyniki pracy oprócz aspektu poznawczego mają duży ładunek praktyczny, gdyż umożliwiają podjęcie zakrojonych na większą skalę badań nad sytuacją epidemiologiczną i diagnostykę molekularną wirusa choroby Derzsy'ego. Praca zaopatrzona jest w bardzo ładnie napisane streszczenie w języku polskim i angielskim, bardzo przydatne dla zrozumienia całości pracy.

Podsumowując całokształt rozprawy doktorskiej lek wet. Karoliny Tarasiuk stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa reprezentuje bardzo dobry poziom naukowy, wykazuje dogłębną znajomość problematyki i samodzielność myślenia oraz opanowanie przez Autorkę warsztatu naukowego. Praca doktorska przedstawia oryginalny materiał doświadczalny poszerzający stan naszej wiedzy na temat wirusa DD w Polsce. Dysponuje także dużym ładunkiem aplikacyjnym ze względu na opracowanie i walidację dwóch metod przydatnych

do diagnostyki wirusa choroby Derzsy`ego. Na tej podstawie uznaję, że rozprawa doktorska lek wet. Karoliny Tarasiuk z Zakładu Chorób Wirusowych Drobiu, PIWet-PIB w Puławach odpowiada w pełni wymogom ustawowym stawianym rozprawom na stopień doktora i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Kierownik Zakładu

Prof. dr hab. Mariyna Kaniak-Saarszeń