

Kraków 24.11.2014



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

**Ocena rozprawy doktorskiej**

**Pani magister Agnieszki Witek**

**pt. „Charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów wirusa polio izolowanych z próbek materiału środowiskowego w Polsce”.**

Małeńki wirus polio należący do rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Enterovirus*, jest tematem przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej. Można postawić sobie tutaj pytanie: czy choroba, za którą odpowiedzialny jest ten wirus: *poliomyelitis* (polio, nagminne porażenie dziecięce, choroba Heinego-Medina), która najprawdopodobniej nękała już ludzkość w latach 1430-1365 p.n.e. to choroba już tylko z przeszłości czy jednak powinniśmy o niej ciągle pamiętać. Dzięki wspaniałym naukowcom Jonasanowi Salk, Albertowi Sabin i Hilaremu Koprowskiemu i ich szczepionkom przeciw wirusowi polio globalny plan eradykacji *poliomyelitis* zakłada całkowitą eradykację choroby do 2018 roku. Czy to się uda? Choroba nadal występuje endemicznie w Afganistanie, Nigerii, Pakistanie. W Polsce ostatni przypadek *poliomyelitis* wywołany dzikim szczepem wystąpił w 1984 roku. W 1994 „wolną” od choroby były Ameryka Północna i Południowa, w 2000 Północny Pacyfik, w 2002 region europejski w tym Polska, a w 2014 roku Azja Południowo-Wschodnia. Ale czy dziki szczep wirusa, ewentualnie atenuowane szczepy żywych wirusów używanych do szczepionek (OPV) nie krążą dalej w środowisku? Czy nie powinno budzić obaw ryzyko rewersji szczepów atenuowanych - szczepionkowych do neurowirulentnego fenotypu? Niektóre kraje wycofują się ze stosowania szczepionki żywej OPV. Założeniem Światowego programu eradykacji jest nadzór nad ostrymi porażeniami wiotkimi u dzieci. W wielu krajach na świecie, w ramach działań wspierających program eradykacji prowadzi się stały monitoring ścieków w kierunku wirusa polio. Dzięki takim badaniom w 2013 roku udało się wykryć w Izraelu dziki szczep wirusa typu 1. W 2013 roku w Syrii wykryto również krążący dziki szczep, który wywołał porażenia u 37 osób. Jedne z pierwszych

Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Wirusologii  
p.o. Kierownik  
dr hab. Magdalena  
Kosz-Vnenchak, prof. UJ

ul. Czysta 18  
PL 31-121 Kraków  
Tel: 12 634 54 00  
Fax: 12 423 39 24

badania dotyczących wykrywania wirusów w wodach powierzchniowych i ściekach komunalnych przypisuje się Kleinowi (1957), który stwierdził, że to właśnie wirus polio utrzymywał się w próbkach wód rzecznych nawet przez 6 – 7 miesięcy. Potem Coin (1969) wykrył w wodach zanieczyszczonych inne enterowirusy. Dlatego wydaje się, że monitoring środowiska w kierunku wirusa polio jest w pełni uzasadniony, aby dokładniej badać możliwość krążenia wirusa w populacji. Ponieważ tego typu badania nie są prowadzone w Polsce, lukę tę postanowiła wypełnić p. mgr Agnieszka Witek przygotowując swoją pracę doktorską, którym celem była ocena obecności wirusów polio w ściekach komunalnych oraz ich charakterystyka.

Aby w pełni zrealizować cel sobie wytyczony Doktoranka posłużyła się wieloma metodami, które starannie opisuje w rozdziale Materiał i Metody. Stosowane metody są dobrze dobrane, z odpowiednimi kontrolami i często na wstępie badań, określeniem czułości wybranej metody (określenie czułości metody RT-PCR do identyfikacji materiału genetycznego enterowirusów, określenie metody izolacji polio wirusów w hodowli komórkowej) co bardzo pozytywnie oceniam.

Pierwszym etapem, przedstawionej mi do oceny pracy, była izolacja szczepów wirusa polio z próbek ścieków komunalnych. W tym celu p. mgr Agnieszka Witek musiała najpierw odpowiednio przygotować materiał pobrany z 14 miejskich oczyszczalni ścieków w Polsce. W ciągu roku zgromadziła 165 próbek, które stanowiły materiał do Jej dalszych badań. W rozdziale Materiał i Metody opisuje dokładnie proces przygotowania próbek nie podając jednak czy jest to Jej autorska metoda czy opiera się na dostępnych materiałach źródłowych. Dopiero w dyskusji odnajdujemy, że najprawdopodobniej jest to metoda rekomendowana przez WHO oraz stosowana również przez innych autorów (Zubriggen i wsp. 2008). Z tak przygotowanego materiału Doktorantka izolowała materiał genetyczny enterowirusów oraz izolowała wirusa polio w 3 typach linii komórkowych.

Metodą RT-PCR Doktorantce udało się wykryć sekwencje dla enterowirusów w 76,97% badanych próbek stosując sekwencje dla regionu 5'UTR. W materiałach i metodach nie znalazłam jednak materiałów

źródłowych skąd pochodzą użyte do R-TPCR startery. Może w tabeli na str. 25 dobrze byłoby je zamieścić. Co było powodem, że w pracy określa Pani wyłącznie ogólnie % enterowirusów w tym wirusów polio?

Kolejnym etapem pracy była izolacja wirusa polio w hodowlach komórkowych w linii L20- linia komórek mysich fibroblastów transfekowana sekwencjami ludzkiego receptora CD155 charakterystycznego wyłącznie dla wirusa polio, a nie innych enterowirusów, RD – linia komórek ludzkiego mięśniako- mięsaka oraz Caco-2 – linia wyprowadzona z ludzkich komórek nabłonkowych raka jelita grubego. Tą metodą udało się uzyskać pozytywny wynik w 31 analizowanych próbkach co stanowi, 18,78%.

Analizę serologiczną (serotypowanie) i molekularną (typowanie molekularne) wyizolowanych szczepów wirusa polio prowadzono z użyciem metody neutralizacji z zastosowaniem surowic poliklonalnych oraz z zastosowaniem metody RT-PCR z użyciem specyficznych starterów dla każdego z 3 typów szczepionkowego wirusa polio: Sabin typ 1, 2 i 3. Uzyskane wyniki pokazały, że wszystkie wyizolowane ze środowiska wirusy były pochodzenia szczepionkowego.

W kolejnych etapach pracy przystąpiono do dalszej, dokładniejszej charakterystyki wyizolowanych szczepów wirusa polio. Określając temperaturowrażliwość szczepów wirusa (fenotyp ts) udało się pokazać, że wyizolowane szczepy charakteryzowały się niską wirulencją (miano wyizolowanych szczepów namnażanych w temperaturze 40°C było znacznie niższe niż miano w temperaturze 37°C) co potwierdza, że wyizolowano wyłącznie szczepy szczepionkowe.

Ponieważ stosowanie w Polsce szczepionki atenuowanej OPV niesie ryzyko wystąpienia różnorodnych zmian molekularnych genomu wirusa obecnego w szczepionce i rewersji do szczepów o pełnej neurowirulencji Doktorantka postanowiła zbadać czy w wyizolowanych przez Nią szczepach wirusów zaszły jakieś zmiany. W tym celu wybrała dwa fragmenty genomu szczepów wirusa - fragment VP-1: sekwencję kodującą N-terminalny fragment białka kapsydu oraz sekwencję kodującą białko niestrukturalne – 3D polimerazę i zastosowała technikę RFLP analizując wzory pochodzące z

pocięcia amplifikowanych fragmentów DNA dla regionów VP-1 i 3Dpol stosując 4 enzymy restrykcyjne. Otrzymane profile pozwoliły na wykrycie rekombinacji w obrębie regionu 3Dpol w genomie 11 szczepów (w tym 9 - S3/S2, 1 -S3/S1 i 1- S1/S2) z 36 wyizolowanych.

Dodatkowo przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentów 5'UTR, VP1 oraz 3Dpol. Otrzymane sekwencje przy użyciu bazy danych BLAST porównywano z sekwencjami referencyjnymi szczepów wirusa polio Sabin - typ 1, 2 i 3, a molekularną i filogenetyczną analizę amplifikowanych sekwencji nukleotydowych prowadzono w oparciu o oprogramowanie BioEdit v 7.1.3 oraz Geneious 6.03. Na podstawie tych analiz udało się ustalić, że w obrębie sekwencji VP1 i 3Dpol nie obserwowano różnic w porównaniu z sekwencjami referencyjnych szczepów kontrolnych wirusa polio Sabin 1, 2 i 3, natomiast w obrębie sekwencji dla 3Dpol, 9 szczepów było rekombinantami pomiędzy dwoma serotypami wirusa, natomiast 1 zawierał fragmenty 3 serotypów. Analizowane metodą sekwencjonowania rekombinaty różniły się od rekombinantów z zastosowaniem metody analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych, co było podstawą do wyciągnięcia przez Doktorantkę wniosku, że sekwencjonowanie jest metodą bardziej precyzyjną.

Ponieważ zarówno atenuowane szczepy wirusa jak i dzikie gromadzą zmiany mutacyjne podczas namnażania w organizmie człowieka, a zmiany te przebiegają w stałym tempie, wskaźnik ten wykorzystywała Doktorantka do oszacowania wieku i odległości ewolucyjnej wyizolowanych szczepów. Opierała się o analizę zmian w sekwencjach regionu VP1 i na podstawie liczby zmian w tych sekwencjach ustaliła, że szacowany czas replikacji uzyskanych ze ścieków izolatów był krótszy niż 12 miesięcy.

Na podstawie wyników swoich eksperymentów, w rozdziale VI swojej pracy, Doktorantka podsumowuje swoje wyniki wysuwając najważniejsze wnioski z nich wypływające. Do najważniejszych obserwacji należy to, że na szczęście w próbkach wyizolowanych z wybranych ujęć ścieków w Polsce w 2011 roku nie zidentyfikowano dzikich ani neurowirulentnych szczepów wirusa polio, które mogły być pochodzenia szczepionkowego i powstałych na skutek spontanicznych zmian genetycznych, głównie w sekwencjach VP1.

Wyizolowano wyłącznie atenuowane szczepy wirusa polio, które są obecne w stosowanej w Polsce szczepionce OPV, co świadczy o krążeniu tych szczepów w środowisku i jak podkreśla Doktorantka zawsze istnieje ryzyko rewersji szczepów atenuowanych do fenotypu neurowirulentnego. Wyizolowano wprawdzie 10 szczepów (metodą sekwencjonowania), które były rekombinantami, ale wszystkie izolaty wykazywały wysoki stopień homologii (prawie 100%) z referencyjnymi szczepami kontrolnymi PV Sabin 1, 2, 3. Wszystkie wyizolowane szczepy nie krążyły jednak w populacji przez długi okres czasu. Doktorantka podkreśla jednak, że dalej istnieje konieczność immunizacji dzieci w celu zapewnienia długotrwałej odporności zbiorowej jak również ciągłego monitorowania środowiska, jak jest to praktykowane w innych krajach, jako dodatkowego uzupełnienia odpowiedniego nadzoru nad wirusem polio. Jakich rutynowych metod zdaniem Doktorantki powinno się użyć w tym zakresie? Czy wystarczy test RT-PCR w czasie rzeczywistym z sondami TaqMan amplifikujący i wykrywający sekwencje w obrębie VP1 wirusa polio, czy dodatkowo powinno się przeprowadzić sekwencjonowanie otrzymanych ampikonów?

Przeprowadzone badania niniejszej pracy pozwoliły również na potwierdzenie obserwacji innych autorów, że ścieki komunalne są bogatym źródłem wirusa polio, ale także innych enterowirusów i że w klimacie umiarkowanym zakażenia enterowirusami najczęściej występują w miesiącach letnich i jesiennych.

Czułość izolacji wirusa polio zwiększyło zastosowanie linii Caco-2 (o 53 %). Ale należy tutaj zaznaczyć, że po izolacji na tych komórkach pani mgr A. Witek dodatkowo wykonywała repasaż w hodowlach L20B, w których obserwacja specyficznego efektu cytopatycznego według WHO z 2004 roku jest uważane za „standard” w pozytywnej izolacji wirusa polio. Do poszukiwania specyficznych rekombinacji w izolowanych szczepach Doktorantka uważa, że metoda sekwencjonowania jest bardziej precyzyjna niż metoda oparta o analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych, z czym się całkowicie zgadzam. Dokładnie o różnicach pomiędzy tymi metodami pisze w ciekawie i bardzo dojrzałe przeprowadzonej Dyskusji.

Przedstawiona mi do recenzji praca napisana jest bardzo ładnie i obszernie. Ma typowy układ dla tego typu prac. Obejmuje 133 strony maszynopisu i jest dobrze ilustrowana (41 rycin, 19 tabel). Wstęp pracy liczący 16 stron wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Opisuje w nim Doktorantka budowę, replikację, oraz patogenezę wirusa polio. Następnie charakteryzuje dostępne szczepionki przeciw wirusowi polio, zarówno IPV jak i OPV, zwracając uwagę na genetyczne determinanty neurowirulencji i atenuacji wirusa polio. Następnie porusza problem zmienności wirusa, przedstawia program eradykacji wirusa i podkreśla, że według rekomendacji WHO istotnym jego uzupełnieniem jest monitoring krążenia wirusa w populacji ludzkiej poprzez badanie próbek materiału środowiskowego, które mogą być skażone odchodami ludzkimi. W II rozdziale pracy krótko podaje cele swojej pracy. Opisy materiałów i metod są ogólnie poprawne i umożliwiają ewentualne powtórzenie doświadczeń, chociaż brakuje mi w nich czasem źródeł literaturowych, na których być może Doktorantka się opierała. Przebieg doświadczeń i uzyskane wyniki, które już zostały omówione wcześniej nie budzą zastrzeżeń. Dyskusja przeprowadzona jest bardzo rzeczowo, a wnioski czytelne. Na końcu zamieszczone są bardzo obszerne (5-cio stronicowe) streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo liczące 177 pozycji. Pracę zamykają wykazy tytułów rycin, tabel i skrótów.

Ogólnie przedstawiona mi do recenzji praca jest bardzo cenna merytorycznie. Doświadczenia mające na celu wykrycie i scharakteryzowanie molekularne wirusów polio w ściekach na terenie Polski, dobrze zaplanowane, bardzo dokładnie wykonane. Należy również podkreślić, że są to pierwsze tego typu badania prowadzone w Polsce, a w moim przekonaniu konieczne, pomimo ogłoszonej eradykacji wirusa. Wszystko to wpływa na wysoką ocenę recenzowanej przeze mnie pracy, na podstawie której mogę również sądzić, że Doktorantka jest w pełni dojrzałym naukowcem, zdolnym do prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Witek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Magdalena Kosz-Vnenchak prof. UJ

