



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ  
INSTYTUT MIKROBIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Zakład Wirusologii i Immunologii  
Akademicka 19, 20-033 Lublin, fax: (4881) 537 59 59; tel: (4881) 537 59 43

Prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska  
Zakład Wirusologii i Immunologii  
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii UMCS

Lublin 20.11.2014

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Witek**

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

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierownictwem naukowym Pani Profesor dr hab. Bogumiły Litwińskiej w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie.

Rekomendowane przez WHO monitorowanie krążenia wirusa polio w materiale środowiskowym (ścieki komunalne) dostarcza cennych informacji o charakterze epidemiologicznym i prognostycznym na danym obszarze geograficznym. Jest to szczególnie istotne ze względu na stosowanie szczepionki OPV, które niesie ryzyko rewersji szczepów szczepionkowych wirusa polio do fenotypu neurowirulentnego. Szczepy VDPV mogą być przyczyną zachorowań w populacjach niedostatecznie uodpornionych. W przeciwieństwie do wielu krajów, w Polsce nie wykonywano dotychczas badań środowiskowych w kierunku obecności wirusa polio, zarówno jego szczepów dzikich, jak i pochodzenia szczepionkowego oraz ich rewertantów. Badań tych, po raz pierwszy w Polsce, podjęła się Pani mgr Agnieszka Witek.

## **Ocena poprawności struktury rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Witek ma typowy układ dla pracy eksperymentalnej i mieści się na 133 stronach zawierających: Wstęp, Cel pracy, opis Materiałów i Metod, Wyniki, Dyskusję, najważniejsze Wyniki i Wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Piśmiennictwo oraz Wykazy rycin, tabel i skrótów. Moim zdaniem wykaz skrótów stosowanych w pracy powinien poprzedzać jej wstęp. Zachowane zostały odpowiednie proporcje między poszczególnymi rozdziałami pracy.

## **Ocena merytoryczna rozprawy**

Szesnastostronicowy **Wstęp** przedstawia najważniejsze informacje dotyczące wirusa polio, patogenezę choroby, stosowanych szczepionek oraz programu eradykacji *poliomyelitis*. W tym miejscu mgr Agnieszka Witek opisuje również wyniki badań materiału środowiskowego przeprowadzonych w różnych rejonach świata, ze szczególnym uwzględnieniem ognisk epidemiologicznych i wykrywalności zarówno dzikich szczepów wirusa polio typu 3, jak i neurowirulentnych rewertantów. Rozdział ten, napisany dobrym językiem, stopniowo wprowadza czytelnika w problematykę i przyczynę podjętych przez Autorkę badań - mam jednak dwie uwagi. Pierwsza dotyczy mechanizmu transportu RNA wirusa do cytoplazmy komórki – mgr Agnieszka Witek przedstawia istniejące na ten temat hipotezy w oparciu o piśmiennictwo z lat 1962-2002. Jednak w roku 2007 ukazała się praca (B.Brandenburg et al., PLOS Biology, *Imaging poliovirus entry in live cells*) dokumentująca penetrację wirusa wyłącznie drogą endocytozy. Druga uwaga związana jest z próbą odpowiedzi na pytanie, dlaczego szczepionka przeciwko typowi 3 PV jest bezpieczna, skoro mutacja punktowa nukleotydu 472 (a nie 471 - str. 14) wirusa szczepionkowego nie prowadzi, czy też raczej nie gwarantuje, obniżenia zjadliwości tego szczepu. Oprócz przedstawionych wyjaśnień Autorka nie rozważa roli odpowiedzi immunologicznej, zwłaszcza IFN $\alpha/\beta$ . Rewersja szczepionkowego PV3 występuje znacznie częściej, niż wskazuje na to odsetek zachorowań wśród zaszczepionych. Przyczyną tego jest niewłaściwa/niepełna odpowiedź układu immunologicznego. Zagadnienie to jest dość dobrze opisane w pracy, którą mgr Agnieszka Witek także cytuje (V.R. Racaniello, *Virology* 2006).

**Cel pracy** jest sformułowany jasno i realizowany poprzez wykonanie 4 precyzyjnie opisanych zadań, dobrze wpisujących się w temat rozprawy.

Rozdział **Materiały i Metody** został opracowany bardzo starannie i zredagowany w sposób umożliwiający powtórzenie każdego doświadczenia. Miejsca pobierania próbek środowiskowych wybrane zostały w oparciu o różną liczbę mieszkańców i pokrywają większość obszaru Polski. Dla pełniejszego obrazu sytuacji w Polsce brakuje mi bodaj po jednym ośrodku zlokalizowanym na zachodzie i północno-wschodnim krańcu, ale rozumiem, iż Doktorantka włożyła ogromny wysiłek organizacyjny i logistyczny, aby zebrać i opracować materiał z 14 oczyszczalni zlokalizowanych w różnych rejonach kraju – łącznie 165 próbek. Na podkreślenie zasługuje fakt niezwyklej dbałości o jakość prowadzonych badań - Autorka zaplanowała i wykonała doświadczenia sprawdzające czułość stosowanych metod, a ich rezultaty świadczą o trafnie dobranej metodyce i gwarancji właściwej interpretacji przedstawionych w pracy wyników. Pod względem metodycznym mgr Agnieszka Witek wyróżnia się znajomością wielu technik, począwszy od umiejętności pracy z materiałem środowiskowym, hodowlami komórkowymi i wirusami, po techniki immunologiczne, molekularne i inżynierii genetycznej, co czyni z Niej wszechstronnego i wartościowego pracownika naukowego.

**Opis wyników** stanowi najobszerniejszą część pracy i zawarty został na 44 stronach. W blisko 77% zgromadzonych próbkach ścieków komunalnych zidentyfikowano materiał genetyczny enterowirusów, zaś dodatni wynik izolacji zakaźnych cząstek stwierdzono w przypadku 19% próbek, Co prawda do izolacji poliovirusów WHO rekomenduje stosowanie dwu linii komórkowych (L20B oraz RD), jednak jak wykazała Doktorantka użycie komórek linii Caco-2 znacząco zwiększa czułość tej izolacji.

Charakterystyka izolatów (serotypowanie, badanie termowrażliwości, typowanie molekularne) wykazała obecność wszystkich trzech typów wirusa polio, którego źródłem był materiał szczepionkowy. Ze względu na wysoką częstość rekombinacji wirusa polio (zwłaszcza w tak sprzyjających warunkach jak stosowanie OPV) Autorka dokonała molekularnej charakterystyki uzyskanych izolatów. W tym celu wykorzystwała metody analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) dwóch- oraz sekwencjonowania trzech regionów genomu. Wyniki badań ujawniły wysoki stopień homologii sekwencji nukleotydowych regionów 5'UTR oraz VP1 ze szczepami referencyjnymi PV Sabin 1-3. Natomiast uzyskane profile restrykcyjne RFLP oraz analiza sekwencyjna regionu 3D<sub>pol</sub> wskazały na istnienie rekombinantów pomiędzy różnymi serotypami wirusa polio. Skoro, wg zaleceń WHO, do stwierdzenia obecności fenotypu neurowirulentnego VDPV wystarcza określenie % zmian w regionie VP1, jakie znaczenie (oprócz poznawczego) w monitoringu

może mieć analiza molekularna regionów 5'UTR i 3D<sub>pol</sub> wirusów polio izolowanych ze ścieków komunalnych?

Wyniki doświadczeń zostały skrupulatnie udokumentowane poprzez przedstawienie poprawnie opisanych tabel, wykresów i rycin, do których w tekście zostały umieszczone odnośniki.

Zawartą na 10 stronach zwięzłą **Dyskusję** rozpoczyna uzasadnienie badania środowiska w kierunku obecności i pochodzenia wirusa polio. Autorka przytacza liczne przykłady krajów rutynowo prowadzących taki monitoring. Dyskusja prowadzona jest w sposób uporządkowany, a konfrontacja wyników badań własnych z bogatym i odpowiednio dobranym piśmiennictwem świadczy o sprawnym i pewnym poruszaniu się Autorki w realizowanej tematyce. Ponadto, Doktorantka ma świadomość pewnych ograniczeń stosowanych metod, potrafi je dostrzec oraz wyjaśnić powstałe w związku z tym różnice w wynikach analiz.

Rozdział **Najważniejsze Wyniki i Wnioski** stanowi kwintesencję przeprowadzonych badań oraz wynikające z nich jasno sformułowane wnioski, ściśle odpowiadające celom pracy.

**Bibliografia** obejmuje 177 pozycji, oprócz adresów internetowych ujęte są prace anglojęzyczne z szerokiego przedziału czasowego (1940-2012), co jednak jest uzasadnione tematyką pracy.

### **Ocena strony edytorskiej rozprawy**

Praca jest przejrzysta, napisana poprawnym językiem z nielicznymi błędami typograficznymi (np. na str.14 zamiast „mutacja punktowa 471 nukleotydu” powinno być „mutacja punktowa 472 nukleotydu”, czy na str. 15 zamiast *VPDF – VDPV*). W pozycji piśmiennictwa nr 136 brakuje roku opublikowania pracy.

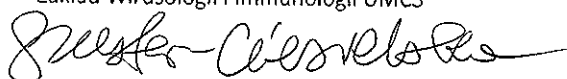
### **Podsumowanie recenzji**

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi **pierwsze w Polsce** opracowanie o charakterze epidemiologicznym dotyczące krążeń w środowisku wirusa polio. Autorka postawiła jasne cele, które sprowadzały się do izolacji, identyfikacji i dogłębnej charakterystyki pozyskanych szczepów wirusowych. W realizacji tych celów stosowała metody biologiczne, immunologiczne, a także techniki molekularne. Mimo, iż w próbkach środowiskowych Pani mgr Agnieszka Witek nie wykazała obecności szczepów dzikich, czy nawet VDPV, to

doświadczenia innych krajów Europy wynikające z zastosowania różnych szczepionek (IPV/OPV), odsetka osób zaszczepionych czy intensywnej migracji turystycznej wskazują, że w Polsce taki monitoring również jest uzasadniony. Pragnę nadmienić, iż przedstawione w recenzji nieliczne uwagi nie podważają w żaden sposób merytorycznej wartości pracy, są jedynie wskazówką do przygotowania jeszcze lepszej publikacji.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona przez Panią mgr Agnieszkę Witek rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14.03.2003 roku (DZ.U. Nr 13.65.595 z dnia 16.04.2003) i wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zakład Wirusologii i Immunologii UMCS



prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska