

Prof. dr hab. Tadeusz Frymus
Kierownik Zakładu Chorób Zakaźnych
Katedra Chorób Małych Zwierząt z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

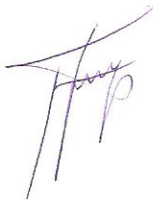
27.10.2014.

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Moniki Olech
CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA LENTIWIURUSÓW MAŁYCH
PRZEŻUWACZY ORAZ DIAGNOSTYKA SEROLOGICZNA ZAKAŻEŃ
TYMI WIRUSAMI

Lentiwirusy małych przeżuwaczy są bardzo ważnymi zarazkami w chowie owiec i kóz w większości rejonów świata, także w Polsce. Wywołują one różne postacie dwóch chorób: maedi-visna oraz zapalenie stawów i mózgu kóz. Ta pierwsza była dawniej przypisywana tylko owcom, druga – kozom, ale od pewnego czasu podział ten się zatarł ze względu na niemal identyczne właściwości czynnika zakaźnego wywołującego te choroby.

Czynnik zakaźny to typowy retrowirus z rodzaju *Lentivirus*, a więc wywołujący tzw. powolne zakażenia wirusowe. To właśnie dla tego zarazka pojęcie powolnych zakażeń wirusowych zostało wprowadzone po wybuchu w 1933 roku ogromnej epidemii wśród owiec na Islandii. W jej wyniku ponad 100 000 zwierząt padło, a dalsze 600 000 ubito, aby w końcu w połowie lat 1960-tych uwolnić Islandię od tego zarazka. Przebieg zakażenia u owiec i kóz jest typowy dla zakażenia lentiwirusowego: bardzo powolny rozwój, dużo osobników zakażonych bezobjawowo w stosunku do tych wykazujących objawy chorobowe, jeśli jednak już one wystąpią, to w wyniku wyniszczającej, bardzo wolno nasilającej się choroby następuje niechybna śmierć. Straty ekonomiczne są więc mocno ukryte – brakowanie wskutek wyniszczenia, spadek płodności, wydajności mlecznej i innej. Kto nie chce, może przez bardzo długi czas nie zauważać tej choroby w swoim stadzie. Dlatego w zwalczaniu tak ważna jest diagnostyka laboratoryjna pozwalająca wcześniej wykryć zakażenie, w szczególności jej najtańsza, nadająca się do masowych badań wersja – badania serologiczne.

I właśnie zwiększeniu czułości diagnostyki serologicznej poświęcone były badania mgr Moniki Olech przedstawione w niniejszej rozprawie. Zagadnienie więc bardzo ważne dla praktyki weterynaryjnej, ale niełatwe ze względu na ogromną zmienność retrowirusów, także antygenową. Tej zmienności musiała więc najpierw poświęcić pierwszą część swoich badań. Postawiła tu hipotezę badawczą, iż krążące w Polsce szczepy lentiwirusów małych przeżuwaczy tak dalece się różnią antygenowo od zarazków używanych jako antygeny w



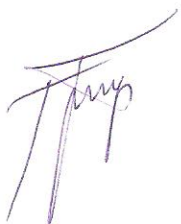
dotychczasowych testach diagnostycznych, że odbija się to znacząco na ich czułości, a więc część zakażeń pozostaje nierozpoznana.

Tak więc pierwszym celem tej rozprawy było zbadanie stopnia zmienności genów kodujących główne determinanty antygenowe (*gag* i *env*) lentiwirusów izolowanych od owiec i kóz z różnych rejonów Polski i porównanie ich z dwoma szczepami najczęściej używanymi jako antygeny w dotychczasowych diagnostycznych zestawach ELISA - MVV-K1514 (genotyp A1) oraz CAEV-Cork (genotyp B1). W tych badaniach doktorantka zastosowała analizę migracji heterodupleksów (HMA), a wyniki potwierdziła sekwencjonowaniem fragmentów genomów i ich analizą filogenetyczną. Wybór metod należy określić jako zdecydowanie trafny - HMA jest dość powszechnie w wirusologii stosowaną techniką wykrywania mutacji, a sekwencjonowanie jest „złotym standardem” takich badań. Analiza heterodupleksów 39 izolatów ujawniła ich dużą różnorodność genetyczną, a potwierdziła to analiza filogenetyczna 29 terenowych próbek. Badania te ujawniły obecność wśród przebadanych izolatów sześciu typów zarazka - B1, B2, A1 oraz trzech nowych typów, A12, A13 i A16. Powyższymi metodami tzw. „epidemiologii molekularnej” doktorantka potwierdziła krążenie lentiwirusów pomiędzy owcami a kozami. Szczepy dawniej uważane za „owcze” występowały bowiem często u kóz i odwrotnie. Zdarzały się też zakażenia jednego zwierzęcia szczepami „owczymi” i „kozimi” według dawnej nomenklatury.

Kolejnym etapem badania zmienności tych wirusów była analiza sekwencji aminokwasowych najistotniejszych antygenowo fragmentów białka Gag (MA/CA) i glikoproteiny powierzchniowej gp135 (SU) izolatów terenowych oraz szczepów referencyjnych (typy A1 i B1). Odpowiednie sekwencje zostały zamplifikowane, wklonowane do wektora i zsekwencjonowane. Analiza ta wykazała, że krajowe izolaty typu A12 i A13 mogą wykazywać immunologiczne pokrewieństwo między epitopami białka Gag oraz, że białko SU5 wydaje się być dobrym kandydatem na antygen do serotypowania wirusów kóz i owiec, gdyż indukuje ono rodzaj typowo swoistej odpowiedzi immunologicznej. Ta część badań potwierdziła więc hipotezę o krążeniu wśród małych przeżuwaczy wariantów antygenowych lentiwirusów, co obniża czułość testów diagnostycznych bazujących na jednym tylko genotypie.

W ten sposób doktorantka wypracowała podstawy do realizacji drugiego celu rozprawy, którym było otrzymanie oczyszczonych, rekombinowanych białek SU1/Gag/SU5 lentiwirusów małych przeżuwaczy reprezentujących różne typy genetyczne zarazków, to znaczy nie tylko A1 i B1, ale także B2 oraz A13. By to uzyskać odpowiednie fragmenty genów zamplifikowała metodą nested PCR i na ich bazie wyprodukowała rekombinowane plazmidy, których prawidłowość potwierdziła sekwencjonowaniem. Ekspresja rekombinowanych białek następowała w szczepach *E. coli*, a uzyskane produkty oczyszczano chromatograficznie.

I teraz doktorantka mogła przystąpić do trzeciego celu rozprawy, jakim było opracowanie testów ELISA do wykrywania przeciwciał przeciw lentiwirusom małych przeżuwaczy z użyciem wyprodukowanych w poprzednim etapie pracy rekombinowanych białek reprezentujących różne typy genetyczne zarazków i sprawdzenie przydatności diagnostycznej tych testów wobec surowic referencyjnych oraz przez porównanie ich z dotychczasowymi testami komercyjnymi. Surowice referencyjne pochodziły od naturalnie zakażonych owiec i kóz bądź od osobników niezakażonych, których status serologiczny potwierdziła wcześniej handlowymi testami ELISA, a obecność prowirusowego DNA testem nested PCR. Surowice zostały bardzo starannie dobrane, jako że sprawa ta ma kluczowe znaczenie w standaryzacji każdego testu serologicznego. Mając na uwadze dużą zmienność lentiwirusów surowice pochodziły i od owiec i od kóz, ponadto nie tylko z Polski, ale i z Francji i wszystkie zostały przebadane trzema handlowymi testami ELISA. Do dalszych prac surowicę uznawano za dodatnią, gdy wszystkie trzy testy dały z nią wynik pozytywny, a za ujemną, gdy we wszystkich trzech wynik był negatywny. W ten sposób doktorantka przygotowała sobie do dalszych badań 939 surowic referencyjnych (300 dodatnich i 639 ujemnych). W metodzie western blotting wszystkie surowice dodatnie reagowały ze wszystkimi czterema rekombinowanymi białkami, a surowice ujemne – z żadnym, co wykazało z jednej strony immunoreaktywność wyprodukowanych przez autorkę białek, a z drugiej – dużą swoistość diagnostyczną tych antygenów. Następnie doktorantka przeszła do optymalizacji warunków testu ELISA. Używając pulowanej surowicy dodatniej i pulowanej ujemnej dobrała wedle powszechnie przyjętych zasad optymalne rozcieńczenia antygeny, surowicy oraz koniugatu. W kolejnym etapie walidacji testu zbadała 939 swoich surowic referencyjnych trzema testami ELISA z wykorzystaniem jako antygenów, rekombinowanych białek reprezentujące typy genetyczne wirusa B1, B2, A1 i A13. Zgodnie z powszechnie przyjętymi standardami wykreśliła krzywe ROC i obliczyła dla każdego testu wartość progową poszukując takiej, przy której test ma najwyższą czułość przy największej swoistości. W odniesieniu do tego zestawu surowic testy miały czułość od 77 do 96% i swoistość od 94,2 do 97,6%, a także ich potencjał różnicowania surowic dodatnich od ujemnych okazał się bardzo przyzwoity. I wreszcie jakby ukoronowaniem badań nad opracowaniem nowych testów ELISA z użyciem rekombinowanych białek jako antygenów było ich porównanie z jednym z powszechnie stosowanych testów handlowych poprzez równoległe przebadanie 249 surowic od 194 owiec z 13 stad i 55 kóz z 5 stad. Test komercyjny ujawnił wśród nich 32 surowice dodatnie (12,8%), a opracowany przez doktorantkę test białkiem rekombinowanym reprezentującym typ genetyczny A13 – aż 37 surowic dodatnich (14,8%), test z białkiem reprezentującym typ A1 i B2 – 26 (10,4%), a test z białkiem reprezentującym typ B1 jedynie w 6 surowic dodatnich (2,4%). Natomiast, co najważniejsze, spośród 217 próbek ujemnych w



teście komercyjnym aż 16 (6,4%) okazało się dodatnich w przynajmniej jednym z testów ELISA opracowanych przez doktorantkę.

W ten sposób mgr Monika Olech wykazała, że testy ELISA zawierające antygeny jednego tylko szczepu lentiwirusów małych przeżuwaczy nie wykrywają przeciwciał skierowanych przeciw niektórym innym szczepom tego zarazka, co ewidentnie obniża ich czułość. Pokazała także, iż można czułość takiej diagnostyki znacznie zwiększyć wykorzystując jako antygen mieszaninę rekombinowanych białek reprezentujących różne typy genetyczne, w szczególności uwzględniając warianty wirusa dominujące w badanej populacji.

Ze swoich badań doktorantka wyciągnęła 4 w pełni uprawnione wnioski, z których jedynie drugi potwierdza to, co było znane od dawna, natomiast pozostałe 3 zawierają elementy nowatorskie wypływające z badań własnych.

Praca doktorska mgr Moniki Olech jest bardzo dobrze zaplanowana i wykonana, a rozprawa dobrze, prawie bezbłędnie, napisana. Zauważyłem tylko kilka pomyłek literowych, np. na str. 69 powinno być „wirusowe RNA” albo „prowirusowe DNA”, natomiast nie „wirusowe DNA”, a na str. 72 powinno być chyba 939 zamiast 936 surowic. Na str. 21 jest błąd w pisowni angielskiego słowa „challenge”. Ponadto tak bardzo potrzebny czytelnikowi wykaz skrótów użytych w rozprawie powinien zdecydowanie być ułożony alfabetycznie. Trudno się też zgodzić ze stwierdzeniem autorki na str. 18, że „w celu bezpośredniego stwierdzenia obecności wirusa wykorzystywana jest metoda PCR... wykrywająca zarówno prowirusowe DNA jak i RNA wirusa”, gdyż istnieją wcale nierzadkie sytuacje, i to zwłaszcza przy zakażeniach retrowirusowych, kiedy jest prowirusowe DNA, a wirionów nie ma, albo nawet może być rzadziej sytuacja, kiedy jest jeszcze nawet wirusowe RNA, a wirionów już nie ma. Tak więc – przynajmniej dla mnie – bezpośrednie stwierdzenie wirusa to ewentualnie jego rozpoznanie w mikroskopie elektronowym, (choć może być niekompletny, a więc niezaraźliwy), czyli w zasadzie istnieje tylko jedna metoda bezpośredniego wykazania w badanym materiale obecności kompletnego, zaraźliwego wirusa – jego izolacja na hodowli komórkowej czy innym żywym układzie. Nota bene, metoda ta we współczesnej wirusologii prawie poszła w zapomnienie – zastąpiona właśnie przez PCR – stąd nie dziwię się zbytnio, że i autorka na to tak patrzy.

Powyższe uwagi nie mają oczywiście znaczenia dla merytorycznej oceny rozprawy doktorskiej mgr Moniki Olech. Nie mam do tej rozprawy zastrzeżeń merytorycznych, wręcz przeciwnie – oceniam tę pracę bardzo pozytywnie. Ma jasno postawione cele, kolejno wypływające jeden z drugiego i przejrzysty logiczny układ doświadczeń. Łączy w sobie zarówno aspekty poznawcze (poznanie typów lentiwirusów małych przeżuwaczy aktualnie krążących wśród polskich owiec i kóz), jak i aspekty aplikacyjne (zwiększenie czułości diagnostyki serologicznej tych zakażeń, co ułatwi i skróci eliminowanie tego zakażenia z populacji naszych owiec i kóz). Jest to dużą zaletą rozprawy, gdyż doktoraty w naukach weterynaryjnych powinny być ukierunkowane także na

potrzeby praktyki. Metody zastosowane w tej pracy są poprawne i należą do najnowocześniejszych technik molekularnych, a podkreślić należy wielość metod użytych w tej pracy.

Biorąc pod uwagę te osiągnięcia stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Olech „CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA LENTIWIURUSÓW MAŁYCH PRZEŻUWACZY ORAZ DIAGNOSTYKA SEROLOGICZNA ZAKAŻEŃ TYMI WIRUSAMI” spełnia wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

