

Dziekanat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 15.05.2014r.
L.dz. nr 17/2014

Warszawa, 05.05.2014

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Łukasza Rąbalskiego
pt. „Zastosowanie technik elektroforetycznych rozdziału jednoniciowego DNA
oraz Real-time PCR (qPCR) do detekcji i różnicowania zakażeń wirusem
rzekomego pomoru drobiu”
(Promotor: prof. dr hab. Bogusław Szewczyk)

Praca doktorska przedstawiona do recenzji została przygotowana przez Pana mgr Łukasza Rąbalskiego, pod kierunkiem promotora Pana prof. dr hab. Bogusława Szewczyka. Praca doktorska opiera się na dwóch publikacjach, które ukazały się w wysoko notowanych czasopismach naukowych, w których mgr Rąbalski jest odpowiednio drugim i pierwszym autorem. Opracowania są poprzedzone obszernym wprowadzeniem do tematyki pracy. Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością zagadnień, którym się poświęcił.

Tematyka pracy obejmuje badania nad opracowaniem metod diagnostyki zakażeń wirusem rzekomego pomoru drobiu (NDV). Zakażenia tym wirusem stanowią jedno z największych zagrożeń dla hodowli drobiu na świecie. Problem stanowi zmienność szczepów NDV, która umożliwia uzyskanie zjadliwości przez szczepy uznawane za nie zjadliwe, w wyniku dwóch mutacji punktowych w genie kodującym białko F. Szczepy, które uległy uzjadliwieniu np. w Australii występują również w Azji i Europie i również stanowią realne zagrożenie jeśli dojdzie do wymienionych mutacji. Autor we wstępie bardzo szczegółowo opisał biologię paramyksowirusów, epidemiologię NDV oraz zwalczanie choroby wywoływanej przez wirus. Mało jest natomiast informacji na temat patogenezы rzekomego

pomoru drobiu a brak zupełnie danych na temat dawniej i obecnie stosowanych metod diagnostyki choroby. Autor nie ustrzegł się też przed użyciem żargonowych określeń (np. „przyczepienie się sond”, streszczenie, strona 2).

Obecnie diagnostyka zakażeń NDV opiera się na wykrywaniu wirusa metodą RT-PCR lub RT real time PCR. Zastosowanie sond molekularnych, np. TaqMan, w real time PCR, jak w przypadku innych wirusów o genomach zbudowanych z pojedynczej nici RNA napotyka trudności wynikające z często pojawiających się mutacji genetycznych uniemożliwiających hybrydyzację sond co jest powodem uzyskiwania zafałszowanych wyników.

Pan mgr Rąbalski zaproponował rozwiązanie zmniejszające zagrożenie uzyskaniem wyników fałszywie ujemnych poprzez zastosowanie metody real time PCR z wykorzystaniem fluorescencyjnego barwnika interkalującego SYBR Green. Publikacja na ten temat: „Detection and differentiation of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus by real-time PCR” została zamieszczona wysoko notowanym czasopiśmie Journal of Virological Methods. Inaczej niż w teoretycznie bardziej specyficznych metodach opartych na wykorzystaniu sond molekularnych, wybrana przez doktoranta metoda umożliwia potwierdzanie swoistości uzyskanego produktu reakcji PCR w wyniku oznaczenia temperatury dysocjacji fragmentu DNA, po jej zakończeniu. Na uwagę zasługuje opracowanie pary zdegenerowanych starterów PCR umożliwiających amplifikację zjadliwych jak i niezjadliwych szczepów NDV.

Przeprowadzone badania wykazały, że produkty PCR uzyskane w wyniku amplifikacji szczepów wysoko lub nisko patogennych ulegają dysocjacji w różnych temperaturach. Na podstawie badania 18 szczepów NDV (w tym 14 szczepów polskich), należących do czterech podgrup genetycznych, poszczególne z nich przyporządkowano do grupy A - niskopatogennej (temperatura topnienia w zakresie 81,63-82,35 C) lub grupy B - wysoce patogennej (temperatura topnienia w zakresie 85,22-87,52 C). Opracowaną metodę porównano do metody referencyjnej wykorzystując materiał od trzech ptaków doświadczalnie inokulowanych szczepem szczepionkowym. Wyniki tych badań porównawczych potwierdziły wysoką czułość opracowanej metody określoną na 2×10^2 kopii plazmidu zawierającego amplifikowany gen.

Niezbyt uzasadnione wydaje się wykorzystanie wirusa klasycznego pomoru świń w badaniu specyficzności opracowanej metody ponieważ wirus ten nie zakaża ptaków. Określanie temperatury topnienia produktów real time PCR jest bardzo użyteczne, szczególnie w odniesieniu to detekcji zmiennych matryc. Należy jednak pamiętać, że na temperaturę topnienia wpływa również skład buforu reakcyjnego w związku z czym

każdorazowo przy zmianie odczynników czy aparatu do PCR należy przeprowadzić powtórna walidację metody. Z praktycznego punktu widzenia lepsze wydaje się również wykonanie odwrotnej transkrypcji w tej samej próbówce co PCR. Z całą pewnością wykorzystanie SYBR Green umożliwia znaczne obniżenie kosztów real time PCR.

W drugiej publikacji zamieszczonej w BioMed Research International: „Detection of Newcastle Disease Virus Minor Genetic Variants by Modified Single-Stranded Conformational Polymorphism”, Pan mgr Rąbalski opisał metodę detekcji i różnicowania szczepów w sytuacji koinfekcji różnymi wariantami wirusa rzekomego pomoru drobiu. Technika, którą Autor zastosował w badaniach polega na ocenie ruchliwości elektroforetycznej pojedynczej nici DNA w żelu poliakrylamidowym, w zmiennej temperaturze, zależnej od zmian w sekwencjach nukleotydowych „MSSCP” (ang. Multi temperature single-stranded conformational polymorphism).

Dzięki tej metodzie jest możliwe nie tylko różnicowanie poszczególnych szczepów NDV ale również ich identyfikacja w próbkach zawierających kilka z nich. Umożliwia to również śledzenie rozprzestrzenienia szczepów w populacji oraz do pewnego stopnia monitorowanie ich zmienności genetycznej. Wynikiem analizy są specyficzne dla danego szczepu (lub ich mieszanek) wzory prążków. Autor zaprojektował zupełnie nowy zestaw starterów, które tym razem wykorzystał już na etapie odwrotnej transkrypcji, co usprawnia procedurę diagnostyczną i ogranicza możliwość kontaminacji.

W publikacji opisano dwie symulacje: pierwsza dotyczyła koinfekcji różnymi szczepami, a druga zakażeń z pojawiającymi się quasispecies. Obydwa przypadki wskazały jednoznacznie na przydatność opracowanej metody. Cenną inicjatywą Autora jest również propozycja stworzenia banku wzorów elektroforetycznych poszczególnych szczepów NDV. Opracowana metoda jest nowatorska i posiada duży potencjał aplikacyjny lecz jak Autor podkreśla wymaga precyzyjnej optymalizacji i walidacji warunków elektroforezy.

Podsumowując, w pracy opisano opracowanie dwóch różnych, wzajemnie się uzupełniających, cennych metod o dużych możliwościach aplikacji w laboratoriach diagnostyki chorób ptaków. Autor precyzyjnie nakreślił cele swoich badań i sprawnie je osiągnął, uzyskując dwie wartościowe publikacje w czasopiśmie naukowym o zasięgu światowym, które należy mieć nadzieje zostaną docenione dużą liczbą cytowań. Autor wykazał się umiejętnością planowania i realizacji badań oraz interpretacji uzyskanych wyników.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 11 Ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych (Dz.U. nr 65/90 poz. 386). Na

podstawie powyższego wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Rąbalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Tomasz Stadejek