



# POLITECHNIKA GDAŃSKA

dr hab. inż. Paweł Sachadyn  
Katedra Mikrobiologii  
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej  
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk  
email: psach@pg.gda.pl  
tel. 58 3471605

Gdańsk, 14 maja 2014

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr Dawida Nidzworskiego pt. „Nowe metody wykrywania wirusa grypy i rzekomego pomoru drobiu”**

Rozprawa Doktorska mgr Dawida Nidzworskiego pt. „Nowe metody wykrywania wirusa grypy i rzekomego pomoru drobiu” wykonana w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Prof. Boguława Szewczyka dotyczy nowych rozwiązań w diagnostyce molekularnej wirusów. Praca obejmuje opracowanie systemów PCR służących do szybkiej i czulej detekcji wirusów grypy i rzekomego pomoru drobiu oraz konstrukcji biosensora opartego na Elektrochemicznej Spektroskopii Impedancyjnej do detekcji wirusa grypy. Znaczenie podjętego w pracy problemu obrazują szacunki Światowej Organizacji Zdrowia: miliard ludzi rocznie ulega infekcji wirusem grypy, a około 500 tysięcy ludzi umiera z powodu powikłań pogrypowych.

Rozprawa doktorska mgr Dawida Nidzworskiego obejmuje pięć publikacji dotyczących molekularnej diagnostyki wirusów, które ukazały się w latach 2011-2014, zaopatrzonych sześciostronicowym, pełniącym rolę komentarza, streszczeniem w językach polskim i angielskim. Pięć prac składających się na rozprawę opublikowano w czasopismach z listy filadelfijskiej, w tym jedną w prestiżowym w dziedzinie bioczuJNIKÓW „*Biosensors & Bioelectronics*” ze współczynnikiem wpływu (IF) 5,437.

Streszczenie stanowi zwięzłe i przejrzyste wprowadzenie do znaczenia i tematyki badań oraz zestawienie najważniejszych wyników. Ponieważ publikacje wchodzące w skład rozprawy przeszły krytyczną

recenzję i ocenę edytorów, ograniczę się jedynie do krótkiego podsumowania rezultatów przedstawionych badań.

Pierwsza z publikacji wchodzących w skład rozprawy (Nidzworski, Dawid, et al. "Detection and differentiation of Newcastle disease virus and influenza virus by using duplex real-time PCR." *Acta biochimica Polonica* 60.3 (2013): 475.) przedstawia konstrukcję układu do jednoczesnej detekcji wirusa ptasiej grypy i rzekomego pomoru drobiu przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond hybrydacyjnych typu „TaqMan”. Uzyskano świetną czułość 100 kopii, ale była ona oszacowana jedynie przez oznaczenia kontroli w postaci plazmidowego DNA, co było w artykule wyraźnie zaakcentowane. W kolejnej pracy dotyczącej jednoczesnej detekcji tych dwóch wirusów (Nidzworski, Dawid, et al. "Detection of avian influenza virus and newcastle disease virus by duplex one step RT PCR." *Central European Journal of Biology* 8.6 (2013): 520-526) opisano jednoetapową metodę RT-PCR, w której synteza cDNA i amplifikacja PCR prowadzone są w tej samej próbówce. Czułość oznaczenia oszacowano na 1000 kopii wirusa, stosując bardziej adekwatny do badania wirusów RNA standard przygotowany przez transkrypcję *in vitro*. Proponowane rozwiązanie jest też przedmiotem polskiego zgłoszenia patentowego (P-391305). Trzecia publikacja (Nidzworski, Dawid, Lukasz Rabalski, and Beata Gromadzka. "Detection and differentiation of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus by real-time PCR." *Journal of virological methods* 173.1 (2011): 144-149) dotyczy konstrukcji systemu ilościowego PCR w czasie rzeczywistym umożliwiającego rozróżnienie wysoko- niskopatogennych szczepów wirusa rzekomego pomoru drobiu przy wykorzystaniu jednej pary starterów poprzez analizę krzywych topnienia amplikonów zawierających niewielkie różnice w sekwencji nukleotydowej, które z kolei są bezpośrednio związane ze zjadliwością wirusa. W tym wypadku uzyskano także bardzo dobry limit oznaczenia szacowany na 200 kopii przy użyciu standardów w postaci plazmidowego DNA albo 1000 kopii w odniesieniu do miana wirusa EID<sub>50</sub>. Kolejny artykuł (Nidzworski, Dawid, et al. "Universal biosensor for detection of influenza virus." *Biosensors and Bioelectronics* 59 (2014): 239-242) opisuje konstrukcję prototypu immunosensora do wykrywania wirusa grypy ludzkiej za pomocą samodzielnie przygotowanego przeciwciała przeciwko wirusowemu białku M1 oraz techniki Elektrochemicznej Spektroskopii Impedancyjnej. Bez stosowania amplifikacji PCR osiągnięto krótki czas oznaczenia 30 min i imponujący limit detekcji szacowany na 80-100 kopii na mikrolitr wyznaczony przez badanie rozcieńczeń samodzielnie otrzymanego rekombinantowego białka M1. Rozwiązanie to jest przedmiotem patentowego zgłoszenia polskiego (P-399993) i międzynarodowego (PCT/PL2013/000092), co dodatkowo podkreśla wartość osiągnięcia. Piąta praca (Nidzworski, Dawid, et al. "A multiplex real-time PCR assay for detection of oseltamivir-resistant strains of influenza virus." *Central European Journal of Biology* 9.6 (2014): 628-633.) prezentuje opracowanie systemu PCR w czasie rzeczywistym pozwalającego na detekcję wirusa grypy przez amplifikację fragmentu genu M1 i jednoczesne rozróżnienie szczepów wirusa wrażliwego i niewrażliwego

na lek przeciwwirusowy oseltamivir przy wykorzystaniu różnic w sekwencji nukleotydowej genu neuraminidazy. Zastosowano multipleksowy system PCR w czasie rzeczywistym z użyciem dwóch sond „TaqMan” i uzyskano również bardzo dobry limit detekcji 400 kopii oszacowany na podstawie analizy standardu w postaci DNA plazmidowego.

W oparciu o opisane wyżej rozwiązania Autor proponuje dwie procedury postępowania diagnostycznego. Pierwsza procedura obejmuje detekcję wirusa grypy u ludzi przy pomocy biosensora i oznaczenia oporności na oseltamivir metodą PCR. Druga z procedur, łącząca użycie kilku systemów PCR, ma posłużyć do wykrywania i rozróżnienia wirusów grypy ptasiej od wirusa rzekomego pomoru drobiu, a także szczepów niskopatogennych od średnio- i wysokopatogennych tego ostatniego.

Dawid Nidzworski jest w tych publikacjach pierwszym i zarazem jedynym korespondencyjnym autorem. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami o udziale w publikacjach, we wszystkich pięciu pracach pełnił on wiodącą rolę i wniósł wkład w postaci koncepcji, prowadzenia doświadczeń, interpretacji wyników i tworzenia manuskryptu. Należy zaznaczyć, że, za wyjątkiem pracy opublikowanej w „*Journal of virological methods*”, D. Nidzworski był samodzielnym twórcą koncepcji. Jest on też jedynym z autorów, który odpowiadał za zdobycie funduszy i analizę statystyczną wyników. Tak znaczny udział w publikacjach świadczy nie tylko o znaczącym, ale ponadprzeciętnym wkładzie pracy, znacznie przekraczającym zwykły zakres aktywności doktorantów.

Dawid Nidzworski jest ponadto współautorem dwóch innych prac dotyczących badań nad nowymi chemoterapeutykami przeciwwirusowymi, które zostały również opublikowane w bardzo dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej, ale nie zostały włączone w skład jego rozprawy doktorskiej (Krol, Ewelina, et al. "Anti-influenza A virus activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars." *Antiviral research* 100.1 (2013): 90-97.; Krol, Ewelina, et al. "Synthesis and antiviral activity of a novel glycosyl sulfoxide against classical swine fever virus." *Bioorganic & medicinal chemistry* 22.9 (2014): 2662-2670). Jest on też współautorem artykułu w języku polskim poświęconego problemowi szczepionek w czasopiśmie „*Nauka i Gospodarka*” (Nidzworski, Dawid, and Beata Gromadzka. "Szczepionki-problem naukowo-gospodarczy." *Nauka i Gospodarka* 1 (2009): 43-50.).

Podkreślając wiodący udział w badaniach i znakomite osiągnięcia Doktoranta, należy też wspomnieć rolę jego promotora i środowiska naukowego, w którym pracuje. Z pewnością doświadczenie, opieka merytoryczna i życzliwość prof. Bogusława Szewczyka otworzyły Doktorantowi drogę do sukcesów.

W celu dopełnienia oceny sylwetki Doktoranta warto wymienić szereg jego innych, poza publikacjami, osiągnięć. Dawid Nidzworski jest laureatem programu „Innodoktorant”, programu „Ventures” Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, programu Lider ora zdobywcą grantu „Patent Plus” NCBiR, a dodatkowo, działa aktywnie na polu biotechnologii jako wiceprezes konsultingowej firmy Pro-Science.

Warstwa edytorska rozprawy nie budzi zastrzeżeń, schematy opracowanych systemów diagnostyki przedstawione w streszczeniu są bardzo pomocne, a na uznanie zasługuje też estetyka druku i grafiki. Dostrzegłem jedynie drobne uchybienia terminologiczne: w streszczeniu w języku polskim użyto angielskiej nazwy metody „real-time PCR” zamiast polskiego odpowiednika „PCR w czasie rzeczywistym”, natomiast w streszczeniu w języku angielskim występuje zamiast „primers” błędny w kontekście PCR termin „starters”.

Kilku istotnych wątków, poruszonych wprawdzie w publikacjach wchodzących w skład rozprawy, nie omówiono w streszczeniu dość dokładnie. Przydatne byłoby wyszczególnienie elementów nowości naukowej, zwłaszcza wyjaśnienie, na czym polega przewaga proponowanych w rozprawie rozwiązań diagnostycznych w porównaniu z już istniejącymi. Wskazane byłoby też podanie informacji o potencjalnym znaczeniu ekonomicznym wykrywania wirusa rzekomego pomoru drobiu - np. jakie są szacowane straty ekonomiczne w Polsce. Doktorant nie wyjaśnia także, czy wdrożenie opracowanych metod diagnostycznych wymaga rozwiązania problemów merytorycznych, czy dodatkowej weryfikacji skuteczności testów. Stosunkowo niewiele miejsca w rozprawie poświęcono krytycznej dyskusji potencjalnych problemów we wdrożeniu i użyciu proponowanych rozwiązań diagnostycznych, dlatego chciałbym postawić następujące pytania.

1. Jak Autor ocenia praktyczne ryzyko, że wobec ogromnej zmienności genetycznej wirusa grypy proponowane systemy okażą się nieskuteczne w detekcji części badanych szczepów lub zmutowanych wariantów?
2. Czy bardzo wysoka czułość oznaczenia może prowadzić do fałszywego alarmu w przypadku obecności w środowisku śladów materiału genetycznego wirusa? Czy jest np. możliwe że do nosogardzieli trafi kurz zawierający nieaktywne wiriony?
3. Jakie są obecnie perspektywy wdrożenia omawianych systemów diagnostycznych?

W mojej opinii badania aplikacyjne w dziedzinie diagnostyki molekularnej stanowią szczególne wyzwanie. Należy być świadomym, iż większość proponowanych metod nie wchodzi do użytku, a wiele szybko ulega eliminacji przez nowe, doskonalsze technologie. Rozwój metod diagnostyki molekularnej w ostatnich latach jest niezwykle gwałtowny. Diagnostyka molekularna po wprowadzeniu metody PCR, mikromacierzy hybrydacyjnych i sekwencjonowania drugiej generacji, wspomagana przez nowe rozwiązania elektroniczne, informatyczne oraz urządzenia mikroprzepływowe umożliwiające miniaturyzację instrumentów i automatyzację oznaczeń daje z jednej strony ogromne możliwości, ale też konfrontuje osiągnięcia wynalazców z olbrzymią konkurencją. Wyrażam więc życzenie, żeby kolejnym sukcesem Autora stało się wdrożenie wyników jego badań w praktyce weterynaryjnej i klinicznej.

Podsumowując, praca Dawida Nidzworskiego stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego dotyczącego molekularnej detekcji wirusów grypy i rzekomego pomoru drobiu. Wiodąca rola Dawida Nidzworskiego w badaniach łączących elementy biotechnologii i diagnostyki molekularnej,

wirusologii, nauk weterynaryjnych i medycznych, wymagających koordynowania działań współpracowników z różnych dziedzin, stanowi jednoznaczne potwierdzenie nie tylko umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, ale predyspozycji do pełnienia roli lidera multidyscyplinarnego zespołu badawczego. Świetne wyniki publikacyjne, sukcesy w pozyskiwaniu grantów i sprawne przeprowadzenie ambitnych projektów świadczą, bez wątpienia, o doskonałej wiedzy teoretycznej Doktoranta w dziedzinie prowadzonych prac.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr Dawida Nidzworskiego zatytułowana „Nowe metody wykrywania wirusa grypy i rzekomego pomoru drobiu” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki art. 13 ustawy Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Dawida Nidzworskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy mgr Dawida Nidzworskiego.

