

Dziekanat MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 6.05.2016

L.dz. nr 13/2016

Warszawa, 30.04. 2016

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Łepka

pt. „Diagnostyka szczepów wirusa grypy przy użyciu nowych metod molekularnych”

(Promotor: prof. dr hab. Bogusław Szewczyk)

Praca doktorska przedstawiona do recenzji została przygotowana przez Pana mgr Krzysztofa Łepka, pod kierunkiem promotora Pana prof. dr hab. Bogusława Szewczyka. Praca opiera się na czterech publikacjach, które zostały opublikowane w latach 2011-2015 w międzynarodowych czasopismach naukowych: Journal of Clinical Microbiology (IF4,068, Q1), Human Vaccines and Immunotherapeutics (IF2,367, Q2), Biomed Research International (IF1,593, Q3) i Acta Biochimica Polonica (IF1,463, Q4). Opracowania są poprzedzone obszernym wprowadzeniem do tematyki pracy, w którym Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością zagadnień, którym się poświęcił.

Grypa jest jednym z ważniejszych wirusowych patogenów człowieka, zwierząt hodowlanych i dziko żyjących. Trudności w zwalczaniu choroby wynikają zarówno z biologii wirusa jak i z rozwoju demograficznego społeczeństw, globalizacji, a także z rozwoju hodowli zwierząt domowych. Jednym z zagrożeń związanych z ewolucją wirusów grypy jest zdolność do reasortacji, czyli wymiany segmentów genomu między różnymi szczepami jednocześnie zakażającymi gospodarza, co w efekcie może prowadzić do powstawania nowych, bardziej zjadliwych podtypów wirusa. Metody badania tego typu zjawisk są stosunkowo proste i mogą być wykorzystywane do monitoringu zmienności szczepów wirusa u ludzi i zwierząt.

Nieco innym problemem jest pojawianie się w genomie wirusa grypy mutacji punktowych. Zmutowane szczepy koegzystują w organizmie gospodarza obok szczepu macierzystego w postaci tak zwanych quasi-wariantów. Te niewielkie subpopulacje wirusów najczęściej pozostają nie wykryte, lecz w sprzyjających okolicznościach mogą stać się dominującymi, co może mieć trudne do przewidzenia konsekwencje epidemiologiczne. Monitorowanie tego typu zmienności ma więc duże znaczenie poznawcze, a także potencjał praktyczny. Wykrywanie quasi-wariantów wirusa grypy jest jednak trudne, jeśli nie niemożliwe, przy użyciu metod standardowych, jak PCR i sekwencjonowanie ampliconów. Metody sekwencjonowania nowej generacji czy spektroskopii masowej są z kolei zbyt kosztowne i pracochłonne aby mogły być zastosowane w rutynowym dochodzeniu diagnostycznym czy epidemiologicznym. Mgr Krzysztof Łeppek zastosował w swoich badaniach nad quasi-wariantami wirusa grypy stosunkowo nową metodę analityczną opartą na analizie polimorfizmu konformacyjnego pojedynczych nici DNA w zmiennej temperaturze (MSSCP), która umożliwia szybką i tanią analizę występowania koinfekcji.

Autor we wstępie na 36 stronach bardzo szczegółowo opisał biologię, epidemiologię i metody zwalczania grypy. Ten element pracy należy docenić bardzo wysoko ze względu na niezwykle przystępny sposób przedstawienia wszystkich aspektów dotyczących grypy. Pewien niedosyt pozostawia nieco zbyt wąskie potraktowanie problemu grypy u drobiu, czy u świń. Obecna wiedza na temat roli świń w epidemiologii grypy jako patogenu człowieka jest bardzo szeroka. Znaczenie ostrych wybuchów choroby w fermach świń, przebiegających z wysoką gorączką i niekiedy ronieniem u zakażonych loch, jest dobrze znane wśród lekarzy weterynarii i na ogół nie nastęrcza problemów diagnostycznych. Mniej natomiast wiadomo o roli zakażeń endemicznych w fermach świń, które często występują w formie dwóch lub więcej fal choroby, niekiedy o bardzo słabo wyrażonych objawach klinicznych lub przy ich braku, dotykając tych samych grup zwierząt. Takie zjawiska w wielu przypadkach są wynikiem koinfekcji stad świń wieloma szczepami wirusa grypy o ograniczonym pokrewieństwie antygenowym. Wpływ takich zakażeń na przyrosty świń jak i rola wirusa grypy w wieloczynnikowych infekcjach układu oddechowego jest niedokładnie poznana. Podobnie zresztą jak zmienność genetyczna szczepów rezydujących w populacjach świń zasiedlających fermy. Wydaje się więc, że metoda MSSCP może być szczególnie przydatna w badaniach tego problemu. Odrębnym zagadnieniem jest dyskusyjna skuteczność szczepionek przeciw grypie u loch. Niektóre obserwacje amerykańskie (informacja ustna, prof. K.-J. Yoon, Iowa State University) wskazują, że w pewnych przypadkach przebieg choroby w szczepionych populacjach może być ostrzejszy niż w nieszczepionych. Metoda

MSSCP mogłaby znaleźć zastosowanie również w badaniu takich zjawisk.

Celem pracy, jak pisze autor na stronie 51, było „opracowanie nowej metody wykrywania i charakterystyki szczepów wirusa grypy, wykorzystującej różnice w sekwencjach nukleotydowej poszczególnych genów”. Prawdopodobnie cel badań można byłoby sformułować nieco bardziej precyzyjnie, biorąc pod uwagę, że wszystkie prace dotyczą wykorzystania MSSCP do badania koinfekcji ludzi i świń różnymi wariantami wirusa grypy.

Pierwsza publikacja zamieszczona w *Acta Biochimica Polonica* w 2015 roku, w streszczeniu określona jako czwarta, stanowi pracę przeglądową traktującą o zastosowaniu metod genotypowania wirusa grypy opartych na SSCP. Stanowi ona przegląd w większości prac autora, w tym również prac będących częścią rozprawy doktorskiej. Publikacja stanowi znakomite wprowadzenie czytelnika do oryginalnych prac doświadczalnych będących przedmiotem rozprawy.

W drugiej załączonej pracy opublikowanej w *Journal of Clinical Microbiology* w 2011 roku, autorzy, w szeregu których mgr Krzysztof Łeppek zajmuje miejsce trzecie z dziewięciu, poddali analizie próbki pobrane od 23 pacjentów z objawami grypodobnymi z Polski, i u których wcześniej metodą real time PCR wykryto infekcję pandemicznym szczepem A(H1N1)pdm09. U czterech z 23 pacjentów analiza MSSCP wykazała koinfekcję sezonowym wariantem szczepu A/H1N1, co ostatecznie potwierdzono metodą sekwencjonowania DNA. Jak autorzy piszą w podsumowaniu, odkrycie to było jednym z pierwszych na świecie przypadków wykrycia koinfekcji pandemicznym i sezonowym wirusem grypy A/H1N1 w sezonie 2009-2010.

W trzeciej załączonej pracy opublikowanej w *Human Vaccines and Immunotherapeutics* w 2014 roku, i w której mgr Krzysztof Łeppek jest pierwszym autorem, analizę MSSCP zastosowano do badania rejonu genu hemaglutyniny zawierającego sekwencję jednego z głównych epitopów dla przeciwciał neutralizujących wirus grypy, w izolatach pandemicznego szczepu A(H1N1)pdm09 uzyskanych od pacjentów z Tajwanu w latach 2009-2011. Badania wykazały, że w izolatach z lat 2010 i 2011 pojawiły się mutacje, z których trzy zlokalizowane były w obrębie fragmentu kodowania epitopu E. Jedna z nich powoduje podstawienie aminokwasu w pozycji 66, w miejscu wiązania przeciwciał neutralizujących. Wykryte mutacje teoretycznie mogą wpływać na skuteczność szczepionki przeciw grypie. Obliczenia autorów przeprowadzone na z wykorzystaniem danych epidemiologicznych wskazują, że teoretyczna skuteczność szczepionki przeciw zmutowanym szczepom może spaść z 52,7% do 35,2%.

W czwartej załączonej pracy opublikowanej w BioMed Research International w 2015 roku, i w której mgr Krzysztof Łepka jest pierwszym w szeregu autorów, analiza MSSCP została zastosowana do badania wirusów grypy uzyskanych od świń z trzech ferm z terenu Polski z lat 2011-2013, które metodą PCR zaliczono do typu H1N1 o pochodzeniu ptasim. Analiza MSSCP oraz sekwencjonowanie DNA produktów PCR wskazywały na prawdopodobieństwo koinfekcji świń różnymi wariantami wirusa grypy. Dokładniejsza analiza MSSCP klonów amplifikowanych fragmentów HA wykazała ich przynależność do trzech różnych grup genetycznych.

Wszystkie załączone publikacje jednoznacznie dowodzą wielkiego potencjału metody MSSCP w badaniach nad wirusem grypy i należy mieć nadzieję, że opracowana metoda będzie znajdować coraz szersze zastosowanie w praktyce diagnostycznej i epidemiologicznej, również w weterynarii.

Mgr Krzysztof Łepka w pełni osiągnął zaplanowany cel pracy, publikując wyniki badań w czasopismach o wysokiej randze dla reprezentowanej dyscypliny, które najprawdopodobniej zostaną docenione dużą liczbą cytowań. Autor wykazał się dużą umiejętnością planowania i realizacji badań oraz krytycznej 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 Krzysztofa Łepka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wagę osiągnięć naukowych mgr Krzysztofa Łepka i opublikowanie wyników pracy w kilku artykułach naukowych o zasięgu międzynarodowym wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii o wyróżnienie jego pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. Tomasz Stadejek