



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr. inż. Beaty Gad

p.t.: „Genotypowa i fenotypowa charakterystyka izolatów klinicznych i środowiskowych wirusów Coxsackie B krążących w Polsce w latach 1999-2019”

Przygotowanej pod kierunkiem Promotor dr hab. n. med. Magdaleny Wieczorek w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH - PIB

Wirusy Coxsackie B (CVB) wchodzą w skład rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Enterovirus*, zakażających powszechnie wiele gatunków ptaków i ssaków. Należą one do najmniejszych subkomórkowych patogenów zakażających człowieka. Ich replikacja ma miejsce w cytoplazmie, a przenoszone są przede wszystkim drogą fekalno-oralną i kropelkową, a także przez kontakt bezpośredni. Okres inkubacji wynosi zwykle kilka dni, choć może niekiedy być dłuższy. Zakażeniom najczęściej ulegają dzieci do 10. rż. Osoba zakażona wydalą wirusa z kałem i z wydzieliną dróg oddechowych już na kilka dni przed pojawieniem się objawów klinicznych, ale największe miano wirusa wykrywa się w materiałach we wczesnym okresie objawowym. Zakażni są także ludzie zakażeni bezobjawowo.

Od końca XX wieku stwierdza się zmianę w częstości izolowanych serotypów enterowirusów niepoliomielitycznych. Zmniejsza się bowiem liczba izolacji wirusów Coxsackie A, a zwiększa echowirusów należących do gatunku B, w tym serotypów 30 (izolowany najczęściej), 6, 11, 13 i 18 oraz Coxsackie B5, które odpowiadają za ok. 95% zakażeń. Wirusy Coxsackie B są ważnym czynnikiem etiologicznym aseptycznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, a także powodują zapalenie mięśnia sercowego, chorobę bornholmską czy wieloukładową chorobę noworodków.

Przez kilkadziesiąt lat izolacja enterowirusów z materiału klinicznego stanowiła metodą diagnostyczną z wyboru. Wiązało się to jednak z kilkoma problemami: po



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

pierwsze niektóre wirusy Coxsackie nie namnażają się w standardowo używanych liniach komórkowych, a interpretacja wyniku dodatniego jest trudna; po drugie zaś, ze względu na ich wysoką zmienność antygenową trudna była prawidłowa identyfikacja serotypu wyhodowanego wirusa.

Obecnie uważa się za najbardziej obiecującą metodą diagnostyczną ostatnich lat testy PCR poprzedzone odwrotną transkrypcją. Czulość i swoistość takich badań pozwala na wykrycie enterowirusów praktycznie w dowolnej próbce, także w płynie mózgowo-rdzeniowym lub w bioptatach mięśnia sercowego. Niestety dokładna identyfikacja konkretnego gatunku (a także sero- lub genotypu) wymaga użycia specjalnie dedykowanych zestawów starterów lub też zastosowania sekwencjonowania materiału genetycznego, co uważane jest obecnie za „złoty standard” w identyfikacji enterowirusów.

Wykrycie serokonwersji jest metodą wykorzystywaną niekiedy w diagnostyce ostrych zakażeń enterowirusami, zwłaszcza u bardzo małych dzieci. Jednak ze względu na rozpowszechnienie tych infekcji (szczególnie bezobjawowych) w populacji należy zachować ostrożność w interpretacji wyników badań serologicznych u dzieci >1. rż.

Rozpowszechnienie infekcji enterowirusami niepoliomielitycznymi w populacji oraz kłopoty z diagnostyką powodują, iż tematyka zakażeń wirusami Coxackie B stanowi nadal istotny problem.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy 211 stron, w układzie typowym z podziałem na wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz bibliografię. Prócz tego na początku pracy zamieszczono spis treści oraz wykaz stosowanych skrótów, zaś na końcu dysertacji, po piśmiennictwie liczącym 244 pozycje, znalazły się spis 50 rycin i 54 tabel załącznik zawierający dodatkowych 19 tabel.

W rozdziale „Wstęp” Autorka przedstawiła zwięzłą charakterystykę wirusów Coxackie B na tle całej rodziny *Picornaviridae*, z uwzględnieniem ich zmienności genetycznej, cyklu replikacyjnego oraz przebiegu klinicznego zakażenia. W dalszej części znalazł się opis patogenezy infekcji CVB oraz ich epidemiologii. Na podkreślenie zasługuje dobór piśmiennictwa przez Doktorantkę, który jest dobrany w



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

przemysłany sposób i stanowi pełen obraz problematyki zakażeń spowodowanych przez wirusy Coxackie B.

Sześć celów pracy zostało sformułowane w jasny i klarowny sposób; ponadto opatrzone je krótkim podsumowaniem, który znacząco ułatwia zrozumienie przesłanek podjęcia tej właśnie tematyki badań.

W rozdziale „Materiał i metody” znalazł się drobiazgowy opis materiału klinicznego wykorzystanego do eksperymentów, a grupa badana 270 izolatów klinicznych może budzić przekonanie o miarodajności i znamienności statystycznej uzyskanych wyników. Autorka opisała również zastosowane do ich namnażania linie komórkowe i odczynniki. Podobnie dokładnie scharakteryzowano wykorzystane w toku badań metody, które zostały dobrane w sposób absolutnie prawidłowy, umożliwiając w pełni osiągnięcie założonych celów pracy.

W części doświadczalnej mgr. inż. Beata Gad amplifikowała za pomocą techniki RT-PCR dwa geny enterowirusów (1D i 3D). Uzyskane w ten sposób produkty amplifikacji w kolejnej fazie badań sekwencjonowano za pomocą zautomatyzowanej metody wg. Sangera i porównywano z sekwencjami szczepów referencyjnych oraz innymi dostępnymi w bazie GenBank. Następnie ustalano podobieństwo sekwencji na podstawie odległości ewolucyjnej w oparciu o ilość różnic nukleotydowych lub aminokwasowych. Konstruowano także drzewa filogenetyczne. Doktorantka pokusiła się także na określenie różnic w tropizmie komórkowym i replikacji poszczególnych izolatów CVB3 i CVB5 względem pięciu różnych linii komórkowych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania te przeprowadzono w trzech niezależnych eksperymentach.

W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawiła w pierwszej kolejności częstość występowania poszczególnych typów CVB w Polsce, ze starannym uwzględnieniem regionów geograficznych, gdzie pobrano izolaty. Określono także precyzyjnie dane demograficzne i ramy czasowe izolacji wirusów. Druga część rozdziału „Wyniki” poświęcona jest charakterystyce molekularnej polskich izolatów wirusów Coxackie B, określeniu ich zmienności oraz analizie porównawczej z analogicznymi sekwencjami szczepów referencyjnych oraz CVB wyizolowanych na całym świecie. Tę część mgr. inż. Beata Gad przygotowała w mojej opinii ze szczególnie wielką starannością i



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

uwzględniła w niej wszystkie dane istotne dla dalszej interpretacji i wyciągnięcia wniosków. W części trzeciej rozdziału „Wyniki” Doktorantka omówiła różnice w mianie zakaźnym użytych w doświadczeniu izolatów CVB w różnych liniach komórkowych *in vitro*, a co za tym idzie możliwości ich wykorzystania w potencjalnym toku diagnostycznym. Należy zaznaczyć, iż forma zaprezentowania danych w rozdziale „Wyniki” jest przejrzysta i uporządkowana, zaś czytający ma wrażenie, że wydobyto z nich maksymalną możliwą ilość informacji.

Rozdział „Dyskusja” został przeprowadzony przez mgr. inż. Beatę Gad w sposób zasługujący na moje pełne uznanie. Autorka omówiła uzyskane wyniki w kontekście dostępnych danych literaturowych, zawierając odniesienia do interesujących z epidemiologicznego punktu widzenia obserwacji, dotyczących pokrewieństwa genetycznego polskich izolatów CVB z izolatami światowymi. Moim zdaniem rozdział „Dyskusja” objął wszystkie możliwe aspekty zagadnienia, których dotyczyć powinna przedstawiona rozprawa, jak również potencjalną możliwość przyszłego wykorzystania odpowiednio zmodyfikowanych wirusów Coxsackie B w terapii przeciwnowotworowej. Całość pracy opatrzone natomiast dziesięcioma w pełni uprawnionymi, logicznie uszeregowanymi wnioskami.

Pragnę nadmienić, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Beaty Gad stanowi poważne wyzwanie dla recenzenta, bowiem napisana została w sposób niezwykle staranny i precyzyjny. Drobne błędy dostrzeżone w tekście mają głównie charakter edytorski, a jedyną uwagą jaka nasunęła mi się podczas lektury pracy jest użycie w rozdziale „Dyskusja” określenia „**nie-polio enterowirusy**”. Jest ono kalką językową angielskiego wyrażenia „**non-polio enteroviruses**”, podczas gdy w polskiej nomenklaturze stosuje się częściej określenia „**enterowirusy niepoliomielityczne**”.

Uwaga ta w najmniejszym stopniu nie wpływa na merytoryczną wartość rozprawy doktorskiej, ani nie obniżają mojej wysokiej oceny jej strony redakcyjnej. Podkreślam ponownie, iż praca ta w mojej opinii została przygotowana z wielką starannością, wyniki są precyzyjnie udokumentowane a wnioski logiczne i w pełni wynikające z treści pracy. Wszystko to składa się na łatwość odbioru zawartych w rozprawie informacji.



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

Z całym przekonaniem stwierdzam więc, iż w mojej opinii rozprawa doktorska mgr. inż. Beaty Gad stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a co za tym idzie, spełnia wymogi Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. 2003 nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH - PIB o dopuszczenie mgr. inż. Beaty Gad do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

T. Dzieciatkowski

dr hab. n. med. Tomasz Dzieciatkowski