

UNIwersyteckie Centrum Kliniczne WUM
Dziecięcy Szpital Kliniczny im. Józefa Polikarpa
Brudzińskiego
UNIwersyteckie Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej

Warszawa 29.07.2109

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Marty Prygiel

pt. **„Ocena w badaniach na modelu mysim ochronnych właściwości szczepionki eksperymentalnej w porównaniu do szczepionek stosowanych w powszechnych szczepieniach ochronnych przy użyciu szczepów *Bordetella pertussis* o zróżnicowanym profilu genetycznym”**

wykonanej w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek NIZP-PZH

promotor: dr hab. Aleksandra Zasada

promotor pomocniczy: dr n. med. Ewa Mosiej

Recenzowana dysertacja doktorska wpisuje się w nurt badań nad przyczynami obserwowanego w ostatnich latach wzrostu zachorowań na krztusiec w społeczeństwach o wysokim odsetku zaszczepienia populacji. W odróżnieniu od historycznie pojmowanego krztuśca jako choroby wieku dziecięcego, obecnie to starsze grupy wiekowe stanowią rezerwuar tej bakterii. Zakażenia wśród młodzieży i dorosłych są zagrożeniem dla niezaszczepionych lub nie w pełni zaszczepionych noworodków i niemowląt. Chcąc zapobiegać tym zachorowaniom musimy poznać odpowiedź na pytanie o skuteczną modyfikację szeroko pojętej strategii szczepień. Tę aktualną problematykę podejmuje recenzowana rozprawa Pani mgr Marty Prygiel, doktorantki w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek NIZP-PZH, kierowanym przez dr hab. Aleksandrę Zasadę. Zespół badawczy kierowany przez Panią Docent ma długoletnie tradycje w zakresie badań nad krztuścem, począwszy od zagadnień mikrobiologicznych związanych z charakterystyką krążących szczepów po kwestie dotyczące profilaktyki i zapobieganiu tej chorobie.

Głównym celem recenzowanej pracy doktorskiej było określenie wpływu trzech różnych typów oraz różnych dawek szczepionek przeciw krztuścowi na uzyskiwanie przewagi selekcyjnej przez szczepy *Bordetella pertussis* o różnych genotypach.

Rozprawa doktorska liczy 202 strony, jest monografią opartą na własnym oryginalnym badaniu realizowanym w ramach projektu badawczego NCN 2013/11/B/NZ7/O2083. Składa się z zasadniczych rozdziałów, typowych dla prac o charakterze eksperymentalnym jak: wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, piśmiennictwo. Na końcu pracy zamieszczono spis tabel i spis rycin. Piśmiennictwo obejmuje 340 pozycji literatury. Bibliografia zawiera publikacje historyczne np. pierwsze opracowanie Bordet J. i Gengou O. z 1906 roku oraz prace aktualne. Literatura naukowa jest odpowiednio dobrana i właściwie wykorzystana w tekście rozprawy. Odsetek publikacji z ostatnich 5 lat, czyli okresu 2013-2018 stanowi 23,5% pozycji. Dodatkowo, w Piśmiennictwie uwzględniono profesjonalne strony internetowe.

Pierwszy rozdział „Wstęp” stanowi doskonałe wprowadzenie do dalszych części rozprawy i integruje trzy wyraźnie zarysowane aspekty dysertacji związane z *B. pertussis*: mikrobiologiczny,

epidemiologiczny i wakcynologiczny. Autorka opisuje: wszystkie czynniki zjadliwości bakterii tego gatunku, patogenezę i obraz kliniczny krztuśca, metody diagnostyki laboratoryjnej z uwzględnieniem obowiązujących w tym zakresie rekomendacji europejskich i światowych oraz leczenie i profilaktykę. Doktorantka nie tylko charakteryzuje aktualnie wykorzystywane w tym celu szczepionki całokomórkowe i bezkomórkowe, ale również wskazuje na nowe trendy np. szczepionki tworzone w oparciu o pęcherzyki błony zewnętrznej. W dalszej części Autorka bardzo szczegółowo przedstawia sytuację epidemiologiczną krztuśca w Polsce od początku XX wieku, aż do roku 2018. Wiele miejsca Doktorantka poświęca przedstawieniu aktualnego stanu wiedzy na temat zmienności genetycznej szczepów *B. pertussis* wyhodowanych w Polsce i na świecie. W ostatniej części wstępu opisuje zwierzęce modele doświadczalne wykorzystywane w badaniach nad tą chorobą. Wstęp świadczy o szerokiej i ugruntowanej wiedzy Doktorantki w zakresie przedstawianej tematyki oraz umiejętności interpretacji literatury. Rozdział napisany jest rzetelnie i wyczerpująco, może stanowić podstawę do przygotowania bardzo dobrej pracy przeglądowej.

Cel badawczy Autorka realizowała w dwóch podstawowych eksperymentach:

- oznaczeniu immunogenności oraz dynamiki poziomów odpowiedzi poszczepiennej wobec wybranych antygenów krztuścowych (toksyny krztuścowej, pertaktyny, włókienkowej hemaglutyniny, fimbrii typu 2 i 3), zawartych w szczepionkach komercyjnych: całokomórkowej i bezkomórkowej oraz całokomórkowej szczepionce eksperymentalnej wytworzonej ze szczepów *B. pertussis* 1/12 i 1330/07 o różnym profilu genetycznym, w badaniu odpowiedzi humoralnej u myszy domowych szczepu wsobnego BALB/cAnNCrICmd po immunizacji ww. preparatami,
- badaniu eliminacji zakażenia szczepami *B. pertussis* o różnych profilach alleli genów kodujących czynniki wirulencji z tkanki płuc myszy immunizowanych szczepionkami komercyjnymi oraz szczepionką eksperymentalną.

W przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej badaniach wykorzystano 1828 zwierząt, co zagwarantowało odpowiednią liczebność grup, w każdym z przeprowadzonych eksperymentów i zapewniło związaną z tym istotność wyników. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą, doskonałym i nowoczesnym warształem laboratoryjnym. Do badań wybrano szczepy wykazujące różnice w allelach genu pertaktyny, genu kodującego podjednostkę S3 toksyny krztuścowej oraz w sekwencji promotora genu toksyny krztuścowej. Zgodnie z danymi literaturowymi są to białka szczególnie istotne dla zmienności szczepów *B. pertussis*. Autorka szczególną dbałość wykazała w doborze kontroli do doświadczeń przeprowadzonych na modelach zwierzęcych oraz w doświadczeniach laboratoryjnych. Wykorzystany do badania odpowiedzi humoralnej u immunizowanych zwierząt test ELISA został zwalidowany przed rozpoczęciem pracy eksperymentalnej. Pewien niedosyt powoduje brak mikrobiologicznej charakterystyki wykorzystanych w badaniach szczepów *B. pertussis* oraz brak informacji o wykonaniu potwierdzenia, że nie wystąpiła żadna zmiana istotnych właściwości badanych kultur po okresie przechowywania.

Autorka uzyskane wyniki zaprezentowała w kilku podrozdziałach, dodatkowo ilustrowanych 50 barwnymi rycinami i 53 tabelami. Taka mnogość tabel i rycin wynika z dużej liczby wyników oryginalnych oraz faktu, że Doktorantka wyniki obu głównych eksperymentów przedstawiła zarówno w formach tabelarycznych jak i wykresów, co ułatwia czytelnikowi analizę trendu i kierunku zmian. Jednak taki podwójny sposób przedstawiania wyników może prowadzić do pewnych nieścisłości i tak rycina 5 (str. 73) i rycina 8 (str.74) pokazują inne średnie wartości po immunizacji szczepionką eksperymentalną wP-exp w dawce 1/20 niż kompatybilna z nimi tabela 8 (str. 69) .

Doktorantka dokonała analizy statystycznej wyników badań eliminacji pałeczek krztuśca z płuc myszy wcześniej immunizowanych trzema różnymi dawkami szczepionek oraz wyników oznaczenia

immunogenności poszczególnych składników krztuścowych zawartych w badanych 3 szczepionkach metodą ELISA za pomocą analizy wariancji ANOVA w programie Statistica 10, potwierdzając istotność statystyczną uzyskanych wyników. Wykazano między innymi, że wysoka dawka każdej z zastosowanych szczepionek była optymalna do uzyskania odporności niezależnie od szczepu *B. pertussis* użytego do zakażenia.

W dyskusji Doktorantka celująco odpowiada na wszystkie pytania, które pojawiają się w trakcie lektury rozdziału „Materiały i metody” i przedstawia m.in. argumenty dotyczące doboru wykorzystanego modelu zwierzęcego, kryteria doboru szczepów do przeprowadzonych eksperymentów, powody badania immunogenności szczepionek na podstawie odpowiedzi humoralnej bez uwzględnienia odpowiedzi komórkowej. W rozdziale tym Autorka skonfrontowała wyniki badań własnych z danymi literaturowymi i dokonała ich obszernego omówienia. Jednym z aspektów dyskusji jest analiza przyczyn wzrostu zachorowań na krztusiec. Doktorantka twierdzi, że w Polsce w ostatnich latach nie doszło do zmian w diagnostyce stosowanej do potwierdzenia zachorowań pałeczką krztuśca, z czym nie mogą się do końca zgodzić. Oprócz zdecydowanie większej liczby ośrodków wykonujących to oznaczenie, niewątpliwie wprowadzenie w Europie w 1980 (i z pewnym opóźnieniem w Polsce) do rutynowej diagnostyki krztuśca testów ELISA przyczyniło się do wyższej wykrywalności zachorowań. Obowiązujące zalecenia europejskiej grupy ekspertów EUpert dotyczące diagnostyki serologicznej w kontekście opisywanej przez Doktorantkę Polski jako jedyne kraju w Europie, gdzie powszechnie stosuje się szczepionkę całokomórkową (wP) mogą umożliwić w wielu przypadkach na jednoznaczne rozróżnienie osoby chorej od szczepionej, gdyż jedynym antygenem rekomendowanym w testach ELISA jest toksyna krztuścowa, na którą nie jest wytwarzana odpowiedź immunologiczna po immunizacji tym typem szczepionki, co Autorka potwierdziła w jednym z przeprowadzonych eksperymentów.

Wyniki przeprowadzonych badań w pełni upoważniają Doktorantkę do sformułowania 7 wniosków potwierdzających między innymi fakt, że:

- zastosowanie w składzie szczepionek, szczepów *B. pertussis* o profilach genetycznych aktualnie dominujących w populacji może wpłynąć na poprawę skuteczności szczepień przeciw krztuścowi,
- stosowanie aktualnych szczepionek stanowi wystarczającą ochronę przed zróżnicowanymi genetycznie szczepami pałeczki krztuśca
- szczepionki całokomórkowe wykazują przewagę nad szczepionkami bezkomórkowymi w zakresie ochrony przed zakażeniem przez szybszą eliminację czynnika zakaźnego
- przyczyna obserwowanego w Polsce i na świecie wzrostu zachorowań na krztusiec, jest najprawdopodobniej związana z obniżeniem odporności poszczepiennej wraz z upływem czasu od podania ostatniej dawki.

Doprecyzowania wymaga wniosek nr 5, w którym Autorka stwierdza, że u osób uodpornionych szczepionkami bezkomórkowymi bakteria może dłużej przebywać w płucach. Zgodnie z danymi literaturowymi dotyczącymi patogenezы zakażenia, *B. pertussis* nie zajmuje tkanki płuc człowieka. Po adhezji do nabłonka migawkowego dróg oddechowych, następuje namnażanie bakterii i produkcja toksyn, co wiąże się z uszkodzeniem komórek nabłonka i ogólnoustrojowymi objawami toksemii.

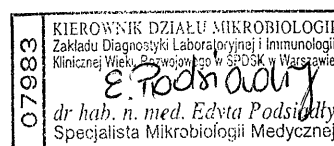
Praca została przygotowana niezwykle starannie. Napisana jest przejrzystym i zwięzłym językiem. Poza jednym wyjątkiem (str.83) nie ma błędów literowych. Na ryc. 2 (str.58) oraz w tabelach 22 – 48 Doktorantka używa nieprecyzyjnego sformułowania „Czas immunizacji zwierząt” i „Czas immunizacji 30/60/120 dni” zamiast odpowiednio „Czas zakażenia zwierząt” i „Czas zakażenia 30/60/120 dni” lub „Okres immunizacji zwierząt” i „Okres immunizacji 30/60/120 dni”. Te drobne

niedociągnięcia nie zmniejszają wartości merytorycznej recenzowanej pracy i nie wpływają na jej ogólną, bardzo wysoką ocenę.

Podsumowanie

Oceniana dysertacja spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zarówno pod względem formalnym jaki i merytorycznym. Stanowi oryginalne i bardzo wartościowe opracowanie potwierdzające skuteczność eliminacji szczepów *B. pertussis* o nowych genotypach za pomocą eksperymentalnie przygotowywanych szczepionek, ale też potwierdza skuteczność wobec nowych szczepów wykorzystywanych obecnie szczepionek komercyjnych. Wiarygodność tej tezy jest poparta dużą liczbą oryginalnych wyników badań eksperymentalnych oraz wykonanych na podstawie uzyskanych danych analiz statystycznych. Przeprowadzone badania wnoszą istotny wkład do dyskusji na temat zasadności zmiany składu szczepów szczepionkowych. Ich znaczenie jest tym większe, że zostały wykonane na szczepach *B. pertussis* izolowanych w ostatnich latach w Polsce. Badania zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone, reprezentują wysoki poziom naukowy, i powinny jak najszybciej zostać opublikowane w czasopiśmie z wysokim współczynnikiem oddziaływania (ang. impact factor, IF).

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr Marty Prygiel spełnia wszystkie ustawowe wymogi i kryteria, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora nauk medycznych. Z pełnym przekonaniem zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny o dopuszczenie mgr Marty Prygiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie korzystając z przysługującej mi możliwości, chciałabym przedstawić Wysokiej Radzie wniosek o przyznanie jej stopnia doktora nauk medycznych z wyróżnieniem.



Warszawa 29.07.2019