UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii, Zakład Mikrobiologii Molekularnej
dr hab. Adrianna Raczkowska

Warszawa, dn. 14.09.2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Macieja Polaka

pt.: „Charakterystyka genotypowa i fenotypowa szczepów *Bordetella pertussis* niewytwarzających antygenów szczepionkowych, wyizolowanych w Polsce w latach 1959-2016"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Macieja Polaka została wykonana w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny, pod kierunkiem i opieką naukową promotora dr hab. Aleksandry Anny Zasady. Tematyka rozprawy doktorskiej Pana mgr. Macieja Polaka jest kontynuacją badań realizowanych przez zespół dr hab. Aleksandry Anny Zasady, których prace dostarczają wiele oryginalnych i wartościowych danych dotyczących czynników chorobotwórczych wybranych patogenów człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości ich zastosowania w szczepionkach, a także nowoczesnych metod diagnostyki wielu groźnych chorób zakaźnych. Praca Doktoranta w tym zespole oraz możliwość korzystania z doświadczenia i bogatego warsztatu badawczego, zaowocowały rozprawą doktorską na wysokim poziomie naukowym i o dużych walorach poznawczych.

W ramach profilaktyki krztuśca na świecie stosuje się dwa rodzaje szczepionek przeciw tej bakterii, tj. szczepionki całokomórkowe (wP) oraz bezkomórkowe (aP). Te pierwsze indukują kompleksową odpowiedź immunologiczną na wiele antygenów *B. pertussis*, są jednak wysoce reaktogenne. Natomiast szczepionki aP, złożone z 1-5 oczyszczonych i odtoksycznionych antygenów pałeczki krztuśca, jak się okazało, są mnie skuteczne niż szczepionki wP. W Polsce od 1960 roku

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 310, faks: 22 55 41 402
e-mail: araczko@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

stosuje się powszechnie szczepionki wP w szczepieniach przeciw krztuścowi dzieci, a od 1998 roku dostępne i wykorzystywane są również szczepionki aP.

Obserwowany od lat 90-tych ubiegłego wieku w Polsce i na świecie wzrost zachorowalości na krztusieć, pomimo wysokiego poziomu szczepień, przyczynił się do rozpoczęcia intensywnych badań monitorujących zmienność genetyczną i fenotypową szczepów *B. pertussis* odpowiedzialnych za zakażenia u ludzi. Analizy te pozwolą na opracowanie kompleksowej strategii mającej na celu poprawę globalnej sytuacji epidemiologicznej krztuśca. Badania prowadzone przez Pana mgr. Macieja Polaka wpisują się w ten ogólnoświatowy trend.

Pan mgr Maciej Polak podjął się ważnego zadania jakim jest charakterystyka genotypowa i fenotypowa szczepów *B. pertussis* izolowanych w Polsce od zakażonych ludzi w ciągu ostatnich 50 lat. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że temat ten jest interesujący, a wyniki uzyskane podczas jego realizacji mają charakter oryginalny i są interesujące dla szerokiego grona badaczy zajmujących się epidemiologią chorób zakaźnych. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia zatem wymóg oryginalności podjętej tematyki badawczej.

Wydaje mi się, że niepotrzebnie tytuł pracy został zawężony do szczepów *B. pertussis* niewytwarzających antygenów szczepionkowych (zidentyfikowano 4 izolaty kliniczne niewytwarzające pertaktyny spośród 193 badanych) ponieważ ogrom prac Doktoranta dotyczył charakterystyki genotypowej i fenotypowej dużej puli szczepów *B. pertussis* izolowanych od ludzi chorych na krztusieć w Polsce w latach 1959-2016, jak również dodatkowo 10 szczepów szczepionkowych.

Praca doktorska Pana mgr. Macieja Polaka ma klasyczny, typowy układ dla rozpraw z dziedziny biologii medycznej. Rozpoczyna się obszernych Wstępem, w którym Doktorant dokładnie scharakteryzował czynniki zjadliwości *B. pertussis*, stosowane metody genotypowe i fenotypowe badań zmienności izolatów tego patogenu. Omówił także wyczerpująco sposoby diagnozowania, leczenia, profilaktyki i epidemiologii krztuśca. Dużo uwagi Autor poświęcił szczepieniom i możliwym przyczynom wzrostu zachorowań na tę chorobę zakaźną oraz zaprezentował potencjalne strategie poprawy immunoprofilaktyki krztuśca. Wstęp jest napisany bardzo dobrze w oparciu o dogłębnie przeanalizowane źródła literaturowe. Brakuje mi jedynie rycin w tej części rozprawy, które ułatwiłyby niewątpliwie studiowanie tekstu. Należy jednak podkreślić, że wszystkie przedstawione w tej części pracy informacje przydały się podczas analizy omówionych w rozprawie wyników własnych Doktoranta. Podsumowując, zaprezentowany Wstęp oceniam bardzo wysoko.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 310, faks: 22 55 41 402
e-mail: araczko@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

W następnym rozdziale ocenianej pracy Pan mgr Maciej Polak zaprezentował założenia i cel rozprawy, którym była charakterystyka genotypowa i fenotypowa szczepów *B. pertussis* wyosobnionych od ludzi chorych na krztusieć w Polsce w okresie 1959-2016, przy założeniu, że różne rodzaje szczepionek przeciw krztuścowi, tj. całokomórkowe lub bezkomórkowe, w odmienny sposób kształtują strukturę populacji *B. pertussis*. Jak podkreśla Autor: „szczególny nacisk w pracy położono na ocenę zdolności bakterii do wytwarzania antygenów występujących w szczepionkach bezkomórkowych, ponieważ utrata niektórych z nich była opisywana u izolatów krążących w krajach stosujących od wielu lat szczepionki bezkomórkowe". Ten ambitny cel został podzielony na kilka precyzyjnie określonych zadań badawczych, które polegały m. in. na: (i) ocenie występowania wśród badanych izolatów klinicznych *B. pertussis* mutantów niewytwarzających pertaktyny, toksyny krztuścowej, hemaglutyniny włókienkowej, fimbrii, jak również toksyny cyklazy adenylowej oraz czynnika kolonizacji tchawicy, (ii) określeniu struktury serotypowej izolatów klinicznych *B. pertussis* oraz stabilności serotypów szczepów stosowanych do produkcji polskiej szczepionki przeciw krztuścowi. Kolejnymi ważnymi zadaniami jakie postawił przed sobą Pan mgr Maciej Polak były analizy genotypowania metodami PFGE, MLST i MLVA, jak również ocena stopnia wrażliwości badanych izolatów klinicznych na antybiotyki powszechnie stosowane w leczeniu krztuśca. Należy podkreślić, że poszczególne zadania badawcze zostały bardzo precyzyjnie przez Pana mgr. Macieja Polaka opisane i były przez niego konsekwentnie realizowane w trakcie prac nad dysertacją.

Następny rozdział ocenianej rozprawy to Materiały i Metody. Właściwie nie mam do tej części poważniejszych uwag. Chciałabym w tym miejscu podkreślić, że metody badawcze zastosowane w pracy zostały prawidłowo dobrane i przeprowadzone. Nie wątpię też, że przedstawione szczegółowe protokoły badawcze będą przydatne innym pracownikom w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek NIZP-PZH. Mam tylko kilka drobnych uwag, po pierwsze, nie znalazłam informacji dlaczego do analiz lekooporności metodami mikrobiologicznymi wybrano 26 izolatów klinicznych z lat 2010-2016, w przypadku pozostałych analiz były to 22 izolaty z lat 2014-2016 (albo cała pula 193 szczepów). Po drugie, w opisie metody Western Blot nie znalazłam informacji w jaki sposób sprawdzano czy porównywalne ilości lizatów komórkowych były nakładane do studzienek w żelu SDS-PAGE, jak również czy doszło do prawidłowego transferu białek na membranę. Oczywiście w pracy brak odpowiedniego prążka na membranie przekładał się następnie na obecność mutacji skutkującej tym brakiem, jednakże trzeba mieć pewność, że potencjalny brak syntezy jakiegoś białka nie jest kwestią możliwych problemów technicznych. Kolejna uwaga dotyczy

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 310, faks: 22 55 41 402
e-mail: araczko@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

analiz RT-qPCR, nie wspomniano o ważnym etapie w procedurze, a mianowicie kontrolnej reakcji PCR na matrycy izolowanego totalnego RNA po traktowaniu DNazą, w celu wykluczenia obecności śladowych ilości DNA. Czy taki test kontrolny był przeprowadzany ?

Najobszerniejszą część ocenianej pracy stanowi omówienie wyników własnych Doktoranta. Wszystkie opisane w rozprawie doktorskiej Pana mgr. Macieja Polaka rezultaty mają charakter doniesień oryginalnych, a ich dokumentacja nie budzi zastrzeżeń. Charakterystykę izolatów klinicznych *B. pertussis* Autor rozpoczął od oceny zdolności szczepów do syntezy antygenów, przede wszystkim tych występujących w szczepionkach bezkomórkowych. Wśród 193 analizowanych izolatów zidentyfikowano cztery, które utraciły zdolność wytwarzania pertaktyny, co jak słusznie sugeruje Autor może wskazywać na pojawienie się w polskiej populacji pałeczek krztuśca nowego mechanizmu adaptacyjnego, obserwowanego już na świecie, który może obniżyć skuteczność stosowanych coraz częściej w Polsce szczepionek bezkomórkowych. Przeprowadzona przez Doktoranta dokładna analiza pozwoliła na określenie charakteru tych mutacji, tj. insercja elementu transpozycyjnego, powstanie przedwczesnego kodonu STOP w sekwencji *prn* oraz inwersja promotora *prn*. Ponadto, wszystkie badane izolaty kliniczne posiadały zdolność do wytwarzana antygenów toksyny krztuścowej, hemaglutyniny włókienkowej, fimbrii, toksyny cyklazy adenylowej oraz potencjalnie immunogennego czynnika kolonizacji tchawicy (oprócz jednego szczepu, który był *tcfA*$^{-}$). Serotypowanie izolatów klinicznych *B. pertussis* wykazało natomiast zastępowanie w ostatniej dekadzie dominującego serotypu Fim2 przez Fim3, co prawdopodobnie jest efektem presji selekcyjnej wywieranej na bakterie przez stosowaną latami szczepionkę całokomórkową. Ponadto, analizowane szczepy szczepionkowe charakteryzowały się również zmianami w składzie antygenów Fim2 oraz Fim3 w zależności od badanej serii siewnej, co jak słusznie zauważył Autor wskazuje na potrzebę monitorowania jednorodności w/w szczepów oraz oceny jakości stosowanych szczepionek wP.

Do genotypowania izolatów klinicznych *B. pertussis* zastosowano metody PFGE, MLST oraz MLVA, których wyniki pozwoliły na zaobserwowanie istotnych zmian genetycznych polskiej populacji pałeczek krztuśca izolowanych w ostatnim dziecięcioleciu. Doktorant stawia tezę o ewolucji w kierunku jednorodności genetycznej, tj. w kierunku genotypu *ptxA1-ptxP3-prn2*-MT-27, który prawdopodobnie zwiększa szansę przeżycia polskich izolatów w populacji ludzkiej szczepionej przeciw krztuścowi coraz częściej szczepionką aP.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 310, faks: 22 55 41 402
e-mail: araczko@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

W ostatnim etapie badań Doktorant analizował lekowrażliwość izolatów klinicznych *B. pertussis* na antybiotyki powszechnie stosowane w leczeniu krztuśca, tj. makrolidy (erytromycyna, azytromycyna i klarytromycyna) oraz leki alternatywnie stosowane w przypadkach nietolerancji na makrolidy, jak trimetoprim-sulfametoksazol czy kwas nalidyksowy, mając na uwadze pojawiające się w ostatnim czasie na świecie szczepy oporne na erytromycynę. Okazało się, że wszystkie analizowane izolaty kliniczne *B. pertussis* były wrażliwe na badane chemioterapeutyki, które to mogą być z powodzeniem stosowane w leczeniu krztuśca.

Przedstawione w rozprawie wyniki zostały bardzo szczegółowo skonfrontowane z danymi literaturowymi w rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Każdy aspekt wyników został dogłębnie omówiony, a postawione założenia umiejętnie zweryfikowane. Z dużym zainteresowaniem czytałam tą część rozprawy i chciałabym podkreślić dużą dojrzałość naukową Doktoranta i znajomość problematyki związaną z immunoprofilaktyką krztuśca.

Czytając Dyskusję nasunęło mi się kilka pytań, proszę o ustosunkowanie się do nich Doktoranta:

1. Jakie inne antygeny mogłyby być wykorzystane w szczepionkach aP przeciw krztuścowi ? Wspomniał Pan o tym we Wstępie, prosiłabym jednak o szerszy komentarz.
2. Czy wśród innych patogenów, chociażby laseczki tężca czy maczugowca błonicy, których antygeny obok antygenów krztuśca są obecne w powszechnie stosowanych skojarzonych szczepionkach DTP, zaobserwowano zjawisko „escape mutants", czyli pojawiania się nowych szczepów o nowych wariantach antygenowych zdolnych do krążenia w populacji ludzkiej pomimo wysokiego poziomu szczepień ?
3. Jaki może być powód rzadko występujących w populacji *B. pertussis* szczepów erytromycynoopornych w dobie narastającej antybiotykooporności ?

Podsumowując, wyrażam duże uznanie dla osiągnięć Pana mgr. Macieja Polaka. Przedstawione w rozprawie badania reprezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą nowe, ważne treści, które umożliwiają poznanie kierunku ewolucji polskiej populacji *B. pertussis*, będącej konsekwencją zmian adaptacyjnych zachodzących w komórkach pałeczek krztuśca w celu uniknięcia poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej.

Rozprawa doktorska Pana mgr. Macieja Polaka przedstawiona w postaci rozprawy reprezentuje wysoki poziom naukowy i wnosi oryginalny wkład do bardzo ważnego obszaru wiedzy jakim jest mikrobiologia medyczna, epidemiologia i wakcynologia.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 310, faks: 22 55 41 402
e-mail: araczko@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz.595 z póź. zm.) i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna. Zatem, wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny o dopuszczenie Pana mgr. Macieja Polaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę zakres prowadzonych badań, wartość naukową uzyskanych wyników oraz walory poznawcze wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

dr hab. Adrianna Raczkowska

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 310, faks: 22 55 41 402
e-mail: araczko@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl