Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna

Pana mgr inż. Macieja M. Polak

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

Szczepienia są wciąż najskuteczniejszą i najpowszechniejszą formą profilaktyki mającej na celu zapobieganie występowaniu wielu chorób zarówno bakteryjnych jak i wirusowych na całym świecie. Na skuteczność szczepień zasadniczy wpływ ma rodzaj i skład szczepionek oraz programy szczepień stosowane w danym kraju. Jednym z groźniejszych patogenów dróg oddechowych jest Gram-ujemna pałeczka *Bordetella pertussis,* patogen wyłącznie ludzki, powodujący ostrą chorobę układu oddechowego zwaną krztuścem (dawniej – kokluszem). Wprowadzenie powszechnych szczepień w latach 40. w Stanach Zjednoczonych i 50-60. XX wieku w pozostałych krajach spowodowało gwałtowny spadek zachorowań na krztusiec. Niestety już w kolejnych dekadach ubiegłego wieku w wielu krajach zaobserwowano coraz większy i niebezpieczny wzrost zachorowań, w Polsce od połowy lat 90. Zjawisko to powiązano z wygasaniem poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej, zastępowaniem szczepionek całokomórkowych wP przez szczepionki bezkomórkowe aP oraz z mechanizmami adaptacyjnymi *B. pertussis.* Dotychczas opisane mechanizmy adaptacyjne *B. pertussis* obejmują: polimorfizm genów kodujących wysoce immunogenne czynniki zjadliwości, wzrost poziomu wytwarzania toksyny krztuścowej oraz utratę zdolności do wytwarzania niektórych antygenów wchodzących w skład szczepionek przeciw krztuścowi. Do tej pory wciąż trwają badania nad problemem presji selekcyjnej wywieranej przez składniki szczepionek bezkomórkowych stosowanych w danych krajach na występowanie i rozprzestrzenienie w populacji ludzkiej szczepów, które utraciły zdolność wytwarzania antygenów szczepionkowych. Poznanie i zrozumienie przyczyn występowania szczepów pozbawionych najważniejszych czynników zjadliwości, w tym będących antygenami szczepionek aP, wymaga stałego monitorowania zmienności genetycznej szczepów krążących w różnych populacjach. Ponadto nadzorowanie zmian zachodzących

wśród izolatów uzyskanych od osób chorych stanowi zalecany element optymalizacji strategii szczepień przeciw krztuścowi.

Rozprawa doktorska mgr Macieja Polak wpisuje się w ten ważny i aktualny temat. Poświęcona jest analizie problemu w dziedzinie medycyny, w zakresie dotyczącym zmian fenotypowych i genotypowych szczepów *B. pertussis* izolowanych od chorych, w tym wypadku w Polsce, na przestrzeni lat 1959-2016 w odniesieniu do zmian składu stosowanych szczepionek i programu szczepień. Analiza ta obejmowała: badanie zdolności izolatów do wytwarzania antygenów szczepionkowych i charakterystykę genetycznych przyczyn warunkujących ich brak u danych szczepów, ocenę częstości występowania izolatów niewytwarzających antygenów szczepionkowych, ocenę dominujących serotypów oraz ocenę lekowrażliwości izolatów. Materiał do badań stanowiły 193 izolaty *B. pertussis* uzyskane od osób chorych na krztusiec w Polsce w okresie 1959-2016, w tym 22 izolaty z ostatnich dwóch lat badań tj. 2014-2016, oraz 10 szczepów szczepionkowych stosowanych, obecnie (trzy szczepy) lub w przeszłości, tj. przed 1978 r. (7 szczepów), do produkcji polskiej całokomórkowej szczepionki przeciw krztuścowi (DTP, IBSS BIOMED S.A.). Spośród 10 analizowanych szczepów szczepionkowych 6 zostało wyizolowanych od osób chorych w Polsce, a pozostałe pochodziły z Jugosławii (n=3) oraz Holandii (n=1). W części pracy dotyczącej serotypowania bakterii materiał badany został poszerzony o 14 różnych serii siewnych szczepów szczepionkowych aktualnie stosowanych do produkcji szczepionki DTP: 9 serii szczepu 629, 3 serie szczepu 186 oraz 2 serie szczepu 606. Przeprowadzone przez Pana mgr Macieja Polak badania tak dużej grupy szczepów, zarówno klinicznych jak i szczepionkowych, stanowią niezmiernie cenną bazę danych. W Polsce nie prowadzona jest rutynowa diagnostyka krztuśca metodą hodowli co powoduje brak izolacji szczepów klinicznych *B. pertussis*. Kolekcja szczepów z NIZP-PZH które stanowiły materiał badawczy w przewodzie doktorskim mgr Macieja Polak jest unikatowa. Ponadto w Polsce od lat 60. XX wieku aż do dnia dzisiejszego szczepienia podstawowe przeciw krztuścowi prowadzone są przy użyciu szczepionki całokomórkowej (wP), podczas gdy w innych krajach rozwiniętych szczepionki wP zostały zastąpione szczepionkami bezkomórkowymi (aP). Dodatkowo w odróżnieniu do innych państw skład polskiej szczepionki wP podlegał wielokrotnym zmianom – dotyczyły one zarówno stosowanych szczepów szczepionkowych, jak i całkowitej ich liczby (od kilkunastu szczepów w latach 1960-1967 do 3 stosowanych niezmiennie od 1978 roku). Do 1976 roku nawet poszczególne serie szczepionki DTP produkowane w danym roku różniły się pod względem składu szczepów szczepionkowych. Tak duża różnorodność stanowiła dodatkowe utrudnienie rozprawy doktorskiej.

W rozprawie doktorskiej Pan mgr Maciej Polak wykonał także typowanie genetyczne 22 klinicznych izolatów pochodzących z ostatnich lat 2014-2016 przy użyciu trzech metod tj. PFGE, MLST oraz MLVA. Niezmiernie cenne i zasługujące na podkreślenie jest przeprowadzenie przez Doktoranta szerokiej analizy wyników genotypowania tymi trzema metodami dla 22 izolatów z danymi uzyskanymi dla izolatów wyosobnionych we wcześniejszych latach 1959-2013, a przedstawionych w pracach Mosiej i współautorów. Doktorant przeanalizował również potencjał różnicujący użytych metod genotypowania w zależności od okresu izolacji badanych szczepów. Analizie poddał grupy izolatów z lat 1959-1968 (n=39), 1970-1977 (n=15), 1995-1999 (n=77), 2000-2007 (n=36) oraz 2010-2016 (n=26), łącznie 193 izolaty.

Rozprawa jest bardzo obszerna, liczy 241 stron druku, a jej układ jest typowy. Napisana jest w bardzo przystępny sposób a jej logiczny układ ułatwia czytelnikowi śledzenie realizacji celów postawionych w pracy oraz dogłębną analizę uzyskanych wyników.

W 37-stronnicowym Wstępie do rozprawy Doktorant rzeczowo przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą czynnika etiologicznego krztuśca tj. *B. pertussis*, jego diagnostyki, epidemiologii krztuśca w Polsce oraz na świecie, przyczyn wzrostu zachorowań oraz zagadnienia profilaktyki krztuśca. Przedstawia również nowe strategie zapobiegania zachorowaniu u noworodków, niemowląt i osób starszych. Szczególnie cenna dla czytelnika jest dogłębna analiza czynników zjadliwości *B. pertussis* z uwzględnieniem ich obecności jako składników szczepionek. Wstęp stanowi samodzielną część rozprawy, jest doskonałą teoretyczną podstawę pracy doktorskiej i w pełni uzasadnia wybór tematyki badawczej pracy.

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej została wykonana prawidłowo. Eksperymenty zostały zaplanowane logiczne z jasno postawionym celem. W recenzowanej pracy doktorskiej zastosowano cały szereg metod zarówno serologicznych (Western blot, ELISA), genetycznych (PCR, RT-PCR, sekwencjonowanie, PFGE, MLST, MLVA) jak i mikrobiologicznych (określenie lekowrażliwości metodą E-testów i metodą krążkowo-dyfuzyjną). Szczególnie cenne jest wykrywanie obecności antygenów szczepionkowych u testowanych szczepów metodami serologicznymi wykorzystując metodę Western blot lub ELISA, a następnie wyjaśnienie metodami genetycznymi przyczyn warunkujących brak ich wytwarzania. Prawidłowo przeprowadzono i zinterpretowano genotypowanie izolatów aż trzema metodami tj. PFGE, MLST i MLVA. Stosowanie tak rozmaitych, prawidłowo dobranych metod świadczy o bardzo dobrym opanowaniu szerokiego warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktoranta.

Uzyskane w pracy wyniki Doktorant przedstawił w 14 tabelach i na 37 rycinach. Dodatkowo w rozdziale pracy Załącznik przedstawiono obszerną tabelę, w której zebrano wszystkie wyniki uzyskane w pracy doktorskiej dla badanych szczepów oraz dane genotypowania izolatów z lat 1959-2013 opisane we wcześniejszych pracach Mosiej i współautorów, a które to zostały poddane przez Doktoranta analizie bioinformatycznej w odniesieniu do izolatów z lat 2014-2016. Załącznik stanowi cenne uzupełnienie pracy, umożliwia szybkie prześledzenie zarówno informacji dotyczących izolacji szczepu, zdolności wytwarzania antygenów szczepionkowych oraz typowania genetycznego. Wszystkie tabele i ryciny zawarte w pracy są czytelne, a zamieszczenie ich jest w pełni uzasadnione (z wyjątkiem ryciny 13 która nie zawiera wyników badań a jedynie informacje dotyczące pochodzenia szczepów *B. pertussis* Prn(-), i według recenzenta powinna znajdować się w Dyskusji).

Doskonałej jakości są: (I) zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych produktów reakcji PCR uzyskanych zarówno przy poszukiwaniu genów kodujących czynniki zjadliwości, poszukiwaniu mutacji w genie 23S rRNA warunkującej oporność na erytromycynę, jak i fragmentów genów w przebiegu metodyki typowania MLST oraz MLVA, (II) zdjęcia wyników badania wytwarzania antygenów metodą Wester blot, (III) zdjęcia w rozdziałów genomów badanych izolatów w zmiennym polu elektrycznym, (IV) dendogramy przedstawiające podobieństwo izolatów w metodzie PFGE. Czytelne i pomocne w interpretacji wyników są schematy wykazanych przez Doktoranta zmian we fragmentach DNA izolatów, u których stwierdzono brak wytwarzania antygenów szczepionkowych Prn oraz jednego szczepu niewytwarzającego czynnika kolonizacji tchawicy. Niezmiernie cenne są także ryciny przedstawiające porównanie dla szczepów z różnych okresów izolacji wyników genotypowania metodą PFGE oraz częstości występowania poszczególnych alleli i wariantów loci odpowiednich VNTR stosowanych w metodach typowania MLST i MLVA. Załączone na końcu pracy Spis Rycin oraz Spis Tabel ułatwiają syntetyczne zapoznanie się z wynikami uzyskanymi przez Doktoranta.

Dokładna analiza uzyskanych wyników oraz ich szeroka dyskusja, połączona ze wskazaniem uzyskanych przez innych badaczy zbliżonych rezultatów, została przeprowadzona w sposób poprawny, z wyczerpującą analizą dostępnego piśmiennictwa przedmiotu. Zacytowane piśmiennictwo jest obszerne i aktualne, obejmuje 391 pozycji. Ponadto w pracy podano 6 adresów do stron internetowych, w tym dotyczących szczepień na krajowej stronie NIZP-PZH, aktualnych informacji na stronach WHO, a także do genetycznej bazy danych w NCBI GenBank i bazy MLVA dla *B. pertussis*. Za szczególnie cenną uważam

jest zawartą w dyskusji analizę wytwarzania czynników zjadliwości (będących jednocześnie antygenami szczepionkowymi) przez izolaty *B. pertussis* w kolejnych dekadach od 1959 r. do 2016 r, w kontekście zmian w składzie szczepionek stosowanych w tym czasie w Polsce i w odniesieniu do danych z innych krajów.

Wnioski wypływające z pracy, postawione na podstawie rzetelnie przeprowadzonych badań i analiz bioinformatycznych, uważam za prawidłowe i uzasadnione (z wyjątkiem wniosku nr 7 – wyjaśnienie przedstawiono w dalszej części recenzji).

W rozprawie doktorskiej Pan mgr Maciej Polak w wyniku wykonanych eksperymentów i przeprowadzonej analizy bioinformatycznej uzyskał szereg interesujących wyników, spośród których za najważniejsze uważam:

1. Przebadanie kolekcji 193 szczepów klinicznych *B. pertussis* zgromadzonych od 1959 r. do 2016 r. oraz 10 szczepów szczepionkowych (stosowanych dawniej i obecnie) w zakresie zdolności wytwarzania 6 czynników zjadliwości w tym 4 stosowanych jako antygeny w szczepionkach bezkomórkowych i wyjaśnienie na poziomie genetycznym przyczyn warunkujących brak ich obecności. Doktorant wykazał u 4/193 izolatów klinicznych brak wytwarzania pertaktyny (Prn) – białka błony zewnętrznej bakterii o właściwościach immunogennych. Pertaktyna jest składnikiem szczepionek bezkomórkowych stosowanych w Polsce w latach 2000-2015, w tym 4/7 szczepionek aP przeznaczonych do szczepień podstawowych noworodków i uzupełniających dla dzieci do 2 r.ż. oraz 3/4 szczepionek aP do szczepień przypominających dla młodzieży i osób dorosłych. Izolaty Prn(-) pochodziły z lat 2012-2015. Pozostałe antygeny *B. pertussis* wchodzące w skład szczepionek bezkomórkowych, tj. toksyna krztuścowa, hemaglutynina włókienkowa, podjednostki główne budujące fimbrie – Fim2 i/lub Fim3, były wytwarzane przez wszystkie badane szczepy. Doktorant w dyskusji celnie wskazuje przyczyny selekcji szczepów Prn(-) oraz zmian w serotypach badanych izolatów (wykazał 3 serotypy Fim2, Fim3 i Fim2,3) analizując ich występowanie w kontekście programów szczepień realizowanych w Polsce oraz innych krajach. Doktorant wysunął uzasadniony wniosek w pracy, iż wykrycie wśród izolatów klinicznych *B. pertussis* szczepów niewytwarzających pertaktyny, tj. antygenu występującego w składzie większości stosowanych w Polsce szczepionek bezkomórkowych (aP), wskazuje na pojawienie się w polskiej populacji pałeczek krztuśca nowego mechanizmu adaptacyjnego, który może obniżać skuteczność powszechnie stosowanych w kraju bezkomórkowych szczepionek przeciw krztuścowi.

2. Wykazanie podstaw molekularnych które uwarunkowały brak wytwarzania ważnych czynników zjadliwości tj. pertaktyny (u 4 polskich izolatów klinicznych *B. pertussis*) oraz czynnika kolonizacji tchawicy TcfA (u jednego szczepu). Brak wytwarzania pertaktyny przez 4 polskie izolaty *B. pertussis* było efektem: 1) insercji elementu IS*481* (o wielkości 1049 pz) w obrębie genu *prn* (co zaobserwowano u jednego izolatu), 2) tranzycji cytozyny na tyminę w pozycji 223 genu *prn* i powstaniu przedwczesnego kodonu stop w mRNA (tzw. mutacja nonsensowna) – u jednego izolatu, oraz 3) inwersji promotora *prn* – u dwóch izolatów. Natomiast u jednego szczepu TcfA(-) doszło do delecji dużego fragmentu DNA obejmującego cały gen *tcfA*. Zmiany takie w genomach *B. pertussis* zostały już wcześniej opisane u szczepów pochodzących z innych rejonów świata. Stwierdzona przez Doktoranta różnorodność mechanizmów molekularnych prowadzących do powstania fenotypu Prn(-) u polskich izolatów może świadczyć o oddziaływaniu na bakterie silnej presji selekcyjnej, warunkującej utratę zdolności wytwarzania pertaktyny.

3. Zastosowanie trzech metod genotypowania tj. PFGE (z użyciem dwóch różnych enzymów restrykcyjnych tj. *Xba*I oraz *Afl*II), MLST oraz MLVA, umożliwiło wykazanie zachodzących zmian w profilach genetycznych *B. pertussis* izolowanych w Polsce na przestrzeni lat 1959-2016. Profile szczepów izolowanych w ostatnim dziesięcioleciu upodabniają się do struktury genetycznej tego patogenu obserwowanej w Europie oraz innych krajach z długą historią szczepień przeciw krztuścowi. Wykazano iż ewoluują w kierunku jednorodności genetycznej w stronę profili PFGE-*Xba*I grupy IV, genotypu MLST *ptxA1-ptxP3-prn2* i profilu MLVA MT-27, co prawdopodobnie może zwiększać przeżywalność bakterii w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi szczepionkami bezkomórkowymi. Zmiany te są najprawdopodobniej wynikiem powszechnego w ostatnich latach stosowania szczepionek aP (jako szczepienia podstawowe oraz przypominające) zarówno w Polsce jak i w innych krajach Europy, i tym samym wskazują na istotną rolę szczepień w kształtowaniu nowego kierunku ewolucji polskiej populacji *B. pertussis*.

4. Wykazanie wrażliwości wszystkich polskich izolatów *B. pertussis*, uzyskanych od chorych w ostatniej dekadzie 2010-2016, na makrolidy (erytromycynę, azytromycynę i klarytromycynę) oraz trimetoprim-sulfametoksazol wskazuje, że w Polsce antybiotyki te mogą nadal być stosowane w leczeniu krztuśca oraz eradykacji *B. pertussis* z dróg oddechowych.

Moje uwagi i sugestie dotyczące rozprawy doktorskiej:

1. Wniosek nr 7 to jedynie przedstawienie znanych prawd o celu w jakim stosuje się te trzy metody genotypowania. Największy potencjał różnicujący w typowaniu genetycznym izolatów wśród użytych w pracy metod ma z definicji PFGE. Bardzo proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tego zagadnienia w trakcie publicznej obrony rozprawy. Co wiadomo natomiast o izolowanych na świecie szczepach *B. pertussis* o genotypie MLST *ptxA1-ptxP3-prn2* i profilu MLVA MT-27? Jak powinien brzmieć poprawnie sformułowany wniosek?

2. W Dyskusji na str. 140 w punkcie 7). –
„Oprócz wyżej wymienionych mutacji, za brak wytwarzania pertaktyny u *B. pertussis* odpowiadało wiele innych: ..... 7) bliżej nieopisane mutacje pojedynczego nukleotydu w pozycjach 1185 lub 1479 *prn*." Jeżeli są to pojedyncze mutacje nukleotydowe to powinno być jednocześnie wiadomo jakie są to mutacje. Proszę Doktoranta o wyjaśnienie.

3. Presja szczepień jest wywierana na szczepy bakteryjne a nie na białka czy antygeny.

4. Drobne błędy np. nazwa genu powinna być pisana kursywą, niezgrabności stylistyczne zdań, niepoprawne sformułowania – skróty myślowe (np. genetycznie odtoksyczniona Ptx, ogólna rekrutacja makrofagów), niezgodność wielkości powstającego fragmentu DNA w reakcji PCR np. 575 pz (tekst 3.4.2) a w tabeli 3 jest 498 pz., błędne cytowanie tabeli (w rozdziale 3.6.3 powinna być tabela 10 a nie tabela 8) (w rozdziale 4.3.5 powinna być tabela 24 a nie tabela 31), niepoprawny tytuł w tabeli 12, błędny zakres OD w rozdziale 4.2.5.1, w rozdziale 4.4.3 powinno być średnica strefy zahamowania wzrostu. Wszystkie zauważone błędy zostały przedstawione Doktorantowi.

Reasumując – uwagi, których zgłoszenie jest obowiązkiem recenzenta, nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną całej dysertacji, którą oceniam bardzo wysoko. Rozprawa ta wnosi nowe elementy do zasobu wiedzy o adaptacji (w kontekście zmian fenotypowych i genotypowych) szczepów *B. pertussis* wywołujących krztusiec na terenie Polski w odniesieniu do rodzaju i składu szczepionek stosowanych w naszym kraju w różnych okresach od 1959 r. do 2016 roku. Doktorant wykazał istotny wpływ presji selekcyjnej coraz powszechniej stosowanych w Polsce szczepionek bezkomórkowych na kierunek ewolucji *B. pertussis* prowadzący do możliwości rozpowszechnienia się zakażeń szczepami Prn(-) oraz zaobserwował dążenie w kierunku jednorodności genetycznej wśród izolatów z ostatniej dekady, podobnie jak ma to miejsce w innych europejskich krajach.

Wniosek:

W związku z powyższym stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora i zgodnie z art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr inż. Macieja M. Polak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, której wartość merytoryczną oraz znaczenie dla monitorowania zmienności szczepów i skuteczności szczepień zapobiegających krztuścowi oceniam bardzo wysoko.

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
A. Laudy
dr hab. n. farm. Agnieszka A. Laudy

Warszawa, dnia 30.09.2020 r.