prof. dr hab. Andrzej Gładysz
specjalista chorób wewnętrznych
i chorób zakaźnych, emerytowany
profesor zwyczajny UMW i aktualnie zatrudniony
w Collegium Witelona w Legnicy.
zam. 53-134 Wrocław ul. Brossa 30

Wrocław, dn.17.01.2022r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Hallmann pt. Molekularne determinanty lekooporności szczepów wirusów grypy wywołujących zakażenia u ludzi w różnych sezonach epidemicznych w Polsce., zlecona mi decyzja Rady Naukowej NIZP PZH – Państwowego Instytutu Badawczego (pismo N-NP.-461/2221).

Ostatnie dekady dostarczyły przykładów, nie tylko z różnych obszarów świata ale również z naszego kraju, rozprzestrzeniania się chorób spowodowanych czynnikami biologicznymi w tym będących wynikiem przełamywania barier między gatunkowych. Wiąże się to nie tylko z globalnymi zmianami klimatycznymi , ale bardziej z ingerencją człowieka w ekosystemy czego przykładem są wcześniejsze epidemie grypy w tym odzwierzęce, co jest przykładem odnawiania się starego problemu zdrowia publicznego. Wynikało to z faktu, że wiele wirusów krąży np. wśród drobiu domowego i świń których płuca też posiadają receptory dla wirusa grypy.
Współcześnie zagrażają nam nie tylko wirusy, czego wyrazem jest obecna pandemia Covid-19, czy bakterie ale też i inne mikroorganizmy jak np. pasożyty które w sprzyjających okolicznościach są w stanie pokonać barierę gatunkowa odgraniczająca świat zwierzą od ludzi.

Epidemie chorób zakaźnych dziesiątkują ludzi niemal każdego roku czego przykładem jest współcześnie tocząca się pandemia. Grypę u ludzi wywołują dwa rodzaje wirusa : wirusy typu A i typu B. Z ostatnich badań i zgodnych wypowiedzi wielu ekspertów wynika, że zastosowane, w związku z pandemią Covid-19 restrykcje p/epidemiologiczne (dystans, wzmożona dezynfekcja i noszenie masek) ograniczyły aktywność dwóch szczepów wirusa grypy. Od marca 2020roku trudno na przykład odnotować podtyp H3N2 wirusa grypy typu

A czy linię B/YAMAGATA-wirus grypy typu B nie ma podtypów. Przyczyny tego zjawiska są intensywnie aktualnie badane. Jednocześnie w obecnym sezonie epidemicznym, nadal mimo wcześniejszych obciążających grypę doświadczeń typu: ciężkiego przebiegu choroby czy powikłań ze strony układu oddechowego, krążenia i nerek chorobę często utożsamia się z przeziębieniem i co niestety nie sprzyja zachęcie do zaszczepieni.

Z kolei trwające badania nad wprowadzeniem nowych leków p/grypowych i ich skutecznością zwracają uwagę na coraz powszechniejszy współcześnie problem lekooporności wirusów grypy, co szczególnie dotyczy inhibitorów neuraminidazy. Wiąże się z tym kolejne istotne zadanie którym jest konsekwentne monitorowanie problemu lekooporności. Wiąże się to z konieczną, ścisłą współpracą ze Światową Siecią Wrażliwości na Inhibitory Neuraminidazy a także z Europejską Siecią Nadzoru ds. Zarządzania Opornością na Leki Przeciwwirusowe, które zajmują się równocześnie badaniami mechanizmów tej oporności i to zarówno w zakresie geno-jak i feno typowym.

Mając powyższe na uwadze podjęcie przez Doktorantkę mgr Ewelinę Hallmann właśnie tematu lekooporności szczepów wirusów grypy krążących w Polsce jest bardzo celowe i w pełni uzasadnione, a także aktualne zarówno z poznawczego jak i epidemiologiczno-klinicznego punktu widzenia.

Założonym celem pracy było uzyskanie odpowiedzi na 4 postawione przez Doktorantkę hipotezy badawcze a mianowicie: czy i w jakim stopniu oraz zakresie ewolucyjność i tym samym mutagenność wirusów grypy wpływa na zróżnicowanie oporności na leki szczepów wirusów wywołujących zachorowania w poszczególnych sezonach epidemicznych, a także czy i na ile częstość występowania mutacji wśród szczepów wirusów ma wpływa na rozwój oporności na inhibitory neuraminidazy i na ile jest różna w określonych sezonach epidemicznych oraz czy można przyjąć , że w sezonach ze zwiększoną zachorowalnością więcej szczepów będzie nabywało tę oporność. Wg recenzenta to założenie jest szczególnie uzasadnione i logiczne epidemiologicznie.

Również hipoteza zakładająca ,że wśród dzieci zapadających na grypę sezonową można spodziewać się zwiększonej częstości mutacji wśród szczepów wirusa grypy jest ciekawa szczególnie , że doktorantka wiąże to ze stopniem zróżnicowania rozwoju układu immunologicznego zależnego od wieku u dzieci. Jest to hipoteza wartościowa szczególnie poznawczo choć może się wydawać oczywistą.

Także użyta w doktoracie metodyka do izolacji materiału genetycznego wirusa określenia jego typów i subtypów oraz do wykrywania mutacji w genie neraminidazy a następnie sekwencjonowania próbek z wykrytymi mutacjami oraz wybór systemu analizowania uzyskanych wyników są zdaniem recenzenta optymalne dla jakości przeprowadzonych badań.

Jako recenzent, mając powyższe na uwadze, stwierdzam, że podjęcie przez doktorantkę samego tematu było celowe i jest przydatne praktycznie oraz wartościowe poznawczo.

Rozprawa ma układ klasyczny, jest bogato ilustrowana tabelami i rycinami, co, uruchamiając wyobraźnię czytelnika, ułatwia zgłębienie treści myślowych badacza.

I tak, poczynając od tytułu rozprawy sugerowałbym w tytule zamianę słowa....różnych...na : w wybranych sezonach epidemicznych w Polsce. Uważam ,że wybór właśnie określonych 3 i sąsiadujących ze sobą sezonów (2016/2017, 2017/2018 i 2018/2019) był podyktowany racjonalnością tj. zróżnicowaniem etiologiczno-epidemiologicznym materiału biologicznego jak i dostateczną jego ilością.

We wstępie doktorantka charakteryzuje wirusy grypy, opisuje znaczenie epidemiczne ewolucji wirusa grypy i mechanizmy wpływające na ten proces co tym samym mogłoby tłumaczyć uwarunkowania determinujące powstawanie oporności poszczególnych szczepów wirusa grypy na leki.

W Polsce zarówno sam problem lekooporności nie tylko wirusów grypy ale tez innych patogenów, a także skala uodpornienia populacji p/grypie nie są zadowalająco rozpoznane czego przykładem jest choćby wysoki stopień oporności na używane antybiotyki. Zatem i te względy podkreślają wagę poznawczą tematu podjętego przez Doktorantkę. Dalej, we wstępie Doktorantka dokonuje przeglądu dostępnych leków p/wirusowych wraz z analiza mechanizmów ich działania zależnego od typu (A,B) i szczepów wirusów grypy. Przedstawia i uzasadnia też kryteria wyboru strategii leczenia i oceny jego skuteczności, co jest związane i uwarunkowane konsekwentnym metodycznym monitorowaniem zjawiska.
Z kolei wprowadzając czytelnika w opisy mechanizmów rozwoju oporności lekowej podkreśla wagę i rolę współpracy Zakładu Badania Wirusów Grypy NIZP PZH-PIB nie tylko z powołana przez WHO Siecią Globalnego Nadzoru nad Grypą (GISRS) ale przede wszystkim z wymienionymi wcześniej sieciami światowymi i europejskimi w nawiązaniu współpracy z którymi mogą przyczynić się wykonane i mam nadzieje wykonywane nadal przez Doktorantkę badania.

Materiał wykorzystany w rozprawie obejmuje próbki z 3 sezonów epidemicznych różniących się typem wirusa dominującego. W 2016/2017r i 2018/2019r. były nimi: wirusy grypy typu A (H3N2) i odpowiednio (AH1N1pdm09) natomiast w sezonie dzielącym poprzednie (2017/2018r.) wirus typu B co zdaniem recenzenta pogłębia i obiektywizuje oraz uniwersalizuje oceny analiz uzyskanych wyników, uzasadniając tym samym słuszność hipotetycznych założeń badawczych.

Liczba zidentyfikowanych zachorowań z badanego materiału klinicznego i przeanalizowanego w wymienionych sezonach była adekwatnie porównywalna ilościowo mimo zauważalnych różnic sezonowych liczbowych i odsetkowych

potwierdzonych zakażeń. Próbki pochodziły od pacjentów w wieku od 1 do 89 roku życia. W większości przypadków były to wymazy z nosa i gardła jak tez płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Łącznie analizie poddano 258 próbek , w czym 91 dotyczyło pacjentów zakażonych AH1N1 /pdm09 ; 105 pacjentów zakażonych wirusem AH3N2 oraz 62 zainfekowanych wirusem grypy typu B. Ostatecznie po wykonaniu niezbędnych badań sprawdzających zawartość materiału genetycznego i po sklasyfikowaniu wirusów analiza objęto 192 próbki z materiałem klinicznym w tym : 36 pochodzące od pacjentów zakażonym wirusem grypy AH1N1/pdm09 i 100 z materiałem zakażonym AH3N2 oraz 57 próbek uzyskanych od pacjentów zakażonych wirusem grypy typu B.

Badania przeprowadzono, jak już wcześniej była o tym mowa, z użyciem metod biologii molekularnej, z elektoforeza uzyskanych produktów i sekwencjonowaniem DNA metoda Sangera.

Wyniki opracowano posługując się zarówno metodami statystyki opisowej jak też testami statystycznymi wykorzystując pakiet statystyczny SPSS12.OPL dobierając je zgodnie z obowiązującymi zasadami i kryteriami statystycznymi.

Wyniki badań zostały przedstawione opisowo i ilustrowane różnymi formami graficznymi (tabele, ryciny, mapki) i omówione przejrzyście. Zawieraja zarówno dane dotyczące liczby zachorowań, podejrzeń o zakażenie wirusami: grypy lub schorzeń grypopodobnych a także liczby skierowań do szpitala oraz liczby zgonów i dominującego szczepu w analizowanym sezonie.

Tłem do istoty przeprowadzonym badań sa tez dane pochodzące z tych samych 3 sezonów epidemicznych, a ilustrujące ilość podejrzeń i zachorowalność oraz zapadalność na grypę w 4 przedziałach wiekowych dobranych wg zasad działania p/ epidemicznego. Wyniki te były jednocześnie raportowane do Europejskiego centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób oraz do WHO.

W obu sezonach epidemicznych grypy wywołanej typem A wirusa zarówno mutacje jak i te niosące lekooporność występowały stosunkowo często i mimo różnych liczebnościowo próbek (36/100) stwierdzano je odpowiednio w : 86,11% (sezon 2016/2017) i 89% (sezon 2018/2019).

W sezonie 2016/2017 z dominującym wirusem subtypu AH3N2 w próbkach z mutacjami z lekoopornością związanych było 25 %, ale 22% z ogólnie przebadanych **nosiło** mutację lekooporne przy tym , co ważne wykryto 26 typów mutacji lekoopornych. W badanym 3 sezonie (2018/2019) łącznie wykrytych mutacji było więcej i też więcej (50%) stwierdzono mutacji odpowiadających za lekooporność a 58% próbek z mutacjami **niosącymi** lekooporność. Zidentyfikowano 28 tego typu mutacji.

Natomiast wśród próbek z potwierdzonym wirusem typu B w ogólnej ilości (72%) wykrytych mutacji, mutacje odpowiadające za lekooporność

stwierdzono w 66% próbek, ale 47% próbek tej całej badanej grupy i tez w tej grupie zidentyfikowano 67 typów mutacji związanych z lekoopornością.
Z kolei , biorąc pod uwagę całość materiału 193 przebadanych próbek, warto zaznaczyć, że mutacje niosące lekooporność wśród zidentyfikowanych wirusów grypy wykryto w 67 próbkach , co stanowiło 35% badanego materiału genetycznego.

Ważnym stwierdzeniem wynikającym z analizy uzyskanych wyników jest, z jednej strony, brak istotnych statystycznie różnic w rozpowszechnieniu oporności podtypami AH1N1/pdm09 (5,4%) i AH3N2 (6,3%) ale niestety istotnie większy odsetek (19,1%) występowania mutacji lekoopornych w przypadku wirusów typu B niż typu A(5,8%) . Wynik ten jest o tyle ciekawy i zdaniem recenzenta mógłby być inspirującym do rozszerzenia badań, że pojawiają się informacje w czasie obecnej pandemii Covid-19 tj. od marca 2020r o niewykrywaniu dwóch podtypów wirusa grypy: AH3N2 i typu B/YAMAGATA. Jest to o tyle ciekawe, ze jak wynika również z badań Doktorantki podtyp AH3N2 mocno mutuje, a przed pandemia ulegał ciągłej ewolucji genetycznej. Między innymi eksperci z Mount Sinai Schooll of Medicine NY (USA) regularnie analizują bazy danych pod tym kątem gdyż potwierdzenie faktu nawet czasowego zniknięcia niektórych szczepów wirusa grypy ma znaczenie w corocznym przygotowywaniu szczepionki p/grypie.

Z kolei różnice odnośnie przeciętnych liczb, mutacji niosących lekooporność w obrębie 3 porównywanych grup okazały się być istotnymi statystycznie , również odsetek ~~ireb~~ próbek z wykrytymi mutacjami niosącymi lekooporność był istotnie bardziej niekorzystny dla wirusa typu B (47% wobec 29%) dla wirusa grypy typu A.

Mimo potwierdzonej hipotezy zakładającej zróżnicowanie genetyczne poszczególnych typów wirusa grypy i związek z podatnością do tworzenia mutacji ~~nie~~ wyniki potwierdziły spodziewanej większej skłonności do pojawiania się mutacji niosących lekooporność, wśród zakażonych i chorujących dzieci na grypę.

W dyskusji Doktorantka odnosi uzyskane przez siebie wyniki badan do danych literaturowych, podkreśla udział i role Krajowego Ośrodka ds. Grypy w Zakładzie Badania Wirusów grypy w NIZP, PZH-PIB w opracowywaniu corocznych strategii walki z epidemiami sezonowymi w Polsce oraz jego wkład we współpracę z adekwatnymi instytucjami WHO. Nawiązuje przy tym, również do udziału Zakładu w rozwiązywaniu problemów nakładania się zakażeń wirusa grypy na Covid-19. Szeroko merytorycznie dyskutuje problem lekooporności wirusów i uzasadnia wynikami swoich badań konieczność rozwinięcia działalności systemu nadzoru nad grypą który włączy Polskę do obu wcześniej wymienionych sieci (światowego i europejskiego) nadzoru. Jako recenzent w pełni popieram powyższe dążenie i uważam jako lekarz specjalista chorób zakaźnych dążenie to za sprawę priorytetową z racji znaczenia dla zdrowia publicznego.

Prace kończą: piśmiennictwo w liczbie 171 pozycji, i aktualnego oraz starannie dobranego do badanego tematu w którym znajdują się najistotniejsze publikacje krajowe i zagraniczne-angielskojęzyczne. Znajdują się tam też załączniki dokumentujące wykonane badania.

Zabrakło jedynie streszczenia zarówno w języku polskim jak i angielskim.

Oceniając całość rozprawy stwierdzam, że Doktorantka osiągnęła założony cel. Dobór piśmiennictwa, wstęp i dyskusja dowodzą dociekliwości poznawczej i wnikliwości badawczej. Praca jest oryginalnym, inspirującym do dalszych badań dziełem naukowym , aktualizującym współczesną wiedzę.

Podsumowując, stwierdzam iż przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia warunki określone przepisami art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz.U.z 2017r) i tym samym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Zdrowia Publicznego PZH-Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Eweliny Hallmann do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Andrzej Gładysz

prof. dr hab. Andrzej Gładysz
specjalista chorób wewnętrznych i zakaźnych
Wrocław, ul. Joannitów 10/12, pok. 309
tel. 501 086 092 tel. 9624419