

Warszawa, 2023.06.27

Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej
Zakład Chorób Ptaków, Zwierząt Egzotycznych i Ryb
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
02-786 Warszawa
ul. Ciszewskiego 8

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr Katarzyny Pasik pod tytułem

„ZASTOSOWANIE WYSOKOPRZEPUSTOWEGO SEKWENCJONOWANIA DO
KONTROLI JAKOŚCI WYBRANYCH SZCZEPIONEK DLA DROBIU”

Oceny dokonano na zlecenie Rady Naukowej Państwowego Instytutu
Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zgodnie z jej uchwałą
z dnia 26 04 2018 roku, na podstawie materiałów przekazanych przez Pana prof. dr. hab.
Dariusza Bednarka przewodniczącego Komisji Doktorskiej (Nr pisma BRN-4200/3/23).

Wstęp

Powszechnie uważa się, że szczepienia są najważniejszym i największym osiągnięciem, jakie kiedykolwiek zostało wdrożone w medycynie i weterynarii.

Szczepionki odgrywają główną rolę w redukowaniu negatywnego oddziaływania dewastujących patogenów, a mimo upływu blisko 140 lat, naukowe zasady wakcynologii, opracowane przez francuskiego geniusza Ludwika Pasteura pozostają nadal aktualne. Szczepionki wciąż stanowią najbardziej pożądaną metodę ograniczania niekorzystnych skutków zakażeń niebezpiecznymi zarazkami. Warto przy tej okazji przypomnieć, że pierwsza opracowana przez Pasteura w 1885 roku szczepionka zabezpieczała ptaki przed zachorowaniem na cholere (pasterelozę kur). Od tego też czasu trwają poszukiwania „szczepionki idealnej”, które jednak nie zakończyły się pełnym sukcesem mimo wprowadzania na rynek wciąż bardziej doskonałych bioproduktów chroniących przed chorobami zaraźliwymi. Immunoprofilaktyka jest kluczowym instrumentem zachowania zdrowia i dobrostanu drobiu oraz zapobiegania wybuchom chorób, które mogą mieć poważne negatywne skutki gospodarcze dla sektora drobiarskiego. Kompleksowy program zapobiegania i kontroli chorób, który z zasady zakłada stosowanie szczepień, obejmuje również procedury zarządzania, środki bezpieczeństwa biologicznego i monitorowanie ognisk chorób. Według Adroit Market Research, rynek szczepionek dla drobiu, który w 2022 roku miał wartość 2,1 miliarda dolarów, ma wzrosnąć do 3,65 miliarda dolarów do 2030 roku, przy średnim wskaźniku rocznego wzrostu na poziomie 7,5% w latach 2023-2030. Z biegiem czasu opracowano bardziej skuteczne i ukierunkowane biopreparaty w wyniku wdrażania nowych technologii tworzenia szczepionek i lepszego zrozumienia działania układu odpornościowego.

Od początku istnienia wakcynologii starano się opracować systemy kontroli jakości biopreparatów stosowanych w medycynie i weterynarii. Rozwiązania te w miarę postępu wiedzy coraz bardziej się formalizowały i obecnie na poziomie Unii Europejskiej szczepionki są pod kontrolą Państwowych Laboratoriów Kontroli Produktów Leczniczych. Jak wskazują zestawienia statystyczne, niezbyt często, ale immunologiczne weterynaryjne produkty lecznicze mogą być niedopuszczane do obrotu z powodów wad jakościowych. Postęp wakcynologii i technik diagnostycznych powala na wprowadzanie nowych rozwiązań w kontroli szczepionek, jedną z interesujących propozycji w tym zakresie jest wysokoprzepustowe sekwencjonowanie (High throughput sequencing, HTS).

Ocena pracy doktorskiej

Przedstawiona do oceny praca doktorska „Zastosowanie wysokoprzepustowego sekwencjonowania do kontroli jakości wybranych szczepionek dla drobiu” została wykonana w Zakładzie Farmacji Weterynaryjnej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Domańskiej-Blicharz. Odnótować należy, że o poziom merytoryczny rozprawy dbała także dr Joanna Sajewicz – Krukowska – promotor pomocniczy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Pasik, ma postać klasycznej dysertacji. Jak się to zwyczajowo czyni przy monograficznych opracowaniach na stopień naukowy, Autorka podzieliła swoją dość obszerną pracę, na 9 rozdziałów. Dysertacja posiada typowy układ i zawarta jest na 140 stronach uwzględniając 27 tabel i 30 rycin oraz podzielona jest na następujące rozdziały: wstęp, cel, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, streszczenie, summary, piśmiennictwo oraz suplement, w którym autorka zestawiała szczepy referencyjne z bazy GenBank, wykorzystane do analizy bioinformatycznej szczepów szczepionkowych wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli (Infectious Bronchitis Virus – IBV).

Mimo kilku krytycznych uwag ogólne wrażenie z lektury dysertacji jest, pozytywne i można przyjąć, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Katarzyny Pasik napisana jest dość poprawnym językiem, spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane opracowaniom na stopień naukowy doktora.

Cytowane w pracy doktorskiej piśmiennictwo, zamykające się liczbą 163 publikacji, w tym 18 aktów prawnych, jest wyborem wyselekcjonowanych pozycji literaturowych, choć jak podkreśla sama autorka zagadnieniu zastosowania HTS do oceny szczepionek nie poświęcano dotychczas zbyt dużej uwagi.

Opiniowaną pracę doktorską rozpoczyna obszerny, obejmujący 30 stron wstęp, w założeniu autorki wprowadzający czytelnika w problematykę związaną z różnymi aspektami opracowywania oraz kontroli szczepionek stosowanych w immunoprofilaktyce weterynaryjnej ze szczególnym wykorzystaniem wysoko przepustowego sekwencjonowania. Ten fragment rozprawy, autorka podzieliła na cztery podrozdziały z, których pierwszy omawia bardzo interesującą historię wprowadzania szczepionek dla drobiu w Polsce i kontrolę ich jakości ze szczególnym uwzględnieniem szczepionek stosowanych w zapobieganiu zakaźnemu zapaleniu oskrzeli u kur. Podkreślić należy tutaj, zasługi Profesora Wojciecha Karczewskiego i owym czasie lek. wet. Ewy Karpińskiej, którzy dokonali oceny szczepów szczepionkowych H120 oraz H52 i opracowali jedyne, jak dotychczas krajowe szczepionki (Iboral I i Iboral II) przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, które zostały wprowadzone do praktyki. Badania nad

przystosowaniem komercyjnych szczepów IBV do krajowej produkcji szczepionek zostały rozpoczęte w 1972 roku ubiegłego wieku. Produkcję rozpoczęto w 1982 roku, a ich wytwarzanie zakończono w 1997 roku.

W kolejnych podrozdziałach pracy doktorantka omawia współczesne metody kontroli jakości szczepionek w Europie i w Polsce. Jak wynika z danych umieszczonych na ryc. 3 procentowo blisko 35% immunologicznych weterynaryjnych produktów leczniczych badanych w ramach monitoringu produktów leczniczych znajdujących się w obrocie rynkowym było przeznaczonych dla drobiu. Co stanowiło około połowy produktów przeznaczonych dla wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich. Warto więc podkreślić, że produkcja biopreparatów dla drobiu jest najważniejszym segmentem przemysłu bioweterynaryjnego na świecie.

W podrozdziale 1.3 doktorantka opisuje szczepionki dla drobiu podając ich ogólną charakterystykę, powołując się przy tym na niezwykle ciekawą pracę, której jest współautorką i która potwierdza jej wieloletnie zainteresowanie tematyką szczepionek dla drobiu (Cybulski W., Pasik K., Krasucka D., Łysiak E., Mitura A., Klimowicz A., Tomczyk G., Pietroń W.: *Poultry vaccines available on the Polish market after the harmonization of the pharmaceutical code according to EU legislation: an analysis of trends at the domestic versus global scale. Med. Weter. 2015, 71 (5), 281-285*). Zestawienie to wskazuje, że wśród szczepionek dla drobiu, immunopreparaty stosowane w profilaktyce zakaźnego zapalenia oskrzeli (Infectious Bronchitis -IB) są na pierwszym miejscu wśród chorób wirusowych, natomiast w przypadku chorób bakteryjnych najczęściej stosowane są szczepionki przeciwko salmonellom. Z tego powodu do dalszych badaniach zostały wybrane szczepionki przeciwko IB i *Salmonella* spp. W dalszej części tego podrozdziału autorka krótko omawia budowę wirusa IB ze szczególnym uwzględnieniem budowy genowej. Dydaktyczny schemat budowy cząsteczki wirusa w graficznej formie podała na ryc. 4a. W dalszej części wstępu, w kolejnym podrozdziale opisuje przebieg kliniczny IB, który to akapit jest bardzo krótki, co jednak istotne wskazuje, że zakaźne zapalenie oskrzeli wywołuje bardzo duże straty w branży drobiarskiej na całym świecie (zajmuje drugie na liście przyczyn strat wywoływanych przez choroby zakaźne kur i wyprzedza je tylko grypa ptaków). Nie dziwi zatem, że od dziesiątków lat IB obejmowane jest specyficzną immunoprofilaktyką. Autorka podaje przykładowy program szczepień zaczerpnięty ze strony firmy HY-Line, który należy traktować jako program poglądowy, bowiem w Polsce w odniesieniu do szczepień przeciwko tym dwóm chorobom (IB i salmonellozy) stosowanych jest bardzo wiele, bardzo różnych i nie do końca uzasadnionych merytorycznie programów immunizacji, kurcząt brojlerów, stad reprodukcyjnych czy stad towarowych nieśnych.

W dalszej części podrozdziału trzeciego, doktorantka charakteryzuje czynnik etiologiczny salmonelloz drobiu oraz podaje opis postaci klinicznych infekcji tymi patogenami (1.3.2.2). W podrozdziale tym doktorantka popełniła kilka podstawowych błędów nomenklaturowych, nie wiadomo dlaczego, wprowadzając nie znaną awiopatologii jednostkę „dur brzuszny drobiu”. Wystarczyłaby krótka lektura akademickiego podręcznika „Choroby drobiu” (Mazurkiewicz M., Wieliczko A. (red.): *Choroby drobiu*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. III wyd., ISBN 978-83-7717-314-5. 2019), aby Pani Magister przekonała się, że jednostką wywołaną przez *Salmonella Gallinarum* jest tyfus kur (*Typhus gallinarum*). Oczywiście podkreślenie zoonotycznej roli toksykoinfekcji pałeczkami *Salmonella* jest istotne, jednak sformułowanie „zakażona żywność” jest niepoprawne, winno być „skażona lub zanieczyszczona pałeczkami *Salmonella* żywność lub jeszcze lepiej „zanieczyszczone pałeczkami *Salmonella* mięso drobiowe lub jaja”. Tę część wstępu kończy omówienie biopreparatów stosowanych w immunoprofilaktyce ważnych w praktyce zakażeń pałeczkami *Salmonella*.

Czwartą, bardzo ważną część, wstępu autorka poświęciła omówieniu ogólnych zasad sekwencjonowania wysokoprzepustowego. Jest to krótki, ale dość przystępnie napisany fragment wprowadzenia a zrozumienie zasad działania tej procedury diagnostycznej ułatwia schemat zamieszczony na ryc. 7. Jak stwierdza autorka na zakończenie tej części rozprawy doktorskiej, nadal nie podjęto prób wykorzystania opisanej techniki diagnostycznej do kontroli jakości immunologicznych weterynaryjnych produktów leczniczych -IWPL. Wstęp poza wskazanymi wcześniej błędami jest logicznie spójny i mimo zwięzłej formy dość dobrze wprowadza czytelnika w zakres tematyki realizowanej pracy doktorskiej.

Jak podaje doktorantka realizowana przez nią praca stanowi pierwsze w Polsce, jedne z nielicznych na świecie udokumentowanie badań, które wykorzystują HTS do kontroli jakości żywych szczepionek weterynaryjnych. Autorka postawiła sobie za cel, próbę wykorzystania tej nowoczesnej technologii do kontroli jakości immunologicznych weterynaryjnych produktów leczniczych dla drobiu na modelu zakaźnego zapalenia oskrzeli kur (choroba wirusowa) i *Salmonelli* (model szczepionki przeciwbakteryjnej). Można więc stwierdzić, że kryterium wyboru modelu eksperymentalnego jakim kierowała się doktorantka była częstość stosowania szczepień w odniesieniu do poszczególnych czynników etiologicznych. Zdaniem recenzenta jest to słuszny wybór, ale z pewnością zastosowanie tej metodyki do oceny budowy genowej dużych i istotnych w praktyce DNA wirusów szczepionkowych (wirus choroby Mareka, wirus zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy, wirus ospy) byłoby niezwykle interesujące bowiem udowodniono że w odniesieniu do tych zarazków możliwa jest praktyczna transmisja materiału

genetycznego innych patogenów (np. wirus retikuloendoteliozy – REV w szczepionce przeciwko MDV – np. krajowa praca : *Woźniakowski G, Mamczur A, Samorek-Salamonowicz E. Common occurrence of Gallid herpesvirus-2 with reticuloendotheliosis virus in chickens caused by possible contamination of vaccine stocks. J Appl Microbiol. 2015 Apr;118(4):803-8. doi: 10.1111/jam.12734. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25641090.*).

Cel pracy był bardzo ambitny i co jest istotne możliwy do zrealizowania dzięki współpracy z laboratorium Zakładu Analiz Omiczy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Z pewnością zamierzenia badawcze autorki należy uznać za pionierskie nie tylko w naszym kraju.

W rozdziale 3 autorka szczegółowo opisuje materiał i metody zastosowane przy realizacji recenzowanej pracy doktorskiej. Łącznie do badań wykorzystano po trzy serie , trzech różnych szczepionek przeciwko IBV, jak można zakładać trzech różnych producentów. Zawierały one trzy najczęściej zastosowane w Polsce szczepy tego zarazka: szczep 4/91, typ 793B (GI-13); szczep Ma5, typ Mass (GI-1); szczep D388, typ QX (GI-19). Do badań wykorzystano także po trzy serie różnych preparatów przeciwko salmonellozie, zawierające pałeczki *Salmonella* (serowar Enteritidis).

Warto podkreślić, że bardzo interesującym uzupełnieniem wykonanych badań laboratoryjnych jest analiza rejestru kontroli seryjnej wstępnej, immunologicznych weterynaryjnych produktów leczniczych przy pomocy systemu MyLIMS. Należy docenić, iż jest to autorski program Zakładu Farmacji Weterynaryjnej PIWet-PIB, który służy do zbierania danych na temat serii szczepionek wprowadzonych do obrotu w Polsce.

W drugiej części podrozdziału trzeciego autorka krok po kroku przedstawia schemat badań genetycznych wykonywanych w odniesieniu do ocenianych szczepionek metodą sekwencjonowania wysokoprzepustowego. Jak się wydaje najbardziej istotnym rozbudowanym i nowatorskim fragmentem zastosowanej metodyki był etap analizy bioinformatycznej przy zastosowaniu kilku dedykowanych specjalistycznych narzędzi (tab.9).

Rozdział „Wyniki” jest obszernym fragmentem ocenianej pracy liczącym 32 strony i poprawnie prezentuje dokonania doktorantki. Dydaktyczny schemat zamieszczony na ryc. 12 ułatwia zapoznanie się z wynikami otrzymanymi w trakcie realizacji ocenianej pracy doktorskiej mgr Katarzyny Pasik. Oczywiście wyniki analiz rejestrów są może mniej interesujące z punktu widzenia naukowego ale są niezwykle ciekawe dla zapoznania się z trendami stosowania szczepionek dla drobiu w Polsce na przestrzeni ostatnich blisko 10 lat (konfrontując dane z aktualnej i wcześniejszej pracy autorki). Zdecydowana większość z tych bioproduktów - blisko 97% to szczepionki wirusowe, natomiast pozostałe to biopreparaty

przeciwbakteryjne (1,9%) i przeciwpasożytnicze (1,3%). W tabeli 12 zawierającej zestawienie chorób drobiu, przeciwko którym wprowadzone zostały do obrotu szczepionki, poprawienia wymaga nazewnictwo jednostek chorobowych zgodnie z podawanymi przez krajowe podręczniki. Na przykład „zapalenie mózgu i rdzenia ptaków” poprawnie powinno być opisane jako „zakaźne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego kurcząt”. Równie ciekawe jest podanie typów wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli kur występujących w szczepionkach dla drobiu wprowadzonych do obrotu w Polsce w latach 2018-2020. Ten interesujący wątek zostanie podjęty w rozdziale „omówienie wyników i dyskusja” . Korekty wymaga natomiast zdanie zamieszczone na str. 65 (trzecie od dołu) „*zdecydowanie mniejszą pulą wprowadzonych w Polsce szczepionek na rynek europejski były kolejno IWPL...*”.

Jako osoba śledząca praktyczną immunoprofilaktykę zakaźnego zapalenia oskrzeli kur w Polsce na przestrzeni ostatnich 40 lat zgadzam się z autorką, że na stosowanie konkretnego szczepu szczepionkowego IBV do immunizacji kur wpływa aktualna sytuacja epizootyczna, która jak się wydaje ulega w ostatnich trzech latach poprawie, co być może wpłynie na zmniejszenie liczby szczepów wariantowych zawartych w szczepionkach stosowanych immunoprofilaktyce tej choroby. Dane w odniesieniu do szczepionek przeciwko salmonellozie potwierdzają, że w ostatnich latach stwierdza się wzrost szczepień zarówno szczepionkami mono- jak i dwuwalentnymi. Jak się wydaje kontynuacja tego typu analiz zapoczątkowana wcześniej cytowaną pracą Cybulskiego i wsp. (2015), jest niezwykle interesująca w aspekcie oceny zagrożenia epizootycznego poszczególnymi chorobami zakaźnymi drobiu w Polsce. We wcześniejszej pracy cytowani autorzy zestawili liczbę szczepionek wprowadzanych na rynek europejski i porównali ją z liczbą IWPL zaimportowanych na rynek polski, w pracy doktorskiej nie ma takiego zestawienia a byłoby ono niezwykle ciekawe.

W części drugiej rozdziału „Wyniki” autorka zestawiła rezultaty analiz genomicznych szczepionek wirusowych oraz bioproduktów bakteryjnych. W odniesieniu do szczepionek przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli wyniki obejmują następujące składowe: optymalizację parametrów protokołu do ekstrakcji materiału genetycznego; kontrolę jakości materiału genetycznego; analizę składu genetycznego szczepionek, identyfikację szczepów szczepionek oraz ocenę występowania ich wariantów; analizę filogenetyczną szczepów szczepionkowych IBV na podstawie regionu kodującego S1 genu białka S oraz na podstawie całego genomu IBV. Uzyskane wyniki są bardzo ciekawe i wskazują na pewne zróżnicowanie w zakresie poszczególnych testowanych szczepionek. Różnice te autorka uznała jednak za dopuszczalne. Bardzo szczegółowa analiza wykazała m. in., że zdecydowanie mniej wariantów wirusa znajdowało się populacji szczepionki V-02 (ryc. 25). Równie interesujące były wyniki

analizy charakterystyki molekularnej testowanych szczepionek bakteryjnych, zwłaszcza w odniesieniu do obecności genu replikonu plazmidowego w badanych szczepionkach. Wykazanie tych samych szczepów szczepionkowych w dwóch różnych komercyjnych szczepionkach (dla wszystkich serii szczepionek B-05 oraz B-07 zidentyfikowano taką samą nazwę szczepu Salmonella CHS44 oraz identyczne cgST 81326) stanowi dużą niespodziankę i rodzi pytanie czy prawa autorskie do szczepu zostały naruszone.

W rozdziale 5 doktorantka omawia wyniki uzyskanych badań i konfrontuje je z danymi światowego piśmiennictwa. Pani magister przed rozpoczęciem merytorycznej dyskusji bardzo słusznie podkreśla, że od przeszło 17 lat, nasz kraj jest liderem w produkcji mięsa drobiowego w Unii Europejskiej. Biorąc pod uwagę produkcję żywca drobiowego na głowę mieszkańca zajmujemy, po Brazylii, drugie miejsce na świecie! W ciągu ostatnich 20 lat wartość krajowej produkcji drobiu w latach rosła w średniorocznym tempie 7,8% w porównaniu do 4% rocznego wzrostu w przypadku całej produkcji rolniczej. Konkurencyjność polskiej branży drobiarskiej w relacji do innych państw UE systematycznie rośnie. Ponad połowa naszego mięsa drobiowego jest eksportowana. Jest oczywiste, że tak dynamiczny rozwój produkcji nie byłby możliwy bez efektywnej i profesjonalnej opieki weterynaryjnej nad stadami drobiu wprowadzającej skuteczne programy immunoprofilaktyki chorób zakaźnych. Nie dziwi więc skala wprowadzanych corocznie do obrotu, kupowanych za granicą szczepionek dla drobiu. Dla branży drobiarskiej bardzo ważne jest, aby europejski system kontroli jakości produktów leczniczych stanowił gwarancję, że preparaty wprowadzane na rynek będą bezpieczne i skuteczne. System kontroli jakości immunopreparatów obejmuje wiele parametrów ale, jak dotychczas nie wykorzystuje się w praktyce metod określających skład genetyczny i charakterystykę molekularną szczepionek weterynaryjnych, w tym szczepionek dla drobiu. Zasadne było zatem podjęcie przez Panią mgr Katarzynę Pasik próby oceny przydatności wysoko przepustowego sekwencjonowania do kontroli jakości immunologicznych produktów weterynaryjnych. Jak wspomniano wcześniej analizując jakość i ilość szczepionek przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, dopuszczonych do obrotu w Polsce, wyraźnie widać, że w coraz krótszym czasie po identyfikacji nowego serotypu wirusa tej choroby wprowadzane są nowe rodzaje specyficznych szczepionek. Przykładem może być tutaj fakt, że preparat zawierający szczep 4/91 został dopuszczony do obrotu w Polsce, już w 1998 r., czyli po czterech latach od identyfikacji przypadków choroby wywołanej przez ten wariant. Z kolei jedyna dostępna na rynku szczepionka zawierająca szczep Var2 została wprowadzona w maju 2016 rok, zaledwie w pół roku po identyfikacji w krajowej populacji kur terenowych szczepów tego typu IBV, choć nie wydaje się by była to do końca słuszna decyzja! Równie ciekawe są wykonane przez

doktorantkę analizy dotyczące trendów wprowadzania do obrotu szczepionek przeciwko salmonellozie. Ze względu na znaczenie tych zakażeń w bezpieczeństwie żywności wydaje się, że w przyszłości programy immunoprofilaktyki zakażeń pałeczkami *Salmonella* będą rozwijane. Na wielkość wolumenu sprzedaży szczepionek tej grupy zdecydowanie wpływa fakt że nie są one, jak dotychczas, stosowane w stadach kurcząt brojlerów (rocznie w Polsce odchowuje się około 1 miliarda 300 milionów kurcząt rzeźnych!). Analizowana część rozdziału „Omówienie wyników i dyskusja” jest bardzo interesująca i obejmuje opis sytuacji na krajowym rynku biopreparatów dla drobiu a komentarze doktorantki są poprawne i potwierdzają jej znajomość problemów immunoprofilaktyki stad drobiu ze wszystkimi jej zawiłościami, w tym z polityką koncernów farmaceutycznych.

W dalszej tego rozdziału Pani magister opisuje wyzwania jakie stoją przed wprowadzeniem do praktyki do kontroli jakości szczepionek technologii HTS. Jest to z całą pewnością niezwykle skomplikowany proces, który nie został formalnie rozpoczęty. Jak wynika z przeglądów dokonanych przez pracowników Zakładu Analiz Omicznych Instytutu (Giza i wsp., 2021; Giza i wsp., 2022), najwięcej problemów sprawia opracowanie procesów, które (wypada mieć taką nadzieję) umożliwią ustandaryzowanie protokołu badawczego. Cytowani w tym rozdziale pracy doktorskiej autorzy z wielu krajów podkreślają, że nie jest to łatwa i szybka droga. Jak skomplikowany to jest proces może świadczyć omówiona bardzo szczegółowo przez doktorantkę dokonana ocena homogenności szczepów szczepionkowych. Widać wyraźne, że oceniane szczepionki przeciwko IB cechują się różną heterogennością. Co może być zjawiskiem obojętnym, nie wpływającym na ich skuteczność kliniczną, ale jak się wydaje powinno się monitorować czy i w jakim stopniu wprowadzane do obrotu szczepionki są homogenne. Według podobnego schematu doktorantka omówiła oceniane szczepy preparatów zawierających serowar *Salmonella* Enteritidis. Ciekawy fragmentem, który warto podnieść, ze względu na znaczenie praktyczne jest możliwość odróżniania szczepów szczepionkowych od szczepów terenowych pałeczek *Salmonella*. Mimo, że producenci wskazują metody fenotypowe do ich różnicowania, rozwiązaniem optymalnym byłoby zastosowanie technik biologii molekularnej. Przewaga testów molekularnych wydaje się być tu bezdyskusyjna. Kończąc obszerne i poprawnie sporządzone omówienie wyników i dyskusję doktorantka wskazuje na fakt, że wykonane przez Panią magister badania stanowią wskazówkę dotyczącą formalnych zasad mających na celu wprowadzenie tej metodyki do praktyki. Wyraża przy tym nadzieję, że wraz z postępem technicznym i upowszechnieniem technik HTS ich zastosowanie do kontroli jakości IWPL będzie się rozwijało.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka wyciągnęła cztery bardzo opisowe i obszerne (zbyt obszerne ?) wnioski, stanowiące w odniesieniu do wniosku 1, bardziej rekapitulację opisu danych liczbowych, w którym to podsumowaniu doktorantka stwierdza, że: *1. "Przeprowadzona w latach 2018-2020 analiza wykazała, że na polskim rynku znajdowały się szczepionki dla drobiu przeciwko 19 jednostkom chorobowym"* (sugeruję następujący zapis tej części wniosku „Analiza obejmująca lata 2018-2020 wykazała, że na polskim rynku znajdowały się szczepionki dla drobiu przeciwko 19 jednostkom chorobowym”).

- większość z nich to immunopreparaty wirusowe (96,8%), przy czym dominującymi były szczepionki przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli kur (IBV) (sugeruję następujący zapis tej części wniosku „...przeciwko wirusowi zakaźnego zapalenia oskrzeli kur (IBV)”) (23 żywe i 12 inaktywowanych), a wśród żywych te zawierające szczepy IBV typu MASS (Mass)(53%) oraz 793 B (42%), w dalszej kolejności reprezentujące typ (wariant) QX (5%) i Var2 (0,3%);

- pozostałe to immunopreparaty bakteryjne (1,9%), spośród których dominującymi były (szczepionki) przeciwko salmonellozie drobiu (9 żywych i 8 inaktywowanych), a wśród żywych te zawierające serowar *Salmonella* Enteritidis ((46,6%), a następnie *Salmonella* Gallinarum, Pullorum (35,8%), Typhimurium (8,9%) oraz dwuwalentne Enteritidis i Typhimurium (8,7%);

- najmniej liczne są szczepionki pasożytnicze (najmniej liczne są szczepionki przeciwko chorobom inwazyjnym)(1,3%).

Wniosek drugi jest również rozbudowany, jak pierwszy choć wydaje się, że w odniesieniu do jego początkowego fragmentu jest on zdecydowanie „przegadany” i należy go koniecznie przeredagować dotyczy to poniższych fragmentów:

2. *Badanie HTS w kontroli jakości szczepionek umożliwia:*

- określenie składu genetycznego organizmów zawartych w fiolce/blistrze szczepionki;
- identyfikację charakterystykę molekularną zawartego w szczepionce organizmu;
- stwierdzenie zgodności z dokumentacją producenta;
- uzupełnienie badań bezpieczeństwa szczepionek;
- analizę pokrewieństwa szczepów szczepionkowych;
- w przypadku szczepionek wirusowych:
 - Przedstawienie złożoności struktury szczepionek wzbogaconej o naturalny mikrobiom;
 - Analizę populacji wirusa poprzez określenie występowania wariantów genetycznych szczepów szczepionkowych oraz ocenę ich stabilności. Wśród badanych szczepionek najwięcej wariantów zidentyfikowano w szczepionce zawierającej szczep typu 793 B, najmniej zaś- szczep QX. Warianty te różniły się zarówno budową struktur UTR czy ORF1a jak również S, potencjalnie mających wpływ na zjadliwość czy immunogenność szczepu;

Wniosek trzeci również wymaga przerehabrowania. Stwierdzenie „*ale istnieje potrzeba stworzenia dedykowanych narzędzi we współpracy z producentami, ze ściśle zdefiniowanymi parametrami analiz*” nie jest jasne dla recenzenta czy autorka ma na myśli narzędzia bioinformatyczne czy HTS ze ściśle zdefiniowanymi parametrami analiz. *Może słowo „darmowe” zastąpić słowem „bezpłatne”?*

Wniosek czwarty przytoczony w pełnym brzmieniu:

„4. HTS stanowi narzędzie uzupełniające dla dotychczasowych farmakopealnych metod biologicznych, stosowanych przez wytwórców szczepionek oraz laboratoria OMCL w kontroli jakości, podczas stwierdzenia zgodności ze Specyfikacją Wyrobu Gotowego. Należy dążyć do wprowadzania metody HTS do rutynowej kontroli jakości IWPL. Aby jednak w pełni wykorzystać jej potencjał, wymagana jest ścisła współpraca pomiędzy EDQM, laboratoriami OMCL oraz firmami farmaceutycznymi. Jednym z podstawowych warunków jej wprowadzania jest konieczność ustalania genomów organizmów referencyjnych, wskazanie metod analizy oraz prowadzenie badań biegłości w tym zakresie.”, jest jak można zakładać wielkim życzeniem Pani doktorantki i przekazem do wszystkich decydentów. Wydaje się, że publikacja wyników pracy doktorskiej w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym może być pierwszym krokiem na drodze uwrażliwiania docelowych interesariuszy na możliwość zastosowania HTS do oceny jakości IWPL.

Po krytycznej analizie opracowania, stwierdzam, iż Pani mgr Katarzyny Pasik w publikowanej działalności naukowej wykazała właściwe przygotowanie merytoryczne do samodzielnego rozwiązywania postawionych celów badawczych.

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz w potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a tym samym w wystarczającym stopniu spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom określone w art.13 ust.1. Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365).

Po całościowym rozważeniu wartości poznawczej recenzowanej dysertacji zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Pasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk