

Prof. dr hab. Bogusław Szewczyk
Zakład Szczepionek Rekombinowanych UG
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk

Gdańsk, 20.06.2023 r.

**Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Pasik zatytułowanej
„Zastosowanie wysokoprzepustowego sekwencjonowania do
kontroli jakości wybranych szczepionek dla drobiu”**

Praca doktorska mgr Katarzyny Pasik stanowi bardzo ważny element tematyki badawczej prowadzonej w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach. Praca została wykonana w Zakładzie Farmacji Weterynaryjnej Instytutu a podstawowym celem pracy mgr Pasik było wykorzystanie wysokoprzepustowego sekwencjonowania do badania jakości szczepionek dla drobiu, ze szczególnym naciskiem na szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu oskrzeli i bakteryjnym zakażeniom *Salmonella*.

Rozprawa doktorska zawiera obszerny wstęp, gdzie w pierwszej części w sposób wyczerpujący Autorka omawia historię wprowadzania szczepionek dla drobiu w Polsce, a następnie kontrolę ich jakości w Europie poprzez tworzenie sieci wyspecjalizowanych laboratoriów w kilkudziesięciu krajach Europy. W Polsce Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy jest jedynym OMCL czyli Państwowym Laboratorium Kontroli Produktów Leczniczych. Ważną strategią PIW – PIB w Puławach jest przyjęcie zasady maksymalnego ograniczenia liczby badań na zwierzętach. W tym kontekście użycie alternatywnych, ale niezawodnych metod badania jakości szczepionek, a do takich metod należy wysokoprzepustowe sekwencjonowanie kwasów nukleinowych, jest szczególnie ważne. W dalszej części wstępu Autorka krótko opisuje podział szczepionek dla drobiu na żywe i inaktywowane, a następnie opisuje główne jednostki chorobowe drobiu, które są szczególnie ważne z punktu widzenia przemysłu drobiarskiego. Omówione choroby to zakaźne zapalenie oskrzeli kur powodowane przez koronawirusa IBV, oraz salmonellozy wywoływane przez wiele serowarów bakterii *Salmonella*. Wirus IB jest opisany w sposób dogłębny, również z punktu widzenia wirusologii molekularnej.

Autorka charakteryzuje również szczepionki dostępne w Europie i opisuje ich zalety i wady, w tym również drogi podania. Podobną charakterystykę Autorka przedstawia dla bakterii *Salmonella* opisując bardzo złożone aspekty wielu chorób powodowanych przez te bakterie i różne podejścia ich zwalczania poprzez szczepienia ochronne.

W kolejnym podrozdziale Autorka charakteryzuje technikę wysokoprzepustowego sekwencjonowania omawiając zasadę tej nowoczesnej techniki oraz opisując aparaty dostępne na rynku o różnym podejściu do uzyskania optymalnych i najbardziej wiarygodnych wyników. Autorka w tej części rozprawy opisuje zastosowanie tej techniki, która pozwala na uzyskanie pełnych sekwencji genomowych. Dla bakterii możliwa jest identyfikacja źródeł zakażenia, charakterystyka genów wirulencji takich jak geny antybiotykoodporności czy też pozachromosomalne elementy przenoszenia informacji genetycznej. Ważną cechą HTS w przypadku wirusów jest rozróżnienie szczepu szczepionkowego od terenowego czyli jest to trochę inne podejście do bardzo ważnego weterynaryjnego testu DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals).

Nie mam zasadniczo uwag krytycznych do Wstępu, ale mam kilka pytań do Autorki, które powinny bardziej przybliżyć zastosowanie techniki HTS :

- Bez wątplenia HTS obecnie jest stosowane głównie do analizy atenuowanych szczepionek żywych. Oczywiście też jest, że zabite szczepionki inaktywowane nie powinny zawierać materiału genetycznego. Ale czy w związku z tym HTS mogłoby znaleźć w przyszłości zastosowanie do badania jakości szczepionek inaktywowanych?
- Podczas pandemii obserwowaliśmy „wybuch” zainteresowania i zastosowania szczepionek opartych o mRNA. Biorąc pod uwagę, że IBV to koronawirus, czy widzi Pani, w oparciu o doświadczenia ze szczepionkami mRNA u ludzi, możliwość stosowania szczepionki mRNA przeciwko IBV dla drobiu?
- Bardzo ważnymi szczepionkami rekombinowanymi dla drobiu są te oparte o herpeswirus indyjski HVT. Czy szczepionki rekombinowane oparte na tym wektorze są dostępne dla IBV?
- Jakie możliwości widzi Pani dla zastosowania HTS do analizy szczepionek rekombinowanych, w szczególności dla tych dwóch rodzajów wymienionych powyżej?

Kolejny rozdział to prezentacja głównych celów pracy – przedstawione są one logicznie i w sposób syntetyczny. Nie mam tutaj żadnych uwag.

Nie mam też poważnych uwag do rozdziału „Materiały i Metody”. Drobne uwagi wymieniam poniżej:

- Ryc. 9 i Ryc.10 mają małą wartość dla czytającego. Duża część Tabel jest pusta z uwagami, że są to dane wrażliwe. Natomiast dostępne wydruki są podawane tak małą czcionką, że należałoby je czytać ze szkłem powiększającym. Myślę, że wnioski z tych Tabel byłyby wystarczające. Nie byłoby konieczności sztucznego zwiększania objętości tej pracy.
- str. 48 i w innych miejscach – słowo „koncentracja” brzmi dziwnie. Słowo „stężenie” jest ogólnie przyjętym polskim określeniem.
- Analiza bioinformatyczna w „Metodach” jest bardzo rozległa i nie zawsze jestem w stanie ocenić dobór konkretnych metod. W moim odczuciu Tabela 9, gdzie wymienione są poszczególne cechy szczepionek i podane są narzędzia bioinformatyczne użyte do analizy tych parametrów ułatwia w sposób bardzo znaczący ocenę nakładu pracy doktorantki. Mam jedynie drobną uwagę językową – „wizualizacja” to nie jest najlepsze określenie; można to określić całkiem precyzyjnie po polsku.

Rozdział „Wyniki” został podzielony na dwa podrozdziały: pierwszy dotyczy przeglądu weterynaryjnych immunologicznych produktów leczniczych (IWPL) stosowanych w Polsce, drugi to wyniki analiz genomicznych wykonanych przez Autorkę. Z podsumowania analiz bazy kontroli seryjnej IWPL wynika, że w badanym okresie (2018-2020) na polskim rynku znajdowały się szczepionki przeciwko 19 jednostkom chorobowym – większość przeciwko chorobom wirusowym (prawie 97%), a w tej grupie dominujące były szczepionki przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli kur. Szczepionki przeciwbakteryjne stanowiły około 2% ilości immunopreparatów i były to głównie szczepionki przeciwko salmonellozie.

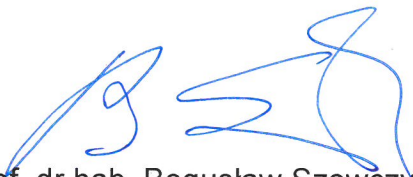
Analiza genomiczna szczepionek i interpretacja wyników eksperymentalnych to główna część pracy opisana w rozdziale Wyniki. Kluczową rolę w tej części pracy odgrywają etapy początkowe polegające na izolacji materiału genetycznego znajdującego się w szczepionce i jego dalszej obróbce, jak np. przepisanie informacji genetycznej z RNA na DNA. Ostra kontrola jakości materiału genetycznego przez Autorkę potwierdziła jego przydatność do wysokoprzepustowego sekwencjonowania i dalszych analiz bioinformatycznych. Na podstawie tych informacji Doktorantka oceniła homogenność szczepionek zarówno wirusowych jak i bakteryjnych. W zdecydowanej większości przypadków wyniki były zbliżone do tych zadeklarowanych przez

producenta. W przypadku szczepionek przeciwko IBV Autorka analizowała warianty genetyczne występujące w szczepach szczepionkowych. Częstotliwość ich występowania była niewielka co świadczy o stabilności badanych szczepionek. Rozrzut zmian w wariantach w stosunku do głównego składnika był dość znaczny. Występował zarówno w rejonach niekodujących UTR, w genie replikazy, ale również w genach strukturalnych S i M. W przypadku szczepionek przeciwbakteryjnych ich jednorodność nie budziła zastrzeżeń – ponad 99% odczytów zostało zaklasyfikowanych jako *Salmonella enterica*. Odpowiednie analizy bioinformatyczne posłużyły Autorce do dokładnej analizy materiału genetycznego znajdującego się w szczepionkach. Doktorantka przeanalizowała geny chromosomalne odpowiedzialne za oporność przeciw głównym czynnikom stosowanym w ochronie kur oraz zidentyfikowała replikony pozachromosomalne, które często przenoszą oporność w sposób horyzontalny.

Kolejny rozdział to połączone „Omówienie wyników i dyskusja”. W pracy opisana jest nowatorska technika i jej zastosowanie do analizy jakości szczepionek, więc takie połączenie wydaje mi się zasadne. Wniosek Autorki, że kontrola wprowadzanych immunopreparatów zawierających atenuowane patogeny powinna również obejmować ich skład genetyczny i własności molekularne uważam za w pełni uzasadniony. Wierzę, że technika znajdzie szerokie zastosowanie w bliskiej przyszłości i obejmie również inne rodzaje szczepionek, które wymieniałem wcześniej. Ważną cechą techniki, na którą Autorka zwraca uwagę jest to, że podejście metagenomiczne pozwala na poznanie całej różnorodności genetycznej w składzie szczepionki, a więc możliwe są analizy retrospektywne składu, i co za tym idzie określenie zmian w czasie poszczególnych partii dostarczanych przez producenta. Stałe monitorowanie techniką HTS pozwala również na zredukowanie możliwości rewersji szczepu szczepionkowego do szczepu, który może rozprzestrzeniać się w środowisku i w efekcie może stanowić zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Przedstawione przez Autorkę wyniki pokazują, że badania HTS mogą być bardzo pomocne w badaniach fenotypowych. Badania fenotypowe są przeważnie długotrwałe i czasami niejednoznaczne, a często ostateczny wynik analizy powinien być jak najszybszy, szczególnie w wynikach fenotypowych wątpliwych lub spornych. HTS może być tutaj szczególnie pomocna.

Ostatni rozdział to „Piśmiennictwo”. Przegląd artykułów jest wyczerpujący i są one właściwie używane w pracy. Mam jedynie zastrzeżenie co do jednorodności piśmiennictwa nazw czasopism. Znalazłem tutaj co najmniej trzy metody pisania nazw, a więc m.in. skrótami lub pełną nazwą, kursywą lub zwykłą czcionką, skrótem lub pełną nazwą. Czasami zmieniona jest pisownia identycznych tytułów.

Wymienione przeze mnie drobne krytyczne uwagi nie zmieniają faktu, że rozprawę mgr Katarzyny Pasik oceniam wysoko. Stwierdzam, że doktorantka opanowała nowoczesne techniki analizy genetycznej, przede wszystkim wysokoprzepustowego sekwencjonowania i użycia analiz bioinformatycznych w stopniu pozwalającym na samodzielną pracę w tej dziedzinie. Wyniki badań są bardzo ważne dla dalszego rozwoju tego obszaru wiedzy. Zostały też spełnione wszelkie wymogi formalne konieczne do złożenia pracy doktorskiej. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Katarzyny Pasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



(Prof. dr hab. Bogusław Szewczyk)