

Autoreferat

Opis osiągnięć naukowych, zawodowych i artystycznych

Dr n. med. Maciej Przybylski
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Warszawa, 2019

Załącznik nr 2

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego
dr n. med. Macieja Przybylskiego

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Maciej Przybylski
Miejsce zatrudnienia: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem miejsca ich uzyskania

1996 Uzyskanie tytułu magistra inżyniera na kierunku Zootechnika,
specjalność genetyka zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

1999 Uzyskanie tytułu specjalisty I° w dziedzinie mikrobiologii

2003 Uzyskanie tytułu diagnosty laboratoryjnego

2007 Nadanie stopnia doktora nauk medycznych w zakresie biologii
medycznej przez Radę I Wydziału Lekarskiego WUM na podstawie
rozprawy doktorskiej pt. „Fenotypowa i genotypowa charakterystyka
enterokoków wankomycynoopornych izolowanych od pacjentów
Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w
Warszawie”
Promotor: Prof. dr hab. n. med. Mirosław Łuczak
Recenzenci: Prof. dr. hab. n. med. Andrzej Denys
Prof. n. med. dr. hab. n. farm. Stefan Tyski

2016 Uzyskanie tytułu specjalisty w dziedzinie mikrobiologii medycznej.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1996 – 1998 Asystent w Zakładzie Wirusologii Akademii Medycznej w Warszawie

1998 – 2006 Asystent w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM

2006 – 2008 St. wykładowca w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM

od 2008 Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM

3.a. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach publicznej ochrony zdrowia

- 2001 – 2015 Asystent w Zakładzie Mikrobiologii Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie
- 2016 – St. asystent w Zakładzie Mikrobiologii Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie

3.b. Staże zagraniczne

- 2000 Szkolenie z zakresu technik biologii molekularnej w Cold Spring Harbor Laboratory, USA (2 tygodnie)
- 2000-2001 Staż podyplomowy w Virus Isolation and Reference Service Laboratory, Departament Zdrowia Stanu Nowy Jork, USA – 1 rok akademicki
- 2003 Szkolenie z zakresu sekwencjonowania DNA i analizy sekwencji organizowane przez Uniwersytet w Leuven, Uniwersytet Stanforda i NATO Advanced Study Institute, Stanford University, USA (1 tydzień)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

„Opracowanie i optymalizacja metod wykrywania wirusów przy użyciu reakcji polimeryzacji łańcuchowej z detekcją w czasie rzeczywistym oraz ich praktyczne zastosowanie w diagnostyce zakażeń”

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl 8 publikacji eksperymentalnych i jeden opis przypadku.

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Przybylski M**, Dzieciatkowski T, Leś K, Mucha MA, Wróblewska M, Młynarczyk G. Comparison of real-time PCR quantitative analysis of the cytomegalovirus DNA level using LightCycler 2.0 and LightCycler 480 instruments. *Journal of Clinical Virology*, 2012, 55:270–273

IF: 3,287; MNiSW: 35

2. Kierat S, Leś K, **Przybylski M** [autor koresp.], Dzieciatkowski T, Młynarczyk G. Opracowanie metody PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusa ospy wietrznej i półpaśca z wykorzystaniem fluorescencyjnej sondy typu TaqMan. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 2012, 64:139-149
MNiSW: 5
3. **Przybylski M**, Majewska A, Żeber N, Młynarczyk G, Dzieciatkowski T. Influence of the 1st International WHO EBV Standard on quantitation of Epstein-Barr virus viral load in serum samples. *Diagnostyka Laboratoryjna*. 2018, 54(2):85-90
MNiSW: 10
4. Tomaszewska A, Kryśko A, Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Basak GW, Hałaburda K, Piekarska K, Sulowska A, Nasiłowska-Adamska B, Młynarczyk G, Jędrzejczak WW, Mariańska B. Co-Infections with Cytomegalovirus and Human Herpesvirus Type 7 in Adult Polish Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 2014. 62(1):77-80
IF: 3,176; MNiSW: 25
5. Dzieciatkowski T, Tomaszewska A, **Przybylski M**, Rusicka P, Basak GW, Jędrzejczak WW, Wróblewska M, Hałaburda K. Analysis of the shedding of three herpesviruses DNA in Polish patients subjected to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Six-year follow up. *Journal of Clinical Virology*, 2016, 76:30-35
IF: 3,051; MNiSW: 25
6. **Przybylski M**, Majewska A, Dzieciatkowski T, Rusicka P, Basak G.W, Nasiłowska-Adamska B, Biliński J, Jędrzejczak W.W, Wróblewska M, Hałaburda K, Młynarczyk G, Tomaszewska A. Infections due to alpha herpesviruses in early post-transplant period after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: Results of a 5-year survey. *Journal of Clinical Virology*, 2017;87:67-72

IF: 3,051; MNiSW: 25

7. Pawlak A, **Przybylski M**, Durlik M, Gil K, Nasierowska-Guttmejer AM, Byczkowska K, Ziemia A, Gil RJ. Viral Nucleic Acids in the Serum Are Dependent on Blood Sampling Site in Patients with Clinical Suspicion of Myocarditis. *Intervirology*. 2016, 59(3):143-151

IF: 1,292; MNiSW: 20

8. Broniek G, Langwińska-Wośko E, Sybilska M, Szaflik JP, **Przybylski M**, Wróblewska M. Occurrence of viral DNA in paired samples of corneal rim and cornea preservation fluid. *Journal of Medical Virology*, 2016;89:732-736

IF: 1,935; MNiSW: 25

9. **Przybylski M**, Dzieciatkowski T, Zduńczyk D, Jędrzejczak WW, Luczak M. Microbiological Findings and Treatment of EBV-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Case Report. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 2010, 58, 247-252

IF: 2,385; MNiSW: 20

Sumaryczny Impact Factor cyklu publikacji: **18,177**

Sumaryczna punktacja MNiSW cyklu publikacji: **190**

Oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim znajdują się w załączniku nr 4.

Mój udział w powstawaniu wymienionych publikacji opisałem w załączniku nr 5.

c) *omówienie celu naukowego wymienionych prac wraz omówieniem ich ewentualnego wykorzystania*

Możliwość wykrycia i określenia liczby patogenów wirusowych w materiale diagnostycznym dostarcza istotnych informacji na temat etiologii i przebiegu zakażenia oraz ma bezpośredni wpływ na dobór, czas trwania oraz moment zakończenia leczenia. Klasyczne metody laboratoryjne, takie jak hodowla wirusów lub metody immunoenzymatyczne, umożliwiają badania ilościowe jedynie w ograniczonym zakresie, co wynika z ich ograniczeń technicznych. Pojawienie się metod biologii

molekularnej, przede wszystkim PCR, doprowadziło do przełomu w diagnostyce zakażeń wirusowych, jednak standardowa odmiana tej metody umożliwia uzyskanie jedynie wyników jakościowych oraz wykazuje niekiedy niedostateczną swoistość. Pierwszą stosowaną rutynowo, w pełni ilościową techniką amplifikacji DNA, był tzw. konkurencyjny PCR (ang. *competitive PCR*), jednak ze względu na czaso- i pracochłonność oraz znaczące ryzyko kontaminacji produktami amplifikacji, nie była ona często stosowana.

Technika PCR z detekcją produktu w czasie rzeczywistym (qPCR) wykorzystuje pomiar poziomu fluorescencji po każdym cyklu reakcji, co umożliwia precyzyjne określenie momentu, w którym liczba powielanych kopii DNA zaczyna wzrastać wykładniczo. Emisja fluorescencji odbywa się po naświetleniu cząsteczek fluorochromu związanego ze swoistą sondą hybrydującą w obrębie produktu reakcji, lub barwnika wiążącego się nieswoiście z DNA. W diagnostyce zakażeń stosuje się zazwyczaj metodę z użyciem znakowanych sond, ze względu na większą swoistość. Ogromną zaletą qPCR jest łatwość opracowania wariantu umożliwiającego ilościowy pomiar liczby kopii kwasu nukleinowego w badanym materiale. Reakcja polimeryzacji łańcuchowej DNA z detekcją w czasie rzeczywistym jest obecnie jedną z najważniejszych i najczęściej wykorzystywanych w praktyce technik wykrywania i pomiaru liczby kopii wirusowych kwasów nukleinowych. Rozwój metodologii oraz standaryzacja qPCR stosowanego w wirusologii klinicznej są silnie związane z postęпами w diagnostyce i monitorowaniu zakażeń wirusami zapalenia wątroby B i C oraz wirusami upośledzenia odporności. W konsekwencji, stworzenie i implementacja współczesnych wytycznych dotyczących zasad diagnozowania i monitorowania pozostałych zakażeń wirusowych przy użyciu qPCR, a także ujednoczenie wymogów technicznych dla aparatury diagnostycznej i procedur, siłą rzeczy odnosi się do standardów postępowania wypracowanych dla diagnostyki zakażeń HIV, HCV i HBV.

Związek między liczbą kopii wirusowego DNA lub RNA we krwi a stanem klinicznym obserwuje się zarówno w ostrych jak i przewlekłych zakażeniach wirusowych. Zostało to jednoznacznie udowodnione dla zakażeń HIV oraz WZW B i C. Do najbardziej istotnych parametrów należą wyjściowa liczba kopii wirusowego kwasu nukleinowego, dynamika narastania lub spadku liczby kopii w przebiegu leczenia oraz moment, w którym wirusowy kwas nukleinowy osiąga poziom niewykrywalny. Podobną zależność stwierdzono w przypadku zakażeń CMV biorców przeszczepów

komórek krwiotwórczych oraz narządów unaczynionych. Obecnie trwają prace nad potwierdzeniem powyższego związku dla innych istotnych klinicznie wirusów, takich jak wirus Epsteina-Barr, parwowirus B19 oraz adenowirusy. Badania te mają znaczenie przede wszystkim u osób poddanych leczeniu immunosupresyjnemu.

4.c.1) Projektowanie, optymalizacja i standaryzacja metod PCR z detekcją w czasie rzeczywistym

Proces projektowania i optymalizacji działania metody służącej do wykrywania i określania liczby kopii wirusowego kwasu nukleinowego w materiale biologicznym obejmuje szereg działań, które przedstawione są w dokumentach międzynarodowych i krajowych instytucji odpowiedzialnych za koordynację i normalizację metod analitycznych i diagnostycznych. Przykładem może być amerykański Instytut Standardów Laboratoryjnych i Klinicznych (CLSI: Clinical & Laboratory Standard Institute), który od lat systematycznie publikuje zestawy szczegółowych wytycznych i standardów postępowania odnoszących się do stosowanych w mikrobiologii metod biologii molekularnej. Wytyczne europejskie mają charakter bardziej ogólny i najczęściej uzupełniane są informacjami publikowanymi w indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Przydatne są także lokalne wytyczne krajowe, podejmujące próbę syntezy ogólnych wytycznych europejskich i opublikowanych dotychczas wytycznych szczegółowych. Wchodzące w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego **prace 1 – 3** skupiają się na problematyce projektowania, optymalizacji i standaryzacji qPCR w odniesieniu do diagnostyki zakażeń wywołanych przez wirusy z rodziny *Herpesviridae*.

Praktyczny opis procesu projektowania i optymalizacji metody qPCR służącej do wykrywania DNA wirusa ospy wietrznej i półpaśca (VZV) zawarty został w pracy **„Opracowanie metody PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusa ospy wietrznej i półpaśca z wykorzystaniem fluorescencyjnej sondy typu TaqMan” (praca nr 2)**. Zakażenia VZV rozpowszechnione są na całym świecie, a w populacji polskiej przeciwciała świadczące o zakażeniu ma ponad 90% osób dorosłych. Diagnostyka laboratoryjna polegająca na wykryciu wirusa w odpowiednim materiale wskazana jest w przypadku zakażenia pierwotnego lub reaktywacji latentnej formy wirusa o nieswoistym lub ciężkim przebiegu oraz powikłań o charakterze narządowym. Zakażenia tego typu mogą dotyczyć osób immunokompetentnych, lecz szczególnego znaczenia nabierają przy wrodzonych lub nabytych upośledzeniach odporności.

Monitorowanie obecności i poziomu wirusowego DNA jest przydatne podczas leczenia przeciwwirusowego.

Projektowanie metody rozpoczęto od wyboru wysoce konserwatywnego regionu w obrębie otwartej ramki odczytu ORF62, zawierającej gen jednego z głównych czynników transkrypcyjnych wirusa. Jako matrycy do wyboru sekwencji użyto całogenomowej sekwencji modelowego szczepu wirusa. Zaprojektowane startery powieliły fragment wirusowego DNA o długości 136 par zasad, a hybrydująca w obrębie produktu PCR sonda, wykorzystująca technologię TaqMan, została wyznakowana cyjaniną na końcu 5', a na końcu 3' wygaszaczem BHQ-2. Wstępna ocena poprawności metody obejmowała uzyskanie dodatniego sygnału amplifikacji z wykorzystaniem DNA pochodzącego z wzorcowego szczepu wirusa, a także wymazu ze zmian skórnych pobranych od osoby z objawami ospy wietrznej oraz szczepu wirusa wyizolowanego w przypadku zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Tożsamość uzyskanych produktów PCR potwierdzono za pomocą sekwencjonowania. Na etapie optymalizacji metody określono optymalne stężenie starterów oraz sondy. Swoistość metody określono przeprowadzając szereg reakcji kontrolnych z materiałem zawierającym DNA lub cDNA uzyskane z patogenów bakteryjnych (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* i *Klebsiella oxytoca*) i wirusowych (ludzkiego adenowirusa typu 5 i 7, ludzkiego herpeswirusa (HHV) typu 1, HHV-2, HHV-4 i HHV-5, wirusa parainfluenzy typu 3, wirusa ECHO 18, enterowirusa 71, wirusa Coxsackie A9 oraz wirusa Coxsackie B3). Zbadano także, czy w reakcji nie dochodzi do nieswoistego powielenia ludzkiego DNA, wyizolowanego z materiałów klinicznych nie zawierających HHV-3: krwi pełnej, surowicy, osocza i popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelikowych. Swoistość metody wynosiła 100%. Czułość analityczną metody określono na poziomie 98,2% na podstawie badania 112 próbek zawierających od 1050 do 3 125 000 kopii DNA VZV/ml. W badaniu powtarzalności metody odchylenie standardowe (SD) dla uśrednionej wartości punktu odcięcia (C_p) wynosiło 0,38 cyklu, a względne odchylenie standardowe (RSD) – 1,29%. W badaniu odtwarzalności metody SD wynosiło 0,54 cyklu, a RSD – 1,67%. Następnie określono podstawowe parametry ilościowe metody. Zakres liniowości metody obejmował od 300 do 3 125 000 kopii DNA VZV/ml przy współczynniku korelacji liniowej 0,996. Dolna granica wykrywalności wynosiła 750 kopii DNA VZV/ml, a granice oznaczalności od 1260 do 3 125 000 kopii DNA

VZV/ml. Oceniając przydatność kliniczną zbadano próbki krwi pełnej i surowicy, wymazy ze zmian skórnych oraz materiał z górnych dróg oddechowych pobrane od pacjentów pediatrycznych w okresie 48 godzin od zdiagnozowania ospy wietrznej. Porównano wyniki uzyskane za pomocą opracowanej metody oraz metody referencyjnej, wykazując przewagę metody własnej. Podsumowując, zaprojektowana metoda prezentuje bardzo dobre parametry analityczne oraz wysoki poziom odporności na błędy laboratoryjne; metodę można też łatwo dostosować do różnych materiałów klinicznych, co sprawia, że może ona znaleźć zastosowanie w trudnych diagnostycznie przypadkach. Poza opracowaniem metody zaprezentowanej w **pracy nr 2**, jestem także współautorem 11 innych prac prezentujących wyniki projektowania i optymalizacji metod qPCR znajdujących zastosowanie w wirusologii.

Pomiar liczby kopii wirusowego DNA lub RNA przy użyciu qPCR zawsze obarczony jest pewnym błędem. Wyniki międzylaboratoryjnej oceny biegłości udowadniają, że dla CMV i EBV różnice pomiaru liczby kopii DNA/ml uzyskane dla tej samej próby przy użyciu różnych metod często różnią się, a w skrajnych przypadkach różnice te mogą osiągać 3-4 logarytmy dziesiętne. Źródłem braku powtarzalności wyników jest różna metodologia oznaczeń stosowana w laboratoriach diagnostycznych. Potencjalne czynniki będące źródłem błędów obejmują różnice w sposobie izolacji kwasów nukleinowych, zestaw zastosowanych kalibratorów, odmienne regiony docelowe kwasu nukleinowego powielane w qPCR, różnice w kinetyce reakcji wynikające z zastosowanego typu sond hybrydujących oraz wpływ termocyklerów używanych do amplifikacji DNA i pomiaru fluorescencji.

Celem **pracy 1 „Comparison of real-time PCR quantitative analysis of the cytomegalovirus DNA level using LightCycler 2.0 and LightCycler 480 instruments”** była ocena wpływu użytego termocyklera na wyniki oznaczeń ilościowych DNA wirusa cytomegalii w 97 próbkach surowicy krwi pobranych od biorców komórek krwiotwórczych w okresie wirerii CMV. Porównano wyniki uzyskane z użyciem dwóch termocyklerów, z których jeden wykorzystywał pojedynczą diodę LED jako układ wzbudzający oraz fotopowielacz jako detektor, a w drugim zastosowano lampę ksenonową z systemem filtrów oraz kamerę CCD. Cyklery różniły się także systemem ogrzewania i chłodzenia próbek, pierwszy wykorzystywał chłodzenie powietrzem (bardziej wydajny), podczas gdy elementem chłodzącym w

drugim było ogniwo Peltiera. Stwierdzono przesunięcie wartości uśrednionego punktu odcięcia krzywych amplifikacyjnych o 1,49 cyklu ($P < 0,05$), co odpowiada 0,497 logarytmu dziesiętnego. Różnica ta została częściowo skompensowana przez oprogramowanie termocyklerów na etapie określania liczby kopii DNA CMV w oparciu o serię kalibratorów, i dla wartości uśrednionych wyniosła 0,215 \log_{10} kopii/ml. Analiza wyników z zastosowaniem metody Blanda-Altmana, opierającej się na porównaniu wyników dla pomiarów sparowanych, wykazała statystycznie istotną różnicę dla oznaczeń uzyskanych z użyciem obu termocyklerów ($P = 0,017$). Zaobserwowana zmienność dotyczyła 10,2% próbek, dla których różnica przekraczała 0,5 \log_{10} kopii/ml, z ekstremum na poziomie 1,17 \log_{10} kopii/ml, a wyniki uzyskane dla 8,2% par próbek wykaczały poza wartości oczekiwane dla testu Blanda-Altmana. Stwierdzone różnice, mimo istotności statystycznej, nie mają jednak dużego znaczenia z klinicznego punktu widzenia; co więcej, stwierdzona różnica wartości średnich dla liczby kopii DNA CMV jest zbliżona do poziomu zmienności deklarowanego dla metody użytej w badaniu (0,12-0,20 \log_{10} kopii CMV DNA/ml). Podsumowując, nie wykazano istotnego wpływu zastosowanego termocyklera na wyniki ilościowych oznaczeń DNA CMV w próbkach surowicy krwi.

Jednym ze sposobów kompensacji błędu dotyczącego pomiaru liczby kopii wirusowego DNA przy użyciu qPCR jest standaryzacja wyników. Przez wiele lat podstawowym problemem było stworzenie materiałów odniesienia (standardów), które byłby powszechnie akceptowane w skali międzynarodowej. Obecnie dostępne są certyfikowane materiały odniesienia (CMO) opracowane przez WHO we współpracy z NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, USA), które umożliwiają przedstawienie wyników w jednostkach międzynarodowych (*IU: international units*) w miejsce innych stosowanych jednostek (liczba kopii DNA lub RNA, ekwiwalenty genomu). Dla ilościowych metod genetycznych stosowanych w diagnostyce wirusologicznej opracowano dotychczas standardy dla HIV, HBV, HCV, CMV, EBV, parwowirusa B19 oraz adenowirusów. Głównym celem standaryzacji jest możliwość porównania wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach, a także wyników uzyskiwanych w pojedynczym laboratorium w różnym czasie; teoretycznie także wyników uzyskanych przy użyciu różnych metod.

W pracy nr 3 „Influence of the 1st International WHO EBV Standard on quantitation of Epstein-Barr virus viral load in serum samples” porównano wyniki oznaczeń ilościowych DNA EBV w 80 próbkach surowicy krwi zawierających wirusa, przed i po standaryzacji z użyciem CMO opracowanego przez WHO dla EBV. Ocenie poddano sześć metodologii qPCR, obejmujących kombinacje dwóch zautomatyzowanych metod izolacji DNA, dwóch termocyklerów wykorzystujących różną technologię wzbudzenia i pomiaru fluorescencji oraz trzech ilościowych metod qPCR powielających różne regiony genomu wirusa. Stwierdzono różnice w parametrach jakościowych badanych metod: żadna z zastosowanych metod nie umożliwiała wykrycia DNA EBV we wszystkich badanych próbkach; najefektywniejsza umożliwiła wykrycie wirusowego kwasu nukleinowego w 72 próbkach (90%), a najmniej efektywna w 59 (73,8%). Porównanie uśrednionych wyników ilościowych przed standaryzacją wykazało różnice statystycznie istotne dla czterech par metod. Wynosiły one od 0,395 ($P=0,011$) do 0,563 ($P=0,001$) \log_{10} kopii DNA EBV/ml. Pozostałe dwanaście porównań wykazało różnice nieznamiennie (0,008-0,261 \log_{10} kopii DNA EBV/ml). W następnej kolejności przeprowadzono standaryzację, uzyskując odpowiednie współczynniki konwersji, które umożliwiły wyrażenie wyników w IU/ml. Standaryzacja doprowadziła do zmniejszenia różnic do poziomu nieznamiennego w przypadku dwóch z czterech par wykazujących różnice istotne statystycznie przed standaryzacją, jednak w przypadku pozostałych dwóch różnice pozostały istotne i wynosiły 0,405 \log_{10} IU/ml ($P=0,014$) i 0,414 \log_{10} IU/ml ($P=0,009$). Należy podkreślić, że w porównaniach przeprowadzonych dla pomiarów sparowanych stwierdzono tendencję do nasilania się różnic dla wartości zbliżonych do granic oznaczalności deklarowanych dla metod. Różnica ta była większa dla wartości bliskich dolnej granicy oznaczalności, i w skrajnych przypadkach przekraczała 3 logarytmy dziesiętne, a w przypadku wartości bliskich górnej granicy oznaczalności różnice przekraczały 2 logarytmy. Standaryzacja wyników nie wywarła zauważalnego wpływu na wielkość tych różnic, co sugeruje brak pozytywnego wpływu standaryzacji na zwiększoną wariancję wyników dla wartości bliskich granicom oznaczalności. Standaryzacja jest zatem techniką usprawniającą proces diagnostyczny tylko w pewnym stopniu, jednak najważniejszym źródłem zmienności pozostają różne techniki izolacji DNA, jakość procesu walidacji metod qPCR oraz błędy manualne.

4.c.2) Zastosowanie metody PCR z detekcją w czasie rzeczywistym w diagnostyce zakażeń alfa- i betaherpeswirusami u biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych we wczesnym okresie poprzyszczepowym

Zakażenia powodowane przez wirusy należące do podrodziny *Betaherpesvirinae* stanowią poważny problem kliniczny u osób poddanych immunosupresji w związku z zabiegami przeszczepienia komórek krwiotwórczych (PKT). U dorosłych biorców przeszczepów zakażenia betaherpeswirusami wynikają najczęściej z reaktywacji latentnej formy wirusa, natomiast zakażenia pierwotne zdarzają się rzadko. Największe znaczenie kliniczne ma wirus cytomegalii (CMV), którego reaktywacja objawia się najczęściej pod postacią zakażenia ogólnoustrojowego przebiegającego z gorączką, zapalenia płuc lub zapalenia jelita grubego, rzadziej jako zapalenie wątroby. Objawowe reaktywacje kolejnego betaherpeswirusa, HHV-6, nie są tak częste i objawiają się gorączką lub zapaleniem płuc. Rzadko stwierdza się inne postacie zakażenia HHV-6, jak zapalenie mózgu lub wątroby. Znaczenie kliniczne trzeciego betaherpeswirusa, HHV-7, nie zostało u biorców PKT jednoznacznie określone, podejrzewa się udział tego wirusa w etiopatogenezie zakażeń ośrodkowego układu nerwowego, dyskutowany jest jego związek ze stopniem nasilenia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD, *graft-versus-host disease*) oraz zwiększonym ryzykiem reaktywacji CMV. Obecne zalecenia EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) przewidują u biorców PKT monitorowanie poziomu DNA CMV we krwi we wczesnym okresie poprzyszczepowym, podczas gdy diagnostykę zakażeń HHV-6 i -7 stosuje się w zależności od obrazu klinicznego.

W **pracach 4** (“**Co-Infections with Cytomegalovirus and Human Herpesvirus Type 7 in Adult Polish Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplant Recipients**”) i **5** (“**Analysis of the shedding of three herpesviruses DNA in Polish patients subjected to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Six-year follow up**”) zastosowano ilościowe metody PCR z detekcją w czasie rzeczywistym do określenia częstości zakażeń wynikających z reaktywacji betaherpeswirusów u dorosłych biorców PKT we wczesnym okresie poprzyszczepowym, podjęto też próbę oceny wzajemnych zależności między CMV, HHV-6 i HHV-7. W **pracy 4** porównano występowanie DNA CMV i HHV-7 w surowicy krwi 69 biorców komórek krwiotwórczych. W ciągu 100 dni po zabiegu przeszczepienia, epizody reaktywacji CMV stwierdzono u 62% badanych, HHV-7 u

43%, jednoczesną reaktywację obu wirusów u 26% biorców, podczas gdy u 17% pacjentów nie doszło do reaktywacji żadnego z obu wirusów. U większości biorców reaktywacja CMV miała miejsce w typowym okresie, od 30 do 70 dnia po przeszczepieniu, i osiągała poziom od 800 do 10000 kopii DNA CMV/ml. Wiremia HHV-7 występowała w zbliżonym czasie (20 – 60 dni po przeszczepieniu), jednak osiągała niższy poziom (200 – 3000 kopii/ml). Wykazano, że jednoczesna reaktywacja CMV i HHV-7 charakteryzuje się wyższym średnim poziomem wiremii CMV (1986 kopii/ml) niż reaktywacja tylko CMV, której nie towarzyszy wykrywalna ilość DNA HHV-7 (432 kopie/ml). Nie stwierdzono analogicznej różnicy w liczbie kopii HHV-7. Jednoczesna reaktywacja CMV i HHV-7 była natomiast związana z dłuższym czasem trwania wiremii HHV-7 (mediana 38,5 dnia); jeżeli reaktywował się tylko HHV-7, mediana czasu trwania wiremii wynosiła 14 dni. W zależności od tego, czy reaktywacji CMV towarzyszyła wiremia HHV-7, występowała także różnica w czasie trwania wiremii CMV, jednak nie była ona statystycznie istotna (odpowiednio 43 i 21 dni). Stwierdzono także, że u 94% biorców, u których obserwowano współistniejącą wiremię CMV i HHV-7, we krwi najpierw pojawiało się DNA HHV-7, a średnio 10 dni później – DNA CMV. Nie stwierdzono jednak, aby pojawienie się jednego z badanych wirusów stanowiło jednoznaczny czynnik predykcyjny dla reaktywacji drugiego.

Praca 5 stanowi w dużej mierze kontynuację pracy 4. Grupa badana została rozszerzona do 142 biorców allogenicznych przeszczepów komórek krwiotwórczych. Analizie poddano wszystkie próbki surowicy pobrane we wczesnym okresie poprzyszczepowym dla celów monitorowania CMV. Poza CMV i HHV-7, zbadano także liczebność kopii DNA HHV-6. We krwi 113 biorców (79,6%) wykryto DNA betaherpeswirusów. Najliczniejsze grupy stanowili biorcy, u których wykrywano DNA wirusa cytomegalii (23,9%) lub CMV z towarzyszącą reaktywacją HHV-7 (16,2%). U wszystkich osób, u których stwierdzono koinfekcję CMV i HHV-7 potwierdzono zaobserwowane wcześniej zjawisko wcześniejszego pojawiania się DNA HHV-7 względem CMV. Co więcej, także DNA HHV-6 wykrywalne było przed pojawieniem się CMV u 92,3% biorców z wiremią powodowaną przez oba wirusy. Nie stwierdzono analogicznej zależności między HHV-6 i HHV-7. Potwierdzono także pozostałe zależności między CMV i HHV-7. Czas trwania wiremii CMV wynosił średnio 11,5 dnia, jednak gdy wirusowi temu towarzyszył HHV-7, wydłużał się do 37 dni ($P=0,008$). Analogicznie, wiremia HHV-7 trwała dłużej u pacjentów z koinfekcją CMV (30 dni),

niż w przypadku gdy wykrywano tylko DNA HHV-7 (11 dni, $P<0,001$). Nie zaobserwowano jednak, aby koinfekcje z HHV-6 wpływały na czas trwania wiremii CMV lub HHV-7. Wzajemny związek między CMV i HHV-7 stwierdzono także analizując poziom wiremii obu wirusów. Średnia liczba kopii DNA CMV przy koinfekcji z HHV-7 wynosiła 3,534 \log_{10} , natomiast w grupie, w której CMV był jedynym wykrywanym wirusem wynosiła 2,942 \log_{10} ($P<0,001$). Podobnie, poziom wiremii HHV-7 był wyższy w sytuacji, gdy reaktywacji tego wirusa towarzyszyła wiremia CMV (odpowiednio 2,676 i 2,118 \log_{10} kopii HHV-7/ml, $P<0,001$). Nie stwierdzono zauważalnego wpływu reaktywacji HHV-6 na poziom wiremii CMV lub HHV-7. W pracy przeanalizowano także związek między typem dawcy a opisanymi wyżej parametrami (czas pojawienia się, czas trwania i poziom wiremii betaherpeswirusów). Stwierdzono, że w grupie biorców komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego, liczba kopii DNA CMV osiąga wyższe wartości, niż u biorców przeszczepu rodzinnego (odpowiednio 3,268 i 2,927 \log_{10} kopii, $P<0,001$). Wiremia CMV trwała też znacznie dłużej (31 dni) u biorców przeszczepów od dawców niespokrewnionych, niż u biorców komórek od dawców rodzinnych (10 dni, $P=0,007$). Długość trwania wiremii HHV-6 i HHV-7 oraz jej nasilenie były porównywalne w obu grupach. Nie stwierdzono także wpływu źródła przeszczepianych komórek na moment pojawienia się wiremii CMV, HHV-6, czy też HHV-7.

Podsumowując powyższe wyniki, można stwierdzić, że reaktywacje latentnych form betaherpeswirusów są u biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych zjawiskiem częstym. Pierwsze epizody wiremii HHV-6 i HHV-7 wykrywa się w podobnym czasie, przy czym oba te wirusy ulegają reaktywacji wcześniej niż CMV, co sugeruje potencjalne wzajemne interakcje. Metoda qPCR wykazała w tym badaniu zdecydowaną przydatność, i może służyć nie tylko jako narzędzie diagnostyczne, ale także jako źródło wartościowych danych dla analizy związków między wirusami z podrodziny *Betaherpesvirinae*.

Zakażenia powodowane przez alfaherpeswirusy (wirusy opryszczki zwykłej 1 i 2 – HSV-1, HSV-2 oraz wirus ospy wietrznej i półpaśca – VZV) stwierdza się u znacznego odsetka biorców PKT. Reaktywacja latentnej formy wirusów opryszczki dotyczy 25-40% biorców przeszczepów, zazwyczaj między drugim a czwartym tygodniem, licząc od wdrożenia immunosupresji. Rozsiana forma zakażenia HSV-1 lub HSV-2 związana jest z wysoką śmiertelnością, pomimo leczenia przeciwwirusowego.

Przed wprowadzeniem acyklowiru w chemioprophylaktyce zakażeń alfa herpeswirusami, wirus ospy wietrznej i półpaśca należał do klasycznych patogenów oportunistycznych u osób z chłoniakami, ostrą białaczką lub osób po zabiegu PKT, a objawowe reaktywacje VZV obserwowano u około 60% biorców przeszczepów szpiku kostnego, zazwyczaj w późnym okresie poprzyszczepowym (powyżej 200 dnia). Zakażenie dotykało najczęściej płuc, wątroby lub ośrodkowego układu nerwowego.

W pracy nr 6, „**Infections due to alphaherpesviruses in early post-transplant period after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: Results of a 5-year survey**”, wykorzystano ilościową odmianę PCR z detekcją w czasie rzeczywistym wykrywania zakażeń alfa herpeswirusami w populacji 190 dorosłych biorców allogenicznych przeszczepów komórek krwiotwórczych, otrzymujących standardową profilaktykę przeciwwirusową z użyciem acyklowiru. Pomiaru liczby kopii DNA alfa herpeswirusów dokonywano w próbkach surowicy krwi pobranych we wczesnym okresie poprzyszczepowym (0-100 dni po zabiegu przeszczepienia). Populacja badana obejmowała wszystkie osoby poddane zabiegom przeszczepienia w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Hematologii i Onkologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a także w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie w latach 2009-2013, łącznie 190 osób. Próbki były pobierane w odstępach tygodniowych. W okresie, którego dotyczyło badanie, wszystkie osoby poddane zabiegom przeszczepienia otrzymywały standardową chemioprophylaktykę z użyciem acyklowiru w podaniu dożylnym (3 x 500 mg dziennie) lub doustnym (4 x 400 mg/dzień). Kondycjonowanie mieloablacyjne zastosowano u 68 biorców, a kondycjonowanie o zredukowanej intensywności – u 122 biorców.

Do wykrywania DNA alfa herpeswirusów w 2475 próbkach surowicy krwi użyto dwóch odrębnych metod: do jednoczesnego wykrywania i identyfikacji wirusów opryszczki oraz do wykrywania wirusa ospy wietrznej i półpaśca (metoda prezentowana w **pracy nr 2**).

Przed zabiegiem przeszczepienia dokonano oceny występowania przeciwciał swoistych wobec wirusów opryszczki i wirusa ospy wietrznej w klasach IgM i IgG. W badanej grupie u 110 osób (57,9%) wykryto przeciwciała w klasie IgG przeciw HSV-1, u 163 osób (85,8%) – przeciwko VZV, a u 19 osób (10%) – przeciwko HSV-2. Przeciwciała w klasie IgM, wykryte u pojedynczego biorcy, skierowane były przeciwko HSV-1. W 142 próbkach surowic, pobranych od 44 osób (23,2%) wykryto DNA

alfaherpeswirusów. Najczęściej wykrywano DNA HSV-1 (43 biorców, 22,6%), u pojedynczego biorcy wykryto DNA HSV-2 a u żadnego nie wykryto DNA VZV. Wszyscy badani, u których stwierdzono DNA HSV-1 i HSV-2 mieli także odpowiednie przeciwciała we krwi (badane przed wdrożeniem immunosupresji), co sugeruje, że źródłem wirerii była reaktywacja wirusa latentnego, a nie zakażenie pierwotne. U biorcy, u którego wykryto przeciwciała przeciw HSV-1 w klasie IgM nie stwierdzono DNA wirusa we krwi. Mediana czasu od przeszczepienia do wystąpienia wirerii HSV-1 wynosiła 15 dni (6-93 dni), a czas trwania – od 5 do 37 dni (mediana 12 dni). Średni poziom DNAemii wynosił $2,183 \log_{10}$ kopii wirusowego DNA/ml ($SD=0,175$). Średnia liczba kopii DNA HSV-2 wynosiła $2,06 \log_{10}/ml$.

W badanej grupie biorców nie stwierdzono wyraźnego związku między wirerią HSV-1 a objawami chorobowymi. Najczęściej obserwowanym objawem była gorączka o nieustalonej etiologii. Występowała ona z podobną częstością w grupie osób z reaktywacją HSV-1 i u osób, we krwi których nie wykryto DNA HSV-1 (odpowiednio 81,2% i 80,3%); co więcej, nie stwierdzono związku między czasem występowania DNAemii HSV-1 a epizodami gorączki. Spośród 43 biorców, u których wykryto DNA HSV-1, u pięciu wystąpiły objawy zapalenia płuc, którym u czterech z nich towarzyszyły zmiany skórne związane z zaostrzeniem choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, a u trzech stwierdzono dodatkowo podwyższenie poziomu transaminaz wątrobowych.

Wykazano związek dwóch czynników z wirerią HSV-1. Pierwszym była korelacja z GvHD, jako że częstość występowania wirerii HSV-1 w grupie pacjentów z GvHD wynosiła 56,3 %, podczas gdy u biorców bez objawów GvHD – 15,2% ($P<0,001$); stwierdzono także związek GVHD z czasem trwania wirerii HSV-1 (mediany odpowiednio 15 i 10 dni, $P=0,011$). Drugim, mniej ewidentnym czynnikiem związanym z ryzykiem reaktywacji HSV-1, było źródło przeszczepianych komórek. DNA HSV-1 wykryto u 28,2% biorców komórek od dawcy niespokrewnionego oraz u 13,7% biorców komórek od rodzeństwa ($P=0,048$). Nie stwierdzono związku między częstością występowania wirerii HSV-1, czasem jej trwania ani nasileniem a żadnym z pozostałych czynników branych pod uwagę (wiek, płeć, choroba podstawowa, typ kondycjonowania, śmiertelność, nasilenie GvHD i stosowana profilaktyka GvHD).

Powyższe wyniki sugerują, że profilaktyka przeciwwirusowa stosowana w badanej grupie biorców PKT nie zapobiega epizodom reaktywacji latentnej formy HSV-1, jednak w odniesieniu do wyników analogicznych prac opisujących zakażenia alfaherpeswirusami u biorców przeszczepów nie otrzymujących profilaktycznie acyklowiru, zauważalnie obniża ryzyko wystąpienia zarówno zakażeń zlokalizowanych o ciężkim przebiegu, jak i masywnych zakażeń ogólnoustrojowych przebiegających z wysoką wiremią, a co za tym idzie – związanych z ryzykiem zaatakowania narządów wewnętrznych i zwiększoną śmiertelnością. Technika qPCR wykazała w tym badaniu wysoką przydatność, jednak uzyskane wyniki nie sugerują potrzeby stałego monitorowania wiremii wywołanej przez HSV-1, HSV-2 i VZV w tej grupie chorych, pod warunkiem stosowania chemioprophylaktyki przeciwwirusowej.

4.c.3) Zastosowanie metody PCR z detekcją w czasie rzeczywistym w diagnostyce wybranych wirusowych zakażeń narządowych i ogólnoustrojowych

Metody wykorzystujące technikę PCR z detekcją w czasie rzeczywistym znalazły w ostatnich latach szerokie zastosowanie w rutynowej diagnostyce zakażeń wirusowych. Istnieje jednak szereg sytuacji, w których potencjał techniki qPCR może stanowić wartościowe uzupełnienie istniejących metod diagnostycznych. W **pracach 7 – 9** przedstawiono wyniki zastosowania metod qPCR w szczególnych sytuacjach klinicznych.

Praca 7, „Viral Nucleic Acids in the Serum Are Dependent on Blood Sampling Site in Patients with Clinical Suspicion of Myocarditis” skupia się na ocenie przydatności wykrywania wirusowych kwasów nukleinowych we krwi obwodowej oraz krwi pobranej z jamy serca w rozpoznawaniu zapalenia mięśnia sercowego lub kardiomiopatii pozapalnych o podłożu wirusowym w odniesieniu do wyników badania bioptatów mięśnia sercowego. Badanie obejmowało 70 osób z klinicznym podejrzeniem zapalenia mięśnia sercowego (ZMS) lub pozapalnej kardiomiopatii rozsztrzeniowej (iDCM, *inflammatory cardiomyopathy*), którzy w okresie 12 miesięcy przed badaniem przechodzili ostre zakażenie wirusowe górnych dróg oddechowych, a u których wykluczono zawał mięśnia sercowego jako przyczynę pogorszenia parametrów kardiologicznych. Ocena występowania i poziomu wirusowych kwasów nukleinowych przeprowadzono przy użyciu qPCR. Na podstawie kryteriów histopatologicznych u 11% badanych rozpoznano ZMS, a fenotyp iDCM obserwowano u 63%. W porównaniu z pacjentami z iDCM, osoby z cechami zapalenia

były młodsze, miały lepsze parametry echokardiograficzne i bardziej stabilny obraz kliniczny, przy czym prezentowały bardziej nasilone objawy wg. klasyfikacji NYHA. U osób z ZMS krótszy był czas od przebytej infekcji wirusowej, który wynosił średnio 3 miesiące, podczas gdy u pacjentów z iDCM – 12 miesięcy. Wirusowe kwasy nukleinowe wykryto w próbkach mięśnia sercowego 32 pacjentów (46%), dotyczyło to 6 osób z ZMS (74% w tej grupie) i 26 pacjentów z iDCM (59%). Najczęściej wykrywano parwowirusa B19 (B19V), którego DNA stwierdzono odpowiednio u 3 osób z ZMS i 16 osób z iDCM (odpowiednio 50% i 61%), natomiast DNA HHV-6 odpowiednio u 2 (33%) i 4 (15%) badanych. DNA adenowirusów (HAdV) i RNA enterowirusów (EV) wykryto tylko u 2 (8%) i 3 (12%) osób z iDCM. W dwóch przypadkach wykryto koinfekcje dwoma wirusami: B19 i CMV u pacjenta z ZMS oraz EV i HAdV u pacjenta z iDCM. W żadnej próbce nie wykryto DNA EBV. W grupach ZMS i iDCM nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w liczbie kopii wirusowego RNA lub DNA.

Wyniki badania DNA i RNA konkretnych wirusów w próbkach tkanki mięśnia sercowego oraz surowicy krwi pobranej z jamy serca były zgodne w 62% przypadków, natomiast dla próbek krwi obwodowej zgodność stwierdzono u 48% pacjentów. U trzech chorych z objawami iDCM oraz obecnością DNA B19V w tkance mięśnia sercowego, w surowicy krwi pobranej z jamy serca wykryto kwas nukleinowy innego wirusa (HAdV w dwóch przypadkach, EV w jednym). U jednego pacjenta z iDCM wykryto DNA HAdV w surowicy krwi przy braku wirusowego DNA lub RNA w sercu. W próbkach surowicy krwi nie wykryto DNA parwowirusa B19, mimo że wykryto go w tkance mięśnia sercowego.

Spektrum gatunków wirusów wykrywanych w próbkach mięśnia sercowego pozostaje w zgodzie z wynikami prezentowanymi w uprzednio publikowanych pracach, natomiast badania porównujące występowanie wirusowych kwasów nukleinowych w sercu oraz próbkach krwi u chorych z objawami ZMS ani iDCM nie były przedtem prowadzone. Obecność wirusowego DNA lub RNA w surowicy krwi u chorych z potwierdzonym zakażeniem wirusowym mięśnia sercowego może wynikać z uwalniania wirusów z miejsca zakażenia, tj. z tkanek serca lub być skutkiem toczącej się reinfekcji. Uwzględniając hemodynamikę, należy się spodziewać, że przy aktywnej replikacji wirusa w mięśniu sercowym, szansa jego wykrycia będzie wyższa we krwi pobranej z komory serca, niż we krwi obwodowej. Jest to zgodne z uzyskanymi

wynikami – jeżeli obecności DNA lub RNA w mięśniu sercowym towarzyszyła wiremia, liczba kopii była wyższa w surowicy krwi pobranej z jamy serca, niż w surowicy krwi obwodowej. Znajduje to także potwierdzenie w fakcie, że u pacjentów, u których wykrywano ten sam gatunek wirusa w mięśniu sercowym oraz we krwi pobranej z komory, parametry kliniczne, echokardiograficzne i histopatologiczne były gorsze, częściej też obserwowano u nich przewlekły stan zapalny. Z drugiej strony, zakażenie mięśnia sercowego, w którym wykrywa się niewielką liczbę kopii wirusowego kwasu nukleinowego, i któremu nie towarzyszy ani jego aktywna replikacja, ani cechy zapalenia, dotyczyło większości chorych, u których w tkankach serca wykrywano DNA B19V. Obserwowany w tej grupie zróżnicowany stopień upośledzenia wydolności serca jest raczej skutkiem zainicjowania i długotrwałego działania szeregu mechanizmów pozapalnych, w tym autoimmunologicznych, niż bezpośredniej aktywności cytolitycznej wirusa.

Podsumowując, wykrywanie wirusowych kwasów nukleinowych w surowicy krwi pobranej z komory serca wydaje się być istotne dla bardziej precyzyjnego potwierdzenia aktywnej replikacji wirusa w mięśniu sercowym, natomiast badanie krwi obwodowej prawdopodobnie nie ma znaczenia diagnostycznego.

W pracy 8, „Occurrence of viral DNA in paired samples of corneal rim and cornea preservation fluid”, metody qPCR zostały użyte do oceny ryzyka przeniesienia zakażenia wirusami opryszczki zwykłej lub adenowirusami podczas przeszczepienia rogówki, przy czym należy podkreślić, że temat ten nie był dotychczas analizowany w piśmiennictwie o zasięgu międzynarodowym.

W odniesieniu do innych procedur transplantacyjnych, zabieg przeszczepienia rogówki związany jest z bardzo niskim ryzykiem niepowodzenia. Ciągły rozwój technik zabiegowych, zaawansowane metody bankowania tkanek oraz stosowane leczenie immunosupresyjne i przeciwwirusowe skutkuje zadowalającymi parametrami morfologicznymi i fizjologicznymi przeszczepianych rogówek w okresie pooperacyjnym. Z drugiej strony, neowaskularyzacja rogówki, uprzednie odrzucanie przeszczepu oraz stan zapalny wynikający z zakażenia bakteryjnego, wirusowego lub grzybiczego, stanowią najważniejsze czynniki zwiększające ryzyko choroby przeszczepu, co może prowadzić do utraty przezierności rogówki, a nawet do jej całkowitego odrzucenia. Płyn używany do przechowywania rogówek przygotowywanych do wszczepienia jest badany pod kątem skażenia bakteryjnego lub

grzybiczego, a u dawcy wyklucza się zakażenie HIV, HBV oraz HCV. Wirusy opryszczki zwykłej są głównym czynnikiem zapalenia rogówki, stwierdzanego u 0,9% biorców. Opryszczkowe zapalenie rogówki wynika najczęściej z reaktywacji latentnej formy wirusa, co implikuje także ryzyko przeniesienia zakażenia z przeszczepianą rogówką. Mimo to, badanie rogówek w tym kierunku nie należy do działań rutynowych. Problem ten dotyczy także adenowirusów, drugiego pod względem częstości występowania czynnika etiologicznego zapalenia rogówki.

Badanie obejmowało 57 kompletów próbek, w skład których wchodziły fragmenty rogówek pozostałych po przeszczepieniu oraz płyn używany do ich przechowywania. Materiał badany reprezentował wszystkie zabiegi przeszczepienia wykonane w okulistycznej klinice uniwersyteckiej na przestrzeni dziewięciu miesięcy. Przy użyciu PCR z detekcją w czasie rzeczywistym w obu materiałach wykrywano DNA wirusów opryszczki typu 1 i 2 (przy użyciu metody komercyjnej) oraz adenowirusów (z wykorzystaniem metody opracowanej i zoptymalizowanej samodzielnie). Obecność wirusowego DNA stwierdzono w trzech rogówkach: w dwóch z nich wykryto DNA adenowirusa, a w jednej – HSV-1. Genom HSV-1 wykryto zarówno w rogówce, jak i w płynie użytym do jej konserwacji. Adenowirusowe DNA wykryto w rogówkach, lecz nie w płynie konserwującym. W żadnej próbce nie wykryto DNA HSV-2.

W przypadku pierwszego z dwóch biorców rogówki, u których stwierdzono DNA adenowirusa, w okresie 18 miesięcy po zabiegu nie zaobserwowano powikłań wskazujących na wirusowe zakażenie rogówki. Rogówka utrzymywała pełną przejrzystość, a ostrość wzroku wynosiła 0,9. Biorca ten nie należał do grupy wysokiego ryzyka odrzucenia przeszczepu. U drugiego biorcy rogówki, w której wykryto adenowirusowe DNA, pomimo odpowiedniego i intensywnego leczenia, przeszczepiona tkanka nie utrzymywała prawidłowej funkcji i uległa odrzuceniu. Konieczny był kolejny zabieg przeszczepienia. Rogówka, w której (a także w płynie konserwującym) wykryto DNA HSV-1 została przeszczepiona biorcy, który po zabiegu cierpiał na szereg powikłań, prowadzących ostatecznie do perforacji rogówki, mimo stosowanego leczenia przeciwwirusowego. Także w tym przypadku konieczny był ponowny zabieg przeszczepienia. Obaj pacjenci, u których konieczne było ponowne przeszczepienie, należeli do grupy wysokiego ryzyka.

W dotychczas opublikowanych wynikach obserwacji klinicznych brakuje danych na temat obecności wirusów oftalmotropowych w rogówkach przeznaczonych do przeszczepienia. W obecnym badaniu stwierdziliśmy wirusowe zakażenie przeszczepionych rogówek w 6,4% przypadków. W tym kontekście można stwierdzić, że poza podwyższonym ryzykiem zakażeń powodowanych u biorców rogówek przez bakterie i grzyby, należy liczyć się także z realnym ryzykiem reaktywacji wirusowych zakażeń latentnych lub persystentnych, których źródłem może być przeszczepiona rogówka. W ostatnich latach upowszechniają się przeszczepienia sztucznych rogówek, które wykazują szereg zalet, w tym brak ryzyka przeniesienia zakażenia wirusowego. Jednak w odniesieniu do rogówek naturalnych, konsekwencją uzyskanych wyników jest postulat ich badania pod kątem wirusów opryszczki i adenowirusów oraz eliminacji tych, w których wykryto wirusy. Metoda qPCR wydaje się być odpowiednim narzędziem do tego celu.

W pracy 9 „**Microbiological Findings and Treatment of EBV-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Case Report**” opisano zastosowanie qPCR w diagnostyce rzadkiego schorzenia będącego komplikacją zakażenia pierwotnego wirusem Epsteina-Barr (EBV). Zakażenia tym wirusem są rozpowszechnione – w populacji polskiej przeciwciała swoiste świadczące o przebytych zakażeniach występują u 96% osób dorosłych. Zdecydowana większość zakażeń pierwotnych przebiega bezobjawowo. Z klinicznego punktu widzenia, najpopularniejszym wariantem zakażenia EBV jest mononukleoza zakaźna, w której komórkami docelowymi dla wirusa są małe spoczynkowe limfocyty B CD21+. Dla kontrastu, skrajnie rzadko obserwuje się zakażenia, w których wirus atakuje limfocyty T CD8+, co może skutkować wystąpieniem zespołu limfohistiocytozy hematofagocytarnej (HLH, *hemophagocytic lymphohistiocytosis*). Objawy obserwowane w tym schorzeniu są efektem deregulacji mechanizmu uwalniania cytokin, co skutkuje niekontrolowanym uogólnionym stanem zapalnym. Opisany przypadek dotyczył 17-letniego pacjenta, u którego początkowo rozpoznano mononukleozę zakaźną. Jednak wraz z upływem czasu, poza cechami wskazującymi na typowe zakażenie EBV, zaobserwowano objawy wskazujące na niekontrolowany stan zapalny. Wdrożone leczenie nie odniosło pożądanego skutku. Zlecono wykonanie rozszerzonego zestawu badań mikrobiologicznych, obejmujących pełną diagnostykę bakteriologiczną i mykologiczną. Przy użyciu qPCR, we krwi chorego monitorowano występowanie i poziom DNA

HSV-1 i HSV-2, VZV, CMV, HHV-6, EBV oraz parwowirusa B19, czyli wirusów, co do których udowodniono, że mogą inicjować niekontrolowaną reakcję zapalną. Badanie materiału pobranego ze zmian skórnych obejmowało wykrywanie powyższych wirusów przy użyciu qPCR oraz mikroskopię elektronową. Dodatkowo, u chorego monitorowano poziom przeciwciał swoistych przeciwko antygenom kapsydu, wczesnemu i jądrowemu EBV w klasach IgM i IgG. Wyniki badań wykluczyły zakażenie bakteryjne lub grzybicze jako przyczynę objawów. Wykluczono także zakażenie HBV i HCV. Spośród badanych wirusów, zarówno we krwi, jak i w materiale ze zmian skórnych wykryto DNA EBV, natomiast badanie w kierunku pozostałych wirusów dało wynik ujemny. Z użyciem mikroskopii elektronowej w skórze stwierdzono obecność struktur o morfologii nukleokapsydów herpeswirusów. Na podstawie obrazu klinicznego, wyników badań laboratoryjnych oraz wirusologicznych rozpoznano zespół hematófagocytozy o podłożu EBV, co stanowiło podstawę do rozpoczęcia leczenia zgodnie z protokołem HLH-94. Osiągnięto znaczącą poprawę stanu chorego. Wiremia EBV, która na początku hospitalizacji osiągnęła poziom 140 000 kopii DNA/ml, stale się zmniejszała, a jej wygaszenie nastąpiło po 23 dniach od rozpoczęcia leczenia. Nastąpiła też znaczna poprawa większości parametrów laboratoryjnych i klinicznych. Mimo polepszenia stanu chorego, w trakcie leczenia stwierdzono jednak stały spadek poziomu przeciwciał przeciwko EBV, aż do wartości bliskich zeru, co wskazywało na poważne zaburzenia ich syntezy. Należy podkreślić, że zespół hematófagocytozy o podłożu EBV jest w Polsce obserwowany skrajnie rzadko, a u dzieci i ludzi młodych, przy braku prawidłowego leczenia, obarczony jest bardzo wysokim ryzykiem zgonu. Przeprowadzona diagnostyka mikrobiologiczna, w tym zastosowana ilościowa metoda PCR, ułatwiła w tym wypadku prawidłowe rozpoznanie.

Podsumowanie

- Opracowano spójny protokół projektowania i optymalizacji metod qPCR dla potrzeb badań wirusologicznych.
- Porównując metody qPCR służące do oznaczania liczby kopii DNA EBV wykazano, że:
 - na wielkość błędów wyników ilościowych oznaczeń DNA EBV przy użyciu qPCR wpływa zastosowana metoda izolacji kwasów

nukleinowych, rodzaj kalibracji, parametry metody użytej do amplifikacji i detekcji DNA wirusa, w tym dobór jednostki, w której wyrażone są wyniki oraz brak dokładności wynikający z błędu ludzkiego;

- zastosowanie zewnętrznego standardu do normalizacji wyników umożliwia do pewnego stopnia zmniejszenie rozbieżności wynikających z zastosowania metod o różnej wydajności, jednak nie eliminuje w pełni różnic w wynikach uzyskanych dla konkretnych próbek, szczególnie dla wartości bliskich granicom oznaczalności;
 - największym źródłem rozbieżności wyników ilościowych oznaczeń DNA EBV były zastosowane metody izolacji kwasów nukleinowych oraz użyte metody qPCR. Najmniejszy negatywny wpływ miał typ użytego cyklera, co potwierdzono także dla metody wykrywającej DNA CMV.
- Wykazano istotną przydatność metod wykorzystujących technikę qPCR w diagnozowaniu i monitorowaniu zakażeń wywołanych przez alfa- i betaherpeswirusy u biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych:
 - przy zastosowaniu tej techniki wykazano u badanej grupy chorych, że reaktywacja CMV we wczesnym okresie poprzyszczepowym dotyczyła 49-64% allogenicznych biorców HCST, w przypadku HHV-6 – 29%, a w przypadku HHV-7 – od 30 do 43% biorców. Koinfekcje dwoma betaherpeswirusami stwierdzono u 26-30% biorców. Reaktywacje stwierdzano najczęściej między 20 a 70 dniem po wdrożeniu immunosupresji;
 - u tych chorych stwierdzono jednoznaczny związek między reaktywacją HHV-7 i CMV. Wyraża się on zwiększeniem poziomu wirerii obu wirusów oraz wydłużeniem czasu jej trwania;
 - reaktywacja HSV-1 we wczesnym okresie poprzyszczepowym dotyczyła 22,6% biorców allogenicznych HSCT, podczas gdy reaktywacja HSV-2 i VZV była znacznie rzadsza. Chemioprophylaktyka z użyciem acyklowiru zmniejszała w tej grupie pacjentów ryzyko wystąpienia objawowych form zakażenia wirusami opryszczki.

- Ponadto wykazano przydatność metody qPCR w wybranych niestandardowych sytuacjach klinicznych:
 - w próbkach tkanek serca pobranych od osób z objawami zapalenia mięśnia sercowego lub kardiomiopatii rozsztrzeniowej najczęściej wykrywno DNA parwowirusa B19; dotyczyło to ponad połowy badanych chorych. Rzadziej wykrywano DNA HHV-6, adenowirusów, enterowirusów oraz CMV. Stwierdzono możliwość występowania koinfekcji B19V/CMV oraz HAdV/EV. Wykazano związek między obecnością wirusowego DNA w mięśniu sercowym oraz surowicy krwi pobranej z jamy serca, lecz nie stwierdzono takiego związku dla surowicy krwi obwodowej;
 - stwierdzono, że istnieje ryzyko przeniesienia zakażenia HSV-1 oraz HAdV wraz z przeszczepianą rogówką, co wskazuje na potrzebę badania rogówek przeznaczonych do przeszczepienia w kierunku wirusów oftalmotropowych;
 - metoda qPCR wykazała swoją przydatność w rozpoznaniu limfohistiocytozy hematofagocytarnej o podłożu EBV.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) opis i tematyka głównych kierunków pozostałych badań naukowych

Przedmiotem moich zainteresowań, praktycznie od początku pracy, była wirusologia i diagnostyka zakażeń wirusowych, zwłaszcza u biorców HCST. Poza cyklem dziewięciu prac, stanowiących podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, mój dorobek naukowy obejmuje publikacje, w których znajdują się wyniki wstępne w stosunku do prac stanowiących dzieło, lub też stanowiące ich rozwinięcie. Poniżej przedstawiam tematykę stanowiącą przedmiot badań, obejmującą problem zakażeń wywołanych u biorców HSCT przez betaherpeswirusy oraz adenowirusy.

Zakażenia wywołane przez betaherpeswirusy u biorców allogenicznych przeszczepów komórek krwiotwórczych

Problemem zakażeń wywołanych przez betaherpeswirusy zajmuję się od 2002 roku. Reaktywacje wirusów z tej grupy zdarzają u się u znacznego odsetka biorców, jednak tylko część z nich przybiera postać na tyle poważną, aby wymagała leczenia przeciwwirusowego. Gancyklowir, lek pierwszego rzutu w leczeniu zakażeń wirusem cytomegalii, wykazujący skuteczność także wobec HHV-6 i HHV-7, ma działanie mielotoksyczne, co u biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych nabiera szczególnego znaczenia. W związku z tym, precyzyjne rozpoznanie reaktywacji CMV ma podstawowe znaczenie przy podejmowaniu decyzji o rozpoczęciu leczenia. Dokonano oceny ryzyka reaktywacji betaherpeswirusów u biorców komórek krwiotwórczych separowanych z krwi obwodowej, a także biorców komórek krwi pępowinowej. Potwierdzono związek między nasileniem i dynamiką wiremii CMV a ryzykiem wystąpienia zakażenia objawowego wirusem cytomegalii. Badania nad czynnikami ryzyka wpływającymi na szansę reaktywacji betaherpeswirusów wskazują jednoznacznie na związek między występowaniem GvHD a ryzykiem reaktywacji betaherpeswirusów.

Badania dotyczące oceny przydatności metod qPCR w wykrywaniu oraz nad zakażeniami CMV, HHV-6 i HHV-7 zostały udokumentowane w pracach:

1. Chabros Ł, **Przybylski M**, Dzieciatkowski T, Łuczak M. Modyfikacja i optymalizacja metod PCR do wykrywania regionu MIE ludzkiego herpeswirusa typu 5. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*. 2008;60:79-86.
2. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Gieryńska M, Łuczak M. Wykorzystanie metody real-time PCR do wykrywania DNA ludzkiego herpeswirusa typu 6. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*. 2008;60:259-265
3. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Kawecki D, Midak-Siewirska A, Łuczak M, Młynarczyk G. Zastosowanie metody real-time PCR i systemu Light-Cycler do wykrywania ludzkiego herpeswirusa typu 7 (HHV-7). *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 2009, 61:93-98
4. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Tomaszewska A, Rokicka M, Łuczak M. Comparison of two methods used for monitoring low-copy cytomegalovirus infection in a patient with chronic myeloid leukemia after unrelated umbilical cord blood transplantation. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 2007, 55, str. 199-203 (IF=1,689)
5. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Torosian T, Sulowska A, Łuczak M. Zakażenia cytomegalowirusem (HHV-5, CMV) u biorców allogenicznych

przeszczepów komórek krwiotwórczych w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Warszawie w latach 2004-2006. *Acta Haematologica Polonica*, 2007, 38, str. 325-330

6. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Torosian T, Tomaszewska A, Łuczak M. Prevalence of human herpesvirus 6 antibodies and DNA in allogeneic stem cell transplant patients: two-year single centre experience. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 2008, 56, 201-206 (**IF=1,432**)
7. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Kawecki D, Gieryńska M, Sulowska A, Torosian T, Łuczak M, Jędrzejczak WW, Młynarczyk G., Częstość wykrywania DNA ludzkiego herpeswirusa typu 6 u pacjentów Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie w latach 2003-2007. *Przegląd Epidemiologiczny*, 2009, 63:35-38
8. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Basak GW, Torosian T, Tomaszewska A, Jędrzejczak WW, Młynarczyk G. Detection of β -Herpesviruses in Polish Adult Cord Blood Stem Cell Recipients by Real-Time PCR: Single Centre Study. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 2010, 58:467-472 (**IF=2,385**)
9. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Basak GW, Torosian T, Jędrzejczak WW, Młynarczyk T. Human Herpesvirus 7 in Allogeneic Hemopoietic Stem Cell Transplant Recipients in the Central Clinical Hospital in Warsaw: A Three-Year Survey. *Intervirology*, 2011, 54:25-29 (**IF=2,337**)
10. Tormanowska M, Dzieciatkowski T, Rynans S, **Przybylski M**, Gronkowska A, Basak GW, Młynarczyk G, Tomaszewska A. Wstępne badania nad występowaniem chromosomowej integracji ludzkiego herpeswirusa typu 6 (CI-HHV-6) wśród polskich biorców i dawców krwiotwórczych komórek macierzystych. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 2016;68:113 – 117

Zakażenia wywołane przez adenowirusy u biorców allogenicznych przeszczepów komórek krwiotwórczych

Zakażenia adenowirusowe należą do jednych z najczęstszych wirusowych zakażeń u człowieka. W populacji immunokompetentnej wirusy te wykazują zazwyczaj niewielki potencjał chorobotwórczy, wywołując przede wszystkim zakażenia górnych dróg oddechowych oraz biegunki. Ciężkie postaci zakażeń adenowirusowych o charakterze ogólnoustrojowym i narządowym obserwowane są przede wszystkim u osób z

niedoborami immunologicznymi. Prezentowany cykl prac dotyczących adenowirusowych zakażeń biorców allogenicznych przeszczepów komórek krwiotwórczych otwiera praca metodologiczna, opisująca projektowanie i optymalizację metody qPCR, stosowanej w dalszych badaniach, polegających na wykrywaniu DNA adenowirusów w surowicy krwi. Zakażenia adenowirusowe we wczesnym okresie poprzyszczepowym dotyczyły 57% biorców. U 20% wiremii HAdV miała charakter krótkotrwały, podczas gdy u 37% trwała ponad 7 dni. Większość zakażeń przebiega z niską wiremią (średnio 618 kopii DNA/ml). U 27% badanych, wiremii nie towarzyszyły żadne objawy. Zakażenia objawowe miały lekki przebieg u 52% biorców i przebiegały jako gorączka, której nie towarzyszyły inne objawy (36%), zakażenie górnych dróg oddechowych (11%) lub biegunka (5%). Zakażenia o poważniejszym przebiegu obejmowały krwotoczne zapalenie pęcherza (17% biorców), zapalenie oskrzeli (3%) lub zapalenie płuc (5%). Wykazano związek między wystąpieniem wiremii HAdV a objawami i stopniem nasilenia GvHD. Wyniki sekwencjonowania genu heksonu wyodrębnionych szczepów HAdV wykazały, że za zakażenia najczęściej odpowiadały wirusy z gatunku C (HAdV-2 u 37,5%, a HAdV-5 u 8% biorców, a HAdV-6 u 5%). Prócz tego wykryto należące do gatunku B typy 3 (20% biorców), 7 (15%) i 4 (7,5%). Pomimo relatywnie niskiego potencjału chorobotwórczego adenowirusów, w grupie biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych obserwowane są rzadkie przypadki zakażeń ogólnoustrojowych przebiegających z wysoką wiremią i ciężkimi objawami. Przypadek takiego zakażenia, któremu towarzyszyło ciężkie krwotoczne zapalenie pęcherza, opisany został w pracy nr 4.

Wyniki zostały opublikowane w pracach:

1. Rola A, **Przybylski M**, Dzieciatkowski D, Turowska A, Łuczak M.
Zastosowanie metody real-time PCR z użyciem sond Taqman do wykrywania zakażeń adenowirusami człowieka. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*. 2007;59:371-377
2. Rynans S, Dzieciatkowski T, Krenke R, Grabczak M, Kołkowska-Leśniak A, **Przybylski M**, Sulowska A, Chazan R, Warzocha K, Młynarczyk G.
Wykorzystanie ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym do wykrywania zakażeń dolnych dróg oddechowych wywołanych adenowirusami u osób z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego. *Przegląd Epidemiologiczny*, 2011;65(2):333-338

3. Ulrych E, Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Zduńczyk D, Boguradzki P, Torosian T, Waszczuk-Gajda A, Rynans S, Wróblewska M, Jędrzejczak WW, Młynarczyk G. Disseminated Adenovirus Disease in Immunocompromised Patient Successfully Treated with Oral Ribavirin: A Case Report. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 2011 (IF=2,541)
4. Rynans S, Dzieciatkowski T, Basak GW, Snarski E, **Przybylski M**, Wróblewska M, Jędrzejczak WW, Młynarczyk T. Human adenovirus infection in patients subjected to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – a three year single centre study. *Acta Virologica*, 2012 56 (1): 85-87 (IF=0,759)
5. **Przybylski M**, Rynans S, Waszczuk-Gajda A, Biliński J, Basak GW, Jędrzejczak WW, Wróblewska M, Młynarczyk G, Dzieciatkowski T. Sequence typing of human adenoviruses isolated from Polish patients subjected to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - a single center experience. *Hematology*. 2018, 28:1-6 (IF=1,244)

Wirusowe zakażenia mięśnia sercowego w populacji immunokompetentnej

Problem związany z diagnozowaniem zakażeń wirusowych mięśnia sercowego został zarysowany w **pracy nr 7**, wchodzącej w skład osiągnięcia prezentowanego w niniejszym autoreferacie (pkt. 4.c.3). Ponadto, tej tematyce poświęcone są jeszcze dwie prace w moim dorobku. W przedstawionej poniżej pracy nr 1 opisana została charakterystyka kliniczna, czynniki etiologiczne oraz proponowany model patogenezы ostrych i przewlekłych form wirusowych zakażeń serca. W pracy nr 2 przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat roli zakażeń wirusowych w etiopatogenezie ostrych zespołów wieńcowych.

1. Kuffner M, Pawlak A, **Przybylski M**. Viral Infection of the Heart: Pathogenesis and Diagnosis. *Polish Journal of Microbiology*, 2016, 65(4):391–398 (IF=0,746)
2. Pawlak A, Wiligórska N, Wiligórska D, Frontczak-Baniewicz M, **Przybylski M**, Krzyżewski R, Ziemia A, Gil RJ. Viral heart disease and acute coronary syndromes - often or rare coexistence? *Curr Pharm Des*. 2018, 24(4):532-540 (IF=2,611)

Diagnostyka zakażeń dolnych dróg oddechowych, spowodowanych przez bakterie atypowe, wirusy i grzyby u chorych z niedoborami odporności

Oprócz zakażeń wirusowych, zajmowałem się oraz dalej zajmuję diagnostyką molekularną prowadzoną w kierunku innych drobnoustrojów (bakterie, grzyby), zwłaszcza sprawiających trudności w klasycznej hodowli. O ile standardowa diagnostyka bakteryjnych zakażeń dolnych dróg oddechowych jest w grupie osób przyjmujących immunosupresję postępowaniem rutynowym, o tyle zakażenia wywoływane przez inne patogeny (wirusy, mykoplazmy, chlamydie i grzyby) pozostają dla większości laboratoriów sporym wyzwaniem. Wynika to z faktu, że metody hodowlane wykazują w tych przypadkach niewielką przydatność, natomiast metody biologii molekularnej ograniczone są ich zdolnością do specyficznego wykrywania konkretnej sekwencji DNA lub RNA. Biorąc pod uwagę mnogość potencjalnych czynników etiologicznych tych zakażeń, dostępne rozwiązania obejmują albo wykonanie szeregu badań w kierunku różnych patogenów, co jest trudne do zastosowania z wielu względów (koszt, różnice w metodologii), albo zastosowanie zaawansowanych metod diagnostycznych, które w pojedynczej reakcji wykrywają wiele różnych patogenów. Przykładem może być opisana w pracy nr 1 technika FilmArray, wykorzystująca nieswoistą amplifikację DNA i RNA z późniejszą swoistą amplifikacją i detekcją produktu na zasadzie analogicznej jak w qPCR, jednak wykorzystującą podobieństwo genetyczne niektórych grup patogenów i technikę multipleksowania. Metoda ta w pojedynczej reakcji wykrywa trzy patogeny bakteryjne i osiem różnych gatunków/grup wirusów oddechowych. W pracy nr 2 zastosowano odmianę nested PCR, identyfikującą *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* i *L. pneumophila*. Osobnym problemem jest diagnostyka zakażeń grzybiczych, zwłaszcza wywołanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Obecne możliwości diagnostyczne przy użyciu metod niehodowlanych opisane zostały w pracy nr 3.

1. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Sulowska A, Rynans S, Młynarczyk G, Swoboda-Kopeć E. Wykorzystanie techniki *FilmArray* w diagnostyce zakażeń dróg oddechowych u osób z niedoborami odporności. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 2013, 65:181-185
2. Grabczak EM, Krenke R, **Przybylski M**, Kołkowska-Leśniak A, Chazan R, Dzieciatkowski T. Prevalence of Pulmonary Infections Caused by Atypical Pathogens in non-HIV Immunocompromised Patients. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 935:1-11 (**IF=1,937**)

3. Dzieciatkowski T, Sulowska A, **Przybylski M**. Diagnostyka serologiczna i molekularna grzybic inwazyjnych. *Postępy Mikrobiologii*, 2015, 54(3):291–297

Przydatność metod biologii molekularnej w diagnostyce innych zakażeń wirusowych- opisy przypadków.

1. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Marchel H, Kawecki D, Prokopienko M, Młynarczyk G. Wykorzystanie techniki Real-Time PCR w diagnostyce opryszczkowego zapalenia mózgu jako powikłania zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych wywołanego przez *Listeria monocytogenes* – opis przypadku. *Postępy Mikrobiologii*, 2010, 49:325-328
2. Dzieciatkowski T, **Przybylski M**, Rusicka P, Mądry K, Boguradzki P, Marchel H, Jędrzejczak WW, Młynarczyk G. Przydatność wielokierunkowej diagnostyki mikrobiologicznej na przykładzie jednoczesnego zakażenia czterema herpeswirusami jako powikłania po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych – opis przypadku *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 2014, 66:23-28
3. Rybka M, **Przybylski M**, Machura P, Dzieciatkowski T, Krenke R, Wróblewska M. Wykorzystanie serologicznych i molekularnych metod w diagnostyce pierwotnego ostrego zapalenia wątroby spowodowanego przez ludzki herpeswirus typu 6 – opis przypadku. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 2017;69:43 - 48

b) dane bibliometryczne

Sumaryczny impact factor z opublikowanych prac, według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi:

- z prac pełnotekstowych 39,987
- z opisów przypadków 6,011
- z prac pogładowych 8,112

Liczba opublikowanych prac oraz punktacja JCR i MNiSW:

	Przed doktoratem			Po doktoracie		
	Liczba prac	IF	MNiSW/ KBN	Liczba prac	IF	MNiSW/ KBN
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	4	2,708	36	41	37,279	591
Opisy przypadków	-	-	-	9	6,011	98
Prace pogładowe	1	-	3	8	8,112	144
RAZEM	5	2,708	39	58	51,402	833

Łącznie:

IF = 54,110

MNiSW = 872

Liczba cytowań (bez autocytowań): 70

Indeks Hirscha: 5

c) Udział w toczących się projektach naukowo-badawczych:

1. „Rola białek opiekuńczych Hsp90 w replikacji ludzkiego adenowirusa 5” (016/23/B/NZ6/02536): projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, realizowany we współpracy z Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
2. „Identyfikacja wirusów oraz ocena zmian ultrastrukturalnych towarzyszących obecności wirusa w tkance mięśnia sercowego u chorych z podejrzeniem kardiomiopatii rozstrzeniowej pozapalnej” (2014/13/B/NZ4/03832): projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, realizowany we współpracy z Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN oraz Kliniką Kardiologii Inwazyjnej Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA

d) Członkostwo w towarzystwach naukowych

- jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Polskiego Towarzystwa Wirusologicznego oraz Europejskiego Towarzystwa Wirusologii Klinicznej (European Society for Clinical Virology, ESCV)

e) Udział w konferencjach naukowych

- Jestem autorem lub współautorem 80 doniesień zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, z czego 39 zostało opublikowanych w suplementach periodyków naukowych

Działalność dydaktyczna

- wykłady i zajęcia praktyczne ze studentami kierunku lekarskiego (I i II Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny) oraz studentami medycyny *English Division* (Warszawski Uniwersytet Medyczny)
- w latach 2005 – 2013 wykłady i zajęcia praktyczne ze studentami kierunków pielęgniarstwo, ratownictwo medyczne i zdrowie publiczne (Wydział Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny)
- wykłady i zajęcia praktyczne dla studentów Oddziału Medycyny Laboratoryjnej (Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny). Ponadto opracowanie programu i prowadzenie zajęć fakultatywnych dla tych studentów.
- wykłady i zajęcia praktyczne w ramach obowiązkowego kursu specjalizacyjnego w zakresie mikrobiologii medycznej dla diagnostów laboratoryjnych „Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka zakażeń wirusowych” – lata 2003-2011, 2013-2014, 2017
- udział, jako zaproszony wykładowca, w szkoleniu „Zakażenia układu oddechowego” organizowanym przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
- opieka nad zagranicznymi studentami medycyny, odbywającymi praktyki w ramach miesięcznego programu wymiany naukowej SCORE (Standing Committee on Research Exchange), organizowanego przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Studentów Medycyny (IFMSA) – lata akademickie 2013/2014, 2015/2016 i 2016/2017

Publikacje dydaktyczne

Jestem autorem i współautorem rozdziałów w podręcznikach:

- „Mikrobiologia lekarska” pod redakcją P.B. Heczko, M. Wróblewskiej i A. Pietrzyk, wyd. PZWL, Warszawa, 2014
- „Choroby wirusowe w praktyce klinicznej” pod redakcją M. Wróblewskiej i T. Dzieciatkowskiego, wyd. PZWL, Warszawa, 2017

Jestem tłumaczem rozdziałów w podręczniku „Mikrobiologia dla stomatologów”, wyd. I pod red. Mirosława Łuczaka, PZWL, Warszawa, 2004; wyd. II pod red. G. Młynarczyk i E. Swobody-Kopeć, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2014

Opieka nad pracami magisterskimi i licencjanckimi

Byłem promotorem prac magisterskich:

- Dagmara Misiak „Wykrywanie genów klastra oporności *vanD Enterococcus faecium*” na kierunku pielęgniarstwie, Wydział Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2007
- Katarzyna Król-Wysocka „Rola pielęgniarki w zapobieganiu zakażeniom szpitalnym w dużych i małych Zakładach Opieki Zdrowotnej” na kierunku pielęgniarstwie, Wydział Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2010
- Natalia Żeber „Opracowanie i optymalizacja łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym do wykrywania ludzkiego herpeswirusa typu 4 i 8” na kierunku biotechnologicznym, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, 2013
- Iga Gałat „Analiza występowania i dynamiki mian przeciwciał swoistych wobec wirusa Epsteina-Barr u pacjentów Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego” na kierunku biologicznym Wydziału Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, 2016

Byłem opiekunem prac magisterskich:

- Katarzyna Leś „Opracowanie metody wykrywania enterowirusów człowieka z użyciem techniki reakcji polimeryzacji łańcuchowej w czasie rzeczywistym” na

kierunku Analityka Medyczna, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2009, promotor: prof. dr hab. Mirosław Łuczak

- Szymon Kierat „Opracowanie i optymalizacja łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusa ospy wietrznej i półpaśca” na kierunku Analityka Medyczna, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2011, promotor: prof. dr hab. Grażyna Młynarczyk

Byłem recenzentem jednej pracy magisterskiej na kierunku pielęgniarskim oraz jednej pracy licencjackiej na kierunku Zdrowie Publiczne Wydziału Nauki o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Recenzowanie publikacji w czasopismach indeksowanych na liście Journal Citation Reports (JCR):

Pediatric Infectious Diseases Journal: 2010

Advances in Medical Sciences: 2010, 2011

Saudi Medical Journal: 2017

BMC Infectious Diseases: 2017

Virus Research: 2018

Nagrody

1. 2007: Nagroda dydaktyczna zespołowa pierwszego stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za wieloletnie, wzorowe prowadzenie kursów z zakresu diagnostyki beztlenowców oraz diagnostyki zakażeń wirusowych dla lekarzy, diagnostów laboratoryjnych i mikrobiologów
2. 2018: Nagroda dydaktyczna zespołowa pierwszego stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za współautorstwo publikacji „Choroby wirusowe w praktyce klinicznej”, red. M. Wróblewska, T. Dzieciatkowski, wyd. PZWL, Warszawa, 2017

Maciej Przybylski