

24. 08. 2022

INSTYTUT GRUŹLICY I CHORÓB PŁUC

Zakład Mikrobiologii
Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy

Kierownik Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć

01-138 Warszawa ul. Płocka 26

Tel./ fax. + 22 4312182, e- mail: e.kopec@igichp.edu.pl

Warszawa, 22.08.2022

Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć

Kierownik Zakładu Mikrobiologii IGiCHP

Warszawa ul. Płocka 26

Recenzja

pracy doktorskiej magister Aleksandry Kozińskiej pod tytułem *Charakterystyka populacji paciorkowców beta-hemolizujących grupy A izolowanych z zakażeń dróg oddechowych w Polsce w latach 2006-2017*

Choroby zakaźne układu oddechowego to grupa najczęstszych, szeroko rozpowszechnionych chorób od przeziębienia i grypy po gruźlicę i zapalenie płuc. Niektóre z nich mogą powodować poważne, a nawet zagrażające życiu problemy zdrowotne.

Wśród czynników etiologicznych odpowiedzialnych za zakażenia układu oddechowego jednym z groźniejszych jest *Streptococcus pyogenes* (paciorkowiec β -hemolizujący grupy A) *ang. group A Streptococcus*, GAS, który jest ścisłym patogenem człowieka i poza ludźmi nie ma innego rezerwuaru w środowisku. Do zakażenia dochodzi głównie poprzez adhezję i kolonizację komórek nabłonka powierzchni błony śluzowej górnych dróg oddechowych. *Streptococcus pyogenes* może wywoływać szerokie spektrum chorób od nieinwazyjnych, takich jak zapalenie gardła, szkarlatyna i liszajec, po choroby inwazyjne, takie jak róża, zapalenie tkanki łącznej, zapalenie płuc, bakteriemia, martwicze zapalenie powięzi i zespół wstrząsu toksycznego. Niewłaściwe leczenie zakażeń wywołanych przez *S. pyogenes* może skutkować między innymi poinfekcyjnymi następstwami: ostrą gorączką reumatyczną i popaciorkowcowym kłębuszkowym zapaleniem nerek.

Transmisja z człowieka na człowieka zachodzi głównie poprzez bezpośredni kontakt z wydzielinami dróg oddechowych lub bezpośredni kontakt ze zmianami skórnymi osób zakażonych. Czas od zakażenia do pojawienia się pierwszych objawów choroby jest różny. W przypadku zapalenia gardła i migdałków wynosi od 2 do 5 dni, zakażeń skóry 5–7 dni, a inwazyjnych zakażeń od 1 do 3 dni. Mechanizmy patogenetyczne leżące u podstaw tych zakażeń są słabo poznane, głównie dlatego, że każdy z nich jest kulminacją wysoce złożonych interakcji między mechanizmami obronnymi ludzkiego gospodarza, a specyficznymi czynnikami zjadliwości tej bakterii.

Za objawy kliniczne wywołane przez *S. pyogenes* odpowiedzialne są liczne czynniki wirulencji, które umożliwiają kolonizację, rozprzestrzenianie się, niszczenie komórek i tkanek w zakażonym organizmie oraz obronę przed układem immunologicznym. Do najważniejszych związanych z komórką należy białko M, kwas lipotejchojowy i białko F odpowiedzialne za przyłączanie się bakterii do komórek gospodarza. Białko M jest również odpowiedzialne za hamowanie opsonizacji poprzez wiązanie z regulatorami dopełniacza i fibrynogenem. Jak wykazały liczne badania jest ono jednym z ważniejszych czynników wirulencji *S. pyogenes*, ponieważ mutanty pozbawione białka M ulegają natychmiastowej fagocytozie.

S. pyogenes wytwarza również egzotoksyny, takie jak toksyna pirogenna (erytrogenna), która jest odpowiedzialna za wysypkę w przebiegu szkarlatyny i zespół wstrząsu toksycznego. Inne czynniki zjadliwości to streptokinaza, hialuronidaza i streptolizyny, które pomagają w inwazji i niszczeniu tkanek.

Streptococcus pyogenes kolonizuje błony śluzowe nosa i gardła u bezobjawowych nosicieli oraz u części osób wiele miesięcy po ustąpieniu objawów klinicznych zakażenia.

Bezobjawowe nosicielstwo w gardle występuje we wszystkich grupach wiekowych, jednak najczęściej jest identyfikowane wśród dzieci w około 15- 20% przypadków, natomiast wśród dorosłych wynosi około 5%. Wydaje się więc, że nosicielstwo bezobjawowe reprezentuje dominujący liczbowo stan interakcji z ludzkim gospodarzem, ale do chwili obecnej opublikowano niewiele prac dotyczących wyjaśnienia mechanizmów tego zjawiska, które ma kluczowe znaczenie dla utrzymywania się patogenu w populacji.

Na podstawie badań dotyczących fenotypu *Streptococcus pyogenes* stwierdzono, że szczepy izolowane od nosicieli charakteryzują się mniejszą zjadliwością związaną między innymi z niższym poziomem wytwarzania kwasu hialuronowego i białka M w porównaniu ze szczepami izolowanymi z miejsc zakażenia. Sekwencjonowanie genomu umożliwiło zidentyfikowanie

polimorfizmów genetycznych GAS charakterystycznych dla nosicielstwa jednak do chwili obecnej nie wyjaśniono ich znaczenia.

W ostatniej dekadzie nastąpił znaczny wzrost znaczenia chorób zakaźnych z punktu widzenia zdrowia publicznego. Badania epidemiologiczne stanowią tutaj ważny element nadzoru.

W przypadku *S. pyogenes* ważną częścią tego nadzoru epidemiologicznego nad chorobą są charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów występujących w danej populacji.

Pojawienie się nowego klonu może ewoluować powoli poprzez akumulację mutacji punktowych lub przez pozyskiwanie nowego materiału genetycznego przez horyzontalny transfer genów. Spadek częstości występowania w populacji klonu może być wynikiem zmniejszenia zjadliwości, zwiększenia sił obrony gospodarza (odporność stadna) lub zastąpienia serotypu przez bardziej „dopasowany” klon.

Praca mgr Aleksandry Kozińskiej dotyczy istotnego problemu zdrowia jakim są zakażenia GAS. Wybór tematu pracy przez Doktorantkę należy ocenić wysoko, jako zasadny naukowo i pożądany ze względu na charakter aplikacyjny wyników do monitorowania sytuacji epidemiologicznej tych zakażeń, dla których czynnikiem etiologicznym jest *Streptococcus pyogenes*.

Celem badań podjętych przez Doktorantkę była analiza fenotypowa i genotypowa szczepów *Streptococcus pyogenes* izolowanych od chorych w Polsce z zakażeń układu oddechowego w latach 2006 – 2017. Cel ten realizowano poprzez:

- Określenie determinant oporności,
- Oznaczenie fenotypu lekooporności na wybrane chemioterapeutyki,
- Ustalenie mechanizmów oporności,
- Identyfikację czynników wirulencji,
- Zbadanie struktury populacji *S. pyogenes* poprzez analizę regionu genu *emm* kodującego białko M i profilowanie fagowe

Cele pracy zostały sformułowane w sposób przejrzysty i jasno wytyczają kierunek prowadzenia badań.

Badania zaplanowane przez Autorkę doskonale wpisują się w tematykę badań Promotora pracy Pani dr hab Anny Baraniak, kierownika Zakładu Biotechnologii Leków i Bioinformatyki NIL, która od wielu lat zajmuje się szeroko pojętymi zagadnieniami dotyczącymi analizy epidemiologicznej zakażeń człowieka wywoływanych przez bakterie Gram-ujemne i mechanizmów nabywania przez te bakterie lekooporności. (czy mechanizmy można nabyć, może tylko lekooporności)

Układ pracy jest typowy, zawiera wszystkie rozdziały przyjęte zwyczajowo w pracach doktorskich. We wstępie Autorka opisuje szczegółowo wiele aspektów dotyczących zakażeń wywołanych przez *Streptococcus pyogenes* poprzez charakterystykę gatunku, jego chorobotwórczość, zjawisko nosicielstwa, epidemiologię zakażeń oraz zagadnienia dotyczące transmisji zakażeń, mechanizmów oporności na leki oraz metod stosowanych w dochodzeniach molekularnych dotyczących wykrywania podobieństw genetycznych szczepów. Wstęp pracy jest napisany ładnym, przejrzystym, naukowym językiem, a przedstawione dane literaturowe opisujące wszystkie najważniejsze osiągnięcia badawcze są właściwie zinterpretowane.

Materiał do badań stanowiło 1449 szczepów *Streptococcus pyogenes* wyizolowanych z zakażeń układu oddechowego. Szczepy pochodziły z 59 ośrodków badawczych z terenu całej Polski, które przysłano do NIL w ramach realizacji licznych projektów badawczych i sieci naukowych - 85% szczepów wyhodowano z wymazów z gardła.

Analiza epidemiologiczna wykazała, że najwięcej szczepów pochodziło od dzieci w przedziale wieku 5-9 (36,2%) i 10-14 lat (11,4%) natomiast wśród dorosłych od pacjentów w wieku 30- 39 lat (12%). Częstsze zakażenia dróg oddechowych o etiologii *S. pyogenes* wśród dzieci związane są z większym zagęszczeniem w przedszkolach i szkołach. Sprzyja to transmisji zakażeniom drogą kropelkową, a także wynika z jeszcze nie w pełni wykształconych u dzieci mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.

Na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej hiperzmiennego regionu genu *emm* kodującego białko M, wśród 1449 szczepów *Streptococcus pyogenes* wyróżniono 46 serotypów. Dominował serotyp M1, który zidentyfikowano u 263 (18,2%) badanych szczepów, następnie M12, M28 i M89. Przeprowadzona analiza częstości występowania

serotypów w latach 2006-2017 wykazała w badanej populacji zwiększoną liczbę serotypów M1 i M12 szczepów oraz zmniejszającą się liczbę szczepów o serotypach M28 i M89 na przestrzeni lat objętych badaniem? Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w częstości występowania najczęstszych serotypów w najliczniej reprezentowanych grupach wiekowych dzieci i dorosłych.

W badaniach dotyczących wykrywania genów warunkujących oporność na makrolidy wśród 1449 szczepów gen *ermA*, *ermB* I, *mefA* stwierdzono u 209 (14,4%) szczepów. Determinanty oporności na tetracyklinę (geny *tetO* lub *tetM*) zidentyfikowano w 185 (12,8%) szczepach. Największy odsetek szczepów *Streptococcus pyogenes* posiadających geny oporności zarówno na makrolidy jak i tetracykliny stwierdzono dla serotypu M77 i była to zależność istotna statystycznie ($p < 0,0001$). Wśród szczepów należących do tego serotypu u ponad 90% zidentyfikowano gen *tetO*, warunkujący oporność na tetracyklinę, a dla 67,8% szczepów gen *ermA* związany z opornością iMLS_B.

Mam pytanie do Doktorantki Czy stwierdzono brak korelacji pomiędzy genotypem i fenotypem lekooporności szczepów *Streptococcus pyogenes*?

Przeprowadzona w pracy analiza wykrywania determinatów wirulencji wykazała, że najczęściej wykrywanymi genami kodującymi superantygeny były *smeZ*, *speG* i *speJ*. Geny *speG* i *smeZ* zidentyfikowano we wszystkich typach *emm*, natomiast gen *speJ* głównie w *emm1*, *emm28* i *emm12*. Analiza korelacji pomiędzy serotypem *Streptococcus pyogenes*, a profilem wirulencji wykazała, że wśród szczepów dominującego serotypu M1 znamienie statystycznie częściej identyfikowano geny *speA*, *speJ*, *smeZ*. Podobną korelację pomiędzy superantygenem a serotypem stwierdzono dla: M3 *speA*, *speK*, *smeZ*, *ssa*, M4 *speC*, *ssa*, M28 *speC*, *speJ*, *speK*, M75 *speL*, *speM*, M6 *speH*, *speK* oraz M12 *speH*, *speI*.

Czy Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników mogłaby wskazać, który z badanych serotypów posiadający geny kodujące superantygeny stanowi szczególnie zagrożenie w przypadku zakażeń inwazyjnych wywołanych przez *Streptococcus pyogenes*?

Doktorantka badanie pokrewieństwa pomiędzy szczepami przeprowadziła za pomocą profilowania fagowego. Analizie poddano najliczniejsze serotypy M1, M3, M4, M6, M12, M28, M75, M77 i M89. Wykrywanie swoistych, mobilnych elementów genetycznych wykazało zróżnicowanie dla najliczniejszych serotypów M1 i M4 w > 80%, dla M77 i M89 90% oraz dla M3, M6, M12, M28 i M75 > 90%.

Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić przyczynę tak dużego zróżnicowania szczepów w obrębie zidentyfikowanych serotypów *Streptococcus pyogenes* ?

Czy charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów *S. pyogenes* pochodzących z zakażeń nieinwazyjnych jest znacząco różna w stosunku do szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych w populacji chorych w Polsce ? Czy takie badania porównawcze prowadzone są w innych krajach ?

Czy Doktorantka widzi celowość prowadzenia krajowego rejestru szczepów *S. pyogenes* z zakażeń nieinwazyjnych?

Cele pracy zostały zrealizowane i podsumowane w 7 wnioskach. Jako Recenzent stwierdzam, że brakuje mi wniosków dotyczących uzyskanych wyników. Moim zdaniem wnioski przypominają wyniki.

Dyskusja prowadzona jest interesująco i świadczy o dobrej znajomości tematu. W tej części Doktorantka na 14 stronach odnosi swoje wyniki do danych opisywanych w literaturze polskiej i międzynarodowej. Jest to wartościowe, dobrze wybrane piśmiennictwo pochodzące głównie z ostatnich lat.

Przed przygotowaniem przez Doktorantkę pracy do druku proponuję wprowadzenie kilku zmian merytorycznych i redakcyjnych.

Tytuł

Praca dotyczy przede wszystkim zakażeń górnych dróg oddechowych, szkoda że w tytule brakuje informacji, że szczepy pochodzą z zakażeń nieinwazyjnych.

Streszczenie.

Brakuje podsumowania wyników

Wyniki

Moim zdaniem o izolacie mówimy wtedy, kiedy nie jest znany gatunek bakterii.

Proponuje przy wszystkich odsetkach podawać liczbę. Brakuje tej informacji np. na str 55, na str 57 znajduje się tylko opis „trend zwykły”. W medycynie podajemy konkretne wartości „wzrost o w stosunku do„

Str 58

Jakie wnioski z ryc 5?

Podsumowanie:

Moje uwagi nie umniejszają w niczym wysokiej wartości pracy, którą oceniam bardzo dobrze. Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani magister Aleksandry Kozińskiej uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte, a uzyskane wyniki

należy uznać za oryginalne i bardzo wartościowe. Na koniec mojej recenzji chcę podkreślić dużą staranność w przygotowaniu pracy, która ilustrowana jest dobrze przygotowanymi graficznie tabelami i rycinami.

Praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktorantki i jest dowodem jej umiejętności planowania i realizowania badań naukowych. Ponadto chciałabym podkreślić, że Pani mgr Aleksandra Kozińska jest współautorem 18 publikacji, a w 5 jest pierwszym Autorem o łącznym współczynniku IF 51,307! punktach MNiS: 1500 i h-index=9, co stanowi, przed uzyskaniem stopnia doktora, wyróżniający się dorobek w karierze naukowej.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art.179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. Poz.1669 z późn. zm.).

Pracę przedstawioną mi do recenzji oceniam pozytywnie i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Biostruktury WUM o dopuszczenie Doktorantki mgr Aleksandry Kozińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Prof. dr hab. n. med.
Ewa Augustynowicz-Kopeć

KIEROWNIK
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc