



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Kozińskiej

pt. „ Charakterystyka populacji paciorkowców beta-hemolizujących grupy A izolowanych z zakażeń dróg oddechowych w Polsce w latach 2006 – 2017”

wykonanej w **Zakładzie Badań Biomedycznych**
Narodowego Instytutu Leków w Warszawie
pod kierunkiem **promotora dr hab. Anny Baraniak**
promotora pomocniczego dr Urszuli Łopaciuk

Streptococcus pyogenes, paciorkowiec grupy A (GAS) jest bardzo ważnym ludzkim patogenem bakteryjnym o szerokich możliwościach wytwarzania czynników wirulencji i dużym, zróżnicowanym działaniu chorobotwórczym. Od bezobjawowej kolonizacji górnych dróg oddechowych i skóry poprzez zapalenie gardła i migdałków - anginę, chorobę wieku dziecięcego - szkarlatynę, różę, liszajec, do niebezpiecznego, zagrażającego życiu rozprzestrzeniania się bakterii w organizmie o piorunujących przebiegu zakażenia inwazyjnego połączonego z bakteremią i martwicą tkanek oraz zespołu paciorkowcowego wstrząsu toksycznego (streptococcal toxic shock syndrome – STSS). Szeroki potencjał patogenny tego drobnoustroju powoduje również poważne poinfekcyjne konsekwencje wynikające z krzyżowych reakcji immunologicznych prowadzących do uszkodzenia serca, nerek, stawów.

S. pyogenes, mimo, że jest od dawna znanym patogenem w dalszym ciągu pozostaje w różnych obszarach geograficznych przedmiotem prowadzonych badań epidemiologicznych i genetycznych, które są podstawą do analiz profilu wirulencji, wykrywania wysoce inwazyjnych klonów, badania pokrewieństwa występujących szczepów i ich lekooporności. Szczególnie śledzenie utrzymującej się wrażliwości na penicylinę, kluczowy antybiotyk

w terapii zakażeń GAS oraz poziomu oporności na alternatywnie stosowane w leczeniu makrolidy, linkozamidy czy tetracyklinę są bardzo ważnym elementem badań, które powinny być systematycznie prowadzone i aktualizowane.

Podjęty przez panią mgr Aleksandrę Kozińską temat rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka populacji paciorkowców beta-hemolizujących grupy A izolowanych z zakażeń dróg oddechowych w Polsce w latach 2006 – 2017” porusza ważne aspekty analizy epidemiologicznej *S. pyogenes* połączone z badaniami molekularnymi wybranych czynników wirulencji w powiązaniu z lekoopornością. Objęcie analizą izolatów pochodzących z dróg oddechowych daje równocześnie obraz zróżnicowania populacji *S. pyogenes*, która potencjalnie może w wyniku translokacji stać się przyczyną niebezpiecznego, uogólnionego zakażenia.

Recenzowana rozprawa składa się z 7 rozdziałów obejmujących: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Materiały dodatkowe oraz Piśmiennictwo (224 pozycji). Na początku pracy jest umieszczony Spis rycin, Spis tabel, Wykaz stosowanych skrótów oraz Streszczenie w języku polskim i języku angielskim. Praca liczy 140 strony.

Cel rozprawy doktorskiej został właściwie sformułowany i adekwatny do podjętego tematu pracy, osiągnięty zgodnie z zaplanowanym zakresem badań.

We wstępie pracy zawierającym dwa podrozdziały Doktorantka przedstawiła, rodzaj *Streptococcus*, paciorkowce beta-hemolizujące oraz szeroką charakterystykę gatunku *S. pyogenes*. W punkcie „Chorobotwórczość, nosicielstwo oraz drogi transmisji” zawarła informację, iż rocznie na całym świecie jest 616 milionów przypadków infekcji gardła. Niestety dane te pochodzą z piśmiennictwa z roku 2005 – czyli z przed 17 lat. Również w punkcie „Epidemiologia GAS” dane pochodzą sprzed kilkunastu lat. Czy Doktoranta może przedstawić w tym zakresie bardziej aktualne informacje? Określenie „płytki agarowe” powinno być sformułowane zgodnie z nomenklaturą mikrobiologiczną.

Charakterystyka *S. pyogenes* została przedstawiona z uwzględnieniem zakresu cech gatunku, które w dalszym etapie pracy stały się teoretycznym tłem wykonywanych badań - opis i tabela zawierająca najczęstsze rodzaje zakażeń *S. pyogenes*, omówione czynniki wirulencji oraz charakterystyka oporności na antybiotyki stosowane w leczeniu zakażeń *S. pyogenes* z dokładnym omówieniem podstaw mechanizmów molekularnych oraz determinujących je genów. Uwzględniła ważną informację o utrzymującej się w dalszym ciągu wrażliwości na penicylinę, oraz niepokojące dane o izolacji szczepów *S. pyogenes*

z podwyższonymi wartościami MIC penicyliny w kategoriach wrażliwości i przyczyny przypadków nieskuteczności penicyliny w terapii. Bardzo istotną częścią wstępu jest opis wykorzystywanych metod do typowania szczepów *S. pyogenes*, m.in. opartej na badaniu sekwencyjnym i określeniu typu *emm*, wykorzystującej dużą różnorodność białka M czy służącej do profilowania fagowego. Przedstawione informacje we wstępie rozprawy są istotnym elementem wprowadzenia do dalszych etapów pracy i wskazują na przygotowanie teoretyczne Doktorantki.

W rozdziale Materiały i metody – pani mgr Aleksandra Kozińska wymieniła odczynniki, podłoża, bufory, inne materiały oraz aparaturę - wykorzystywane w badaniach. W obszernych tabelach podała również startery użyte w reakcjach PCR do określania typów białka M, genów oporności (*ermA*, *ermB*, *nefA*, *tetO*, *tetM*), wykrywania czynników wirulencji (jak np.: superantygeny, DNA-zy, proteazy) oraz startery użyte do profilowania fagowego. W punkcie „Materiał biologiczny” Doktoranta podaje pochodzenie izolatów klinicznych, które użyła do badań w rozprawie doktorskiej. Jest to 1449 izolatów *S. pyogenes* zgromadzonych w latach 2006 – 2017, pochodzących z zakażeń dróg oddechowych od polskich pacjentów. Doktoranta wskazuje, że są one nadesłane ze szpitali i laboratoriów z Polski w ramach realizacji projektów badawczych takich jak program Aleksander i Respi-Net, OPTY-NEURO-ESAC, Sieci Monitorowania Inwazyjnych Zakażeń (BINet) oraz uzyskane w ramach działalności KORLD. Niektóre z programów są dobrze znane jak np.: Aleksander, a wyniki badań zostały opublikowane, dotyczące podobnego zakresu jak w rozprawie (identyfikacja gatunku *S. pyogenes* i oznaczanie wrażliwości na penicylinę, erytomycynę, klindamycynę i teracyklinę).

Pewne moje wątpliwości budzi punkt 3.9 „Identyfikacja i przechowywanie izolatów *S. pyogenes*” zawierający przedstawione przez Doktorantkę informacje dotyczące jej postępowania w pracy doktorskiej z badanymi szczepami *S. pyogenes*: „po dostarczeniu do NIL z ośrodka nadsyłającego, ... posiewano ... hodowano, poddawano reidentyfikacji ... (VITEK, Streptex)...”.

Czy zawarcie tego punktu w rozprawie wskazuje, że te czynności wykonała Doktorantka?

W dalszych częściach pracy przedstawiony jest opracowany algorytm obejmujący zaplanowane kolejne etapy wykonywanych badań. W opisach zastosowanych metod badawczych brakuje mi bardziej szczegółów informacji dotyczących wykonania oznaczeń w przypadku np.: wykrywania genów oporności, czynników wirulencji, profilowania fagowego. Doktoranta ogranicza się tylko do bardzo krótkiej informacji i podanej pozycji z piśmiennictwa.

W moim odczuciu jest to zbyt uproszczony sposób przedstawienia metod wykonania badań w rozprawie doktorskiej.

W dalszym części pracy - Wyniki badań zostały przedstawione w sposób jasny, dobrze opracowany graficznie z wykorzystaniem kolorowych rycin i tabel. W ramach materiałów dodatkowych umieszczonych na końcu pracy, podane były ujęte w tabelach, informacje o pochodzeniu szczepów, obejmujące nazwy ośrodków (z nadanymi im kodami) z których je wysłano oraz szczegółowe wyniki profilowania fagowego dla serotypów. Przeważającym materiałem klinicznym, z którego pochodziły szczepy *S. pyogenes*, zdecydowanie (85% izolatów) były wymazy z gardła. W podziale na kategorie wiekowe chorych, największy odsetek dotyczył pacjentów w wieku 5 - 9 lat, 0 - 4 oraz 10 - 14. W wyniku badania serotypów szczepów, na podstawie sekwencji nukleotydowej białka M, wyróżniono 46 serotypów. Dominującym był M1 o tendencji zwykłej na przestrzeni analizowanych lat. Następnie w podobnych ilościach M12 i M28 oraz czwarty M89, z których M28 i M89 wykazywały tendencję spadkową. Ciekawym zestawieniem wyników jest analiza zawarta na rycinie 5, przedstawiająca graficzne opracowanie obrazujące wzrost liczby najczęściej oznaczanych serotypów *S. pyogenes* w kolejnych latach z uwzględnieniem ośrodków z których zostały przesłane. Oporność na erytromycynę została wykryta u 14,4% szczepów, natomiast analiza genetyczna wskazała, że oporność na erytromycynę związaną była przede wszystkim z obecnością genu *ermA*. W przypadku oporności na tetracyklinę w zbliżonych wartościach były wykrywane oba geny *tetO* i *tetM*. Przedstawiona analiza powiązanych korelacji w występowaniu genów oporności wskazuje na dość wysoki odsetek (67,8%) izolatów posiadających chromosomalny gen *ermA* i gen *tetO*, podobną, ale z niższym odsetkiem szczepów (41,7%), wykryto zależność w występowaniu genu *ermB* i genu *tetM*. Kolejnym badaniem wzajemnych korelacji wyników była analiza wykrytej obecności genów determinujących oporność na antybiotyki i serotypu szczepu. Zdecydowanie najwięcej (91,4%) szczepów o serotypie M77 zawierały geny oporności na makrolidy i tetracykliny. Fenotypowe badania krzyżowej oporności wykazały w przeważającej ilości występowanie mechanizmu indukcyjnego - iMLS_B wynikającego z obecności genu *ermA*, rzadziej (27,5%) występował fenotyp konstytutywny - cMLS_B determinowany przez gen *ermB*, najrzadziej fenotyp M związany z obecnością genu *mefA*. Kolejnym etapem badań było wykrywanie czynników wirulencji 1404 szczepów zatwierdzonych do badań w zakresie 20 możliwych determinant wirulencji wśród których stwierdzono występowanie 232 profili. Przeprowadzono również

ocenę związku determinant wirulencji z oznaczonym serotypem. Z pośród chromosomalnych genów superantygenów najczęściej występował *smeZ* oraz *speG*, które były obecne również we wszystkich typach *emm*. Ustalone profile wirulencji wykazywały największą różnorodność w serotypach M89, M1 i M4. Zestawienia wyników umieszczono w tabelach. W obrębie badanej grupy szczepów *S. pyogenes* stwierdzono 507 profili fagowych.

Dyskusja zawarta w rozprawie obejmuje analizę, interpretację wyników i podsumowanie wynikające z porównania prezentowanych badań na tle danych uzyskanych z przytaczanego piśmiennictwa. W przeprowadzonych analizach wyników, Doktorantka odnosi się do wcześniejszych publikacji, często bardzo odległych w czasie, dotyczących badań szczepów *S. pyogenes*. Omawiając kluczowe informacje wynikające z uzyskanych wyników, konfrontuje je z danymi prezentowanymi przez innych autorów, szczególnie w zakresie obserwowanego wzrostu lub spadku występowania oznaczanych w rozprawie cech szczepów. A w przypadku np.: oznaczonych serotypów *S. pyogenes*, zwraca uwagę na pewną specyfikę zgromadzonych izolatów wykorzystanych w rozprawie, które pochodziły z przypadków nieinwazyjnych zakażeń i nie obejmowały wszystkich, ale gromadzonych w różnych ilościach na potrzeby realizowanych tematów badawczych i przesyłanych od współpracujących ośrodków medycznych w Polsce. Styl i sposób przeprowadzonej dyskusji jest odpowiedni, natomiast tak jak we wstępie rozprawy, również w dyskusji pojawiają się źródła danych sprzed kilkunastu lat. Natomiast istotnym elementem w dyskusji jest odniesienie się do bieżących informacji dotyczących udziału *S. pyogenes* w zakażeniach w Polsce i przytoczenie aktualnych danych epidemiologicznych z naszego kraju.

Wnioski zostały sformułowane w postaci siedmiu punktów oznaczonych literami od a do g. Zawierają końcowe podsumowanie wykonanych badań. Obejmują najważniejsze, informacje wynikające z uzyskanych wyników. Niestety zawierają po części również wartości wyników badań. Proponuję poprawienie wniosków i większe uogólnienie w ich sformułowaniu. Szczególnie dotyczy to punktu b, d, e, g.

W podsumowaniu stwierdzam, iż rozprawę doktorską mimo przedstawionych wielu moich uwag i wątpliwości dotyczących wykorzystania szczepów zgromadzonych i przeznaczonych do wykonania innych badań - oceniam pozytywnie. Chcę podkreślić istotny zakres prezentowanych w rozprawie analiz szczepów *S. pyogenes* oraz przeprowadzone ciekawe porównywane korelacje uzyskanych wyników. Przedstawiona praca, ze względu na wykonaną analizę, uzupełnia charakterystykę szczepów *S. pyogenes*, które powodowały w

latach 2006 - 2017 nieinwazyjne zakażenia polskich pacjentów. Zapewne kontynuowanie badań z uwzględnieniem izolatów *S. pyogenes* pochodzących od chorych z zakażeń nieinwazyjnych oraz inwazyjnych po roku 2017, w kolejnych latach, byłoby bardzo cennym, dalszym uzupełnieniem badań wykonanych przez Doktorantkę.

Uważam, iż rozprawa doktorska na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne mgr Aleksandry Kozińskiej pt.: „Charakterystyka populacji paciorkowców beta-hemolizujących grupy A izolowanych z zakażeń dróg oddechowych w Polsce w latach 2006 – 2017” spełnia wymagania ustawowe.

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 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).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych o dopuszczenie mgr Aleksandry Kozińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Alina M. Olender