



Akceptuję  
Hjz

**Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**  
**Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii**  
**Nanobiomedycynej**

ul. Mickiewicza 2C, 15-089 Białystok, Poland  
tel. +48 85 748 54 15, fax +48 85 748 54 16

Białystok, 11-03-20 22

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

Lek. Agnieszki Piwowarczyk pt. „Analiza przydatności technik sekwencjonowania następnej generacji do oceny występowania czynników zakaźnych w zapaleniu wnętrza gałki ocznej” wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Marty Wróblewskiej w Katedrze i Klinice Okulistyki Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Samodzielnym Publicznym Klinicznym Szpitalu Okulistycznym.

Praca dotyczy problemu identyfikacji drobnoustrojów w materiale diagnostycznym pochodzącym z ciała szklistego i komory przedniej oka u pacjentów z zapaleniem wnętrza gałki ocznej, uznawanego za jeden z najgroźniejszych stanów okulistycznych, który może prowadzić do szybkiej i nieodwracalnej utraty widzenia. Ze względu na gwałtowne zwiększenie liczby wykonywanych zabiegów usunięcia zaćmy, tj. najczęściej wykonywanej na świecie operacji okulistycznej, częstość występowania zapalenia wnętrza gałki ocznej stale wzrasta. Z tego też względu, badania mające na celu lepsze poznanie czynników etiologicznych tych zakażeń, które mogą pomóc w rozwoju nowych metod diagnostycznych i wdrożenie optymalnych opcji terapeutycznych są bardzo istotne. Przełomem w ich opracowaniu może być wprowadzenie standardów postępowania uwzględniających najnowsze metody molekularne pozwalające na jednoczesne określenie bakterii będących czynnikami etiologicznymi tych zakażeń, czynników ich wirulencji i zmienności. W związku z powyższym, wybór tematu rozprawy doktorskiej Lek. Agnieszki Piwowarczyk należy uznać za niezmiernie ważny.

Rozprawa doktorska liczy 176 stron i obejmuje: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki i ich omówienie, wnioski, wykaz cytowanego piśmiennictwa, opinie komisji bioetycznej i aneks, w którym przedstawiono schemat postępowania w zapaleniu wnętrza gałki ocznej po operacji zaćmy wg. Europejskiego Towarzystwa Chirurgów Zaćmy i Chirurgów

Refrakcyjnych (ESCRS), jak również sposoby leczenia między innymi ostrego pooperacyjnego, pourazowego, endogennego bakteryjnego, i grzybiczego zapalenia wnętrza gałki ocznej wg. Patel i wsp. z 2020 r.

W rozdziale „Wstęp”, Doktorantka przedstawiła w sposób przejrzysty klasyfikację zapalenia wnętrza gałki ocznej, ich etiologię, epidemiologię, obraz kliniczny, leczenie, rokowanie, powikłania oraz postępowanie diagnostyczne ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki mikrobiologicznej. Na uwagę i wysoką ocenę zasługuje przedstawiony we wstępie opis technik sekwencjonowania w podrozdziale mikrobiologia molekularna.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie Doktorantka sformułowała główny cel rozprawy, którym była ocena przydatności technik sekwencjonowania następnej generacji (NGS) do oceny występowania czynników zakaźnych w zapaleniu wnętrza gałki ocznej (ZWGO). Dodatkowo nakreśliła cztery cele szczegółowe tj.: 1) porównanie danych uzyskanych metodą hodowlaną z danymi uzyskanymi za pomocą sekwencjonowania; 2) porównanie danych uzyskanych za pomocą sekwencjonowania materiału biologicznego pobranego z komory przedniej oka z danymi uzyskanymi za pomocą sekwencjonowania materiału biologicznego pobranego z ciała szklistego danego pacjenta; 3) ocenę taksonomiczną drobnoustrojów w materiale pobranym z ciała szklistego i z komory przedniej oka za pomocą technik sekwencjonowania następnej generacji; i 4) ocenę za pomocą metod sekwencjonowania występowania drobnoustrojów w 9 postaciach klinicznych ZWGO.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka objęła analizą pacjentów hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Klinicznym Szpitalu Okulistycznym (SPKSO) z zapaleniem wnętrza gałki ocznej, którzy byli leczeni w okresie od 09/2013 r. do 10/2018 r. (Grupa A, n=33) oraz od 10/2018 r. do 01/2022 r. (Grupa B, n=26). Grupę A pacjentów stanowili chorzy, których dane oceniono retrospektywnie na podstawie analizy dokumentacji medycznej, ze szczególnym uwzględnieniem wyników metod hodowlanych próbek klinicznych pobranych z komory przedniej (KP) (n=13), oraz z ciała szklistego (CS) (n=28). Grupę B pacjentów stanowili chorzy zgłaszający się do SPKSO w celu wykonania pilnej witrektomii przez część płaską ciała rzęskowego. W grupie B pacjentów pobrano materiał kliniczny na posiew z komory przedniej (n=17) i z ciała szklistego (n=26) oraz na sekwencjonowanie z komory przedniej (NGS II generacji n=10, NGS III generacji n=5) i z ciała szklistego

(NGS II generacji n=21, NGS III generacji n=7). Z wykorzystaniem pobranego materiału klinicznego prowadzono hodowle na różnych podłożach, a wyhodowane drobnoustroje zidentyfikowano metodą spektrometrii mas. Oznaczenie lekowrażliwości przeprowadzono przy użyciu metody dyfuzyjno–krążkowej i/lub z wykorzystaniem komercyjnych pasków z gradientem stężeń antybiotyków. W diagnostyce molekularnej większość próbek zbadano metodą NGS II generacji, którą przeprowadzono na platformie do sekwencjonowania MiSeq (Illumina). Przeprowadzono również sekwencjonowanie III generacji na platformie GridION X5 (ONT). Sposób zaplanowania doświadczeń oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki.

Uwagę zwraca bardzo dokładny opis uzyskanych wyników i bardzo dojrzałe przeprowadzona ich analiza i dyskusja. Doktorantka umiejętnie odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych, a sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza bardzo dobre przygotowanie merytoryczne i szeroką wiedzę w zakresie tematyki prowadzonych badań. Ze względu na ogromną potrzebę rozwoju nowych metod diagnostyki i terapii ZWGO powodowanych przez bakterie, interesującym elementem przedstawionych danych jest wykazanie różnic w hodowli próbek z komory przedniej i ciała szklistego w grupie A pacjentów przedstawionych w tabeli 29, jak również porównanie wyników hodowli próbek z komory przedniej i ciała szklistego z wynikami sekwencjonowania w grupie B pacjentów przedstawionych w tabeli 31. Interesujących informacji dostarcza także przeprowadzona analiza alfa i beta bioróżnorodności wyników uzyskanych z dwóch lokalizacji anatomicznych w gałce ocznej. Wobec rosnącej ilości informacji na temat roli adherencji bakterii i procesu formowania biofilmu w patogenezie zakażeń, interesującym uzupełnieniem tej części rozprawy mogłoby być poznanie opinii Doktorantki na temat możliwego mechanizmu, warunkującego zdolność kolonizacji narządu wzroku przez zidentyfikowane szczepy, jak również czynników które mogą powodować, że bakterie z rodzaju *Escherichia* zostały wykryte w relatywnie dużej ilości w większości próbek we wszystkich postaciach klinicznych zapalenia wnętrza gałki ocznej.

Przeprowadzone badania stały się podstawą do sformułowania przez Autorkę ośmiu logicznych wniosków, których treść upoważnia do stwierdzenia, że:

1. Techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS) umożliwiają wykrycie czynników zakaźnych w materiale biologicznym pobranym z gałki ocznej pacjentów z rozpoznaniem zapalenia wnętrza gałki ocznej (ZWGO).
2. W materiale pobranym z komory przedniej oka (KP) i ciała szklanego (CS) metoda hodowlana umożliwiła identyfikację bakterii należących do 3 rodzajów i 6 gatunków, natomiast technika NGS umożliwiła identyfikację bakterii do 103 rodzajów i 78 gatunków.
3. W materiale pobranym z KP i CS metoda hodowlana umożliwiła identyfikację grzybów należących do 1 rodzaju i 1 gatunku, natomiast technika NGS potwierdziła wszystkie dodatnie posiewy *Candida albicans* oraz dodatkowo wykazała obecność materiału genetycznego innych grzybów (np. *Hypocreales*, *Agaricomycetes*).
4. Za pomocą technik NGS w materiale pobranym z KP u pacjentów z ZWGO w analizie statystycznej z uwzględnieniem rodzaju *Escherichia* stwierdzono dominację bakterii z rodzaju *Escherichia*, natomiast bez rodzaju *Escherichia* wykazała dominację bakterii z rodzaju *Streptococcus*.
5. Za pomocą technik NGS w materiale pobranym z CS u pacjentów z ZWGO w analizie statystycznej z uwzględnieniem rodzaju *Escherichia* stwierdzono dominację bakterii z rodzaju *Escherichia*, natomiast po wykluczeniu rodzaju *Escherichia* stwierdzono dominację bakterii z rodzaju *Staphylococcus*.
6. Za pomocą technik NGS w 9 postaciach klinicznych ZWGO w analizie statystycznej z uwzględnieniem rodzaju *Escherichia* najczęściej zidentyfikowano bakterie z rodzaju *Escherichia* według kolejności: po zapaleniu rogówki, po przeszczepieniu rogówki oraz po witrektomii, natomiast w analizie bez rodzaju *Escherichia* stwierdzono dominację: po iniekcji leku anty-VEGF oraz po operacji zaćmy – bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, w ZWGO związanym z pęcherzykiem – bakterie z rodzaju *Streptococcus*, po przeszczepieniu rogówki – bakterie z rodziny *Micrococcaceae*, a po zapaleniu rogówki – zróżnicowana mikroflora bakteryjna (w tym bakterie z rodzaju *Serratia* i *Halolactibacillus*).
7. W KP najczęściej występowały bakterie z rodzaju *Streptococcus* oraz niezdefiniowany rodzaj z rodziny *Micrococcaceae*, natomiast w CS – bakterie z rodzaju *Staphylococcus* i *Enterococcus*.

8. Ośrodki wykonujące badania NGS powinny dążyć do uzyskania konsensusu w kwestii wyboru odpowiedniej metody sekwencjonowania do analizy próbek okulistycznych.

Stwierdzam, że praca autorstwa lek. Agnieszki Piwowarczyk spełnia wszystkie warunki określone w art. 13. ust. 1 *ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z późn. zm.)* w związku z art. 179 ust.1 *ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1669 z późn. zm.)*. Tym samym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Lek. Agnieszki Piwowarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wysoka wartość merytoryczna pracy upoważnia do zgłoszenia wniosku o wyróżnienie jej właściwą nagrodą ze względu na praktyczną wartość wyników, prawidłowo przygotowany plan doświadczeń i klarowność analizy uzyskanych danych, które warunkują ich opublikowanie w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym.



prof. dr hab. med. Robert Bucki