



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Kamińskiej

pt. „**Charakterystyka czynników zjadliwości związanych z adhezją oraz tworzeniem biofilmu u szczepów *Streptococcus agalactiae*”**

wykonanej w **Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej,**

Wydziału Farmaceutycznego

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Pod kierunkiem **prof. dr hab. n. med. Marzeny Gajęckiej**

Streptococcus agalactiae jest patogenem powodującym poważne infekcje u ludzi. Szczególną grupą ryzyka są noworodki, u których zakażenie może mieć charakter inwazyjny powodując zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, płuc i sepsę, co stanowi główną przyczynę zachorowalności i śmiertelności w tej grupie wiekowej. Do infekcji dochodzi w następstwie transmisji wertykalnej, podczas porodu drogami natury. *S. agalactiae* jest również niebezpiecznym patogenem dla kobiet ciężarnych oraz osób w podeszłym wieku z obniżoną odpornością, u których występują zakażenia o różnych postaciach i lokalizacji. Właściwości chorobotwórcze determinowane są przez szereg czynników wirulencji, które decydują o procesach rozwijającej się infekcji. Ważnym elementem patomechanizmu zakażenia *S. agalactiae* jest zdolność przylegania do komórek gospodarza i tworzenie biofilmu, co jest kluczowym etapem umożliwiającym pozostanie bakterii w obszarze początkowo bezobjawowej kolonizacji, a następnie w wyniku tworzącej się masy bakteryjnej rozwoju infekcji. Cechy biofilmu – o wiele mniejsza wrażliwość na środki przeciwbakteryjne i działanie

mechanizmów immunologicznych zwiększa utrzymywanie się kolonizujących struktur bakteryjnych, co może mieć duże znaczenie dla *S. agalactiae* jako składnika flory komensalnej dróg rodnych kobiety i sprzyjającej sytuacji do zakażenia noworodka. Niewątpliwie ważnymi w tym procesie są czynniki wirulencji bakterii takie jak otoczka zbudowana z typowo swoistych wielocukrów, które mogą spełniać rolę markerów epidemiologicznych, szereg białek adhezyjnych, fimbrie, czy występujący w ścianie komórkowej grupowo swoisty wielocukrowy antygen B. Istotna jest przy tym analiza różnych szczepów pochodzących z różnych materiałów klinicznych, zarówno kolonizacji jak i zakażeń inwazyjnych.

Podjęty temat rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka czynników zjadliwości związanych z adhezją oraz tworzeniem biofilmu u szczepów *Streptococcus agalactiae*” przez panią mgr inż. Dorotę Kamińską dotyczy ważnych cech analizowanych szczepów *S. agalactiae* w aspekcie ich zdolności do pozostania w obszarze kolonizacji, co jest warunkiem rozwoju infekcji lub może stwarzać dogodne warunki do przeniesienia drobnoustrojów w inne obszary organizmu lub na innego osobnika. Porównanie szczepów o różnym potencjale infekcyjnym, zdolności do adhezji, obecności różnych typów fimbrii, tworzenia biofilmu, czy oporności na antybiotyki jest kluczowym elementem badań, które mogą przyczynić się do wyjaśnienia różnic i powstałych zmiany we właściwościach izolatów pochodzących od różnych osób. Zastosowanie badań molekularnych umożliwi wykrycie genów potwierdzających obecność różnych typów fimbrii, genów kodujących różne białka z rodziny Alp. Interesująca jest również analiza korelacji badanych cech szczepów.

Przedstawione przez Autorkę cele pracy doktorskiej zostały dobrze sformułowane i adekwatne do podjętego tematu rozprawy, która ma typowy układ pracy eksperymentalnej. Składa się 13 rozdziałów obejmujących: Wstęp, Cel pracy, Część teoretyczną, Materiały i metody, Wyniki, Omówienie wyników i dyskusję, Wnioski, Spis tabel, rycin, Suplement, Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim – Summary, Piśmiennictwo. Na początku pracy autorka umieściła również wykaz użytych skrótów. Rozprawa doktorska liczy 134 strony.

Wstęp zawiera krótkie wprowadzenie w temat pracy. Po jasno sformułowanych Celach pracy, Autorka przedstawiła w Części teoretycznej bardzo dobrze opisane, wzbogacone w kolorowe ryciny, najważniejsze informacje charakteryzujące *S. agalactiae*, cechy i warunki tworzenia biofilmu bakteryjnego i udziału *S. agalactiae* w kolonizacji pochwy u kobiet. Bardzo istotne były również informacje dotyczące profilaktyki okołoporodowej wynikającej z dużego znaczenia nosicielstwa u kobiet ciężarnych wobec zakażeń u noworodków. Istotne też były

informacje dotyczące lekowrażliwości *S. agalactiae* i zwrócenie uwagi na najczęściej występujący u szczepów tego gatunku, mechanizm krzyżowej oporności MLSB.

W rozdziale Materiały i metody – Doktorantka przedstawiła informacje dotyczące pochodzenia badanych 165 szczepów. Odczynniki do badań i metody badawcze zostały opisane przejrzysto, uzupełnione kolorowymi rycinami. Uwzględnione zostały metody rutynowo stosowane w identyfikacji *S. agalactiae* i molekularne z zastosowaniem reakcji PCR oraz metody badania zdolności do wytwarzania przez bakterie biofilmu i zasadę jego interpretacji z ryciną przykładowego dodatniego wyniku. Bardzo dobrze zostały przedstawione również metody PCR serotypowania, oznaczenia różnych typów fimbrii, genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp. Określenie lekowrażliwości zostało wykonane metodą dyfuzyjno-krażkową oraz za pomocą pasków z gradientem stężeń antybiotyków do oznaczenia MIC. W analizie wyników zastosowano metody statystyczne.

Wyniki badań zostały przedstawione przez Doktorantkę w sposób bardzo dobry z wykorzystaniem tabel i kolorowych rycin, zdjęć żeli elektroforetycznych reakcji PCR. Wszystkie 165 szczepy Doktorantka zidentyfikowała jako *S. agalactiae* i wykazała zróżnicowaną zdolność do tworzenia biofilmu. Najwyższy odsetek o silnej zdolności do tworzenia biofilmu dotyczył szczepów, które pochodziły od osób dorosłych z zakażeniami nieinwazyjnymi. Natomiast najczęściej występował serotyp III, dominującymi fimbriami były PI-1 razem z PI-2a. Na podstawie badania występowania 5 genów kodujących białka z rodziny Alp, Autorka nie stwierdziła istotnych statystycznie różnic w ich występowaniu. W badaniu lekowrażliwości zwraca uwagę obecność mechanizmów krzyżowej oporności MLSB i to zarówno typu indukcyjnego jak i konstytutywnego i fenotypu M. Autorka dostosowała profil oznaczanych antybiotyków, zgodnie z rekomendacjami wykonania antybiogramu dla izolatu *S. agalactiae* pochodzącego z określonego materiału, co spowodowało, że mechanizm MLSB i M nie był oznaczany w przypadku szczepów pochodzących z moczu. Szkoda, że jednak nie zostały oznaczone wszystkie szczepy w ten sam sposób. Praca dotyczyła charakterystyki puli zgromadzonych szczepów i powinno być oznaczenie lekowrażliwości wszystkich badanych szczepów w ramach tego samego spektrum antybiotyków wraz ze zbadaniem występowania u wszystkich mechanizmu MLSB i M.

Omówienie wyników i dyskusja obejmuje wnikliwą analizę, interpretację i podsumowanie w kontekście danych z piśmiennictwa. Doktorantka zastosowała właściwy dobór przytaczanego piśmiennictwa (172 pozycji) podczas interpretacji i analizy wyników

badania. W rozprawie została potwierdzona zdolność wytwarzania biofilmu, który było różnie tworzony przez szczepy pochodzące z różnych materiałów klinicznych. Uzyskane wyniki serotypów okazały się spójne z oznaczeniami innych autorów w Polsce. Autorka wykryła wcześniej nie identyfikowane w naszym kraju serotypy VI i VII, nie zaobserwowała zależności między zdolnością do tworzenia biofilmu a serotypem i lekoopornością, natomiast stwierdziła obecność serotypu Ia fimbrii PI-2a oraz wystąpienie fimbrii typu PI-2a z PI-1 osobno albo pojedynczo u wszystkich szczepów, które twarzały silny biofilm. Zależność między obecnością genów z rodziny Alp a poszczególnymi serotypami wykazywała statystyczną istotność. Ważnym wnioskiem jest występowanie oporności na tetracykliny i wysoki odsetek konstytutywnej oporności MLSB (wśród badanych 129 szczepów).

Końcowe wnioski, w postaci 6 punktów zostały sformułowane bardzo dobrze zgodnie z uzyskanymi wynikami badań.

W podsumowaniu chciałam podkreślić wysoki poziom wiedzy i umiejętności Doktorantki w szerokim zakresie metodologicznym, co wskazuje na bardzo dobre przygotowanie do prowadzenia badań naukowych i duże możliwości dalszego rozwoju naukowego. Rozprawa doktorska została napisana w sposób logiczny, ładnym językiem, bardzo starannie, z bardzo dobrze przedstawionymi rycinami i tabelami. Uzyskane wyniki są istotnym wkładem w charakterystykę izolowany w Polsce szczepów *S. agalactiae* i mogą być podstawą do kontynuowania badań tego ważnego pod względem medycznym gatunku paciorkowca.

Rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Kamińskiej „Charakterystyka czynników zjadliwości związanych z adhezją oraz tworzeniem biofilmu u szczepów *Streptococcus agalactiae*” spełnia ustawowe wymagania stawiane tego typu rozprawom. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Doroty Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się również do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Kamińskiej ze względu na wysoki poziom wykonanych badań i wagę uzyskanych wyników.

Lublin dnia 14.12.2018

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Dr hab. n. med. Alina Włodarczyk