

**Recenzja pracy doktorskiej mgr farm. Marcina Ciszewskiego**

**pt. „ Czynniki chorobotwórczości *Streptococcus dysgalactiae* –  
paciorkowców ropotwórczych izolowanych od ludzi i zwierząt”**

wykonanej w **Katedrze Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej,  
Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej**

**Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Pod kierunkiem **prof. dr hab. n. farm. Eligii M. Szewczyk**

Wraz z rozwojem cywilizacji i udoskonalania metod badawczych coraz bardziej widoczna jest wzrastająca rola drobnoustrojów wywodzących się z patogenów zwierzęcych, które nabyły cechy umożliwiające powodowanie różnych zakażeń u ludzi, często poważnych, zagrażających życiu, nierzadko o charakterze epidemicznym. Postępujące zjawisko przemian drobnoustrojów wskazuje na szerokie możliwości adaptacyjne i zdolności do wytwarzanie nowych czynników wirulencji pozyskiwanych od innych patogenów lub zmian w obrębie ich genomów, które prowadzą do nabycia cech umożliwiających kolonizację i szybką adaptację do warunków nowego gospodarza. Zjawiska te zachodzą wieloetapowo prowadząc do postępujących procesów w zakresie nabywania czynników wirulencji i transformacji w drobnoustroje typowo patogenne dla człowieka. Przekraczanie barier gatunkowych w ewolucji bakterii jest podstawą ich zróżnicowania i rozszerzenia zakresu występowania w populacji ludzi i zwierząt. Problem ten dotyczy wielu „nowych” patogenów ludzkich, których pojawienie się może stwarzać poważne problemy diagnostyczne i terapeutyczne. Wieloetapowy proces tych przemian stwarza konieczność prowadzenia ciągłych badań

umożliwiających analizę i ocenę powstawania „nowych wersji” bakterii chorobotwórczych wywodzących się z mikrobiomu zwierzęcego, które stają się drobnoustrojami patogennymi dla ludzi. Pozyskiwanie nowych cech umożliwiających rozszerzenie zakresu gospodarzy i przekroczenie barier gatunkowych przez bakterie wywodzących się z rezerwuaru zwierzęcego stwarza poważne zagrożenie w rozprzestrzenianiu się drobnoustrojów wobec których występujące u człowieka mechanizmy odporności stają się nieskuteczne.

Jednym z gatunków, który jest przykładem zachodzących tego typu przemian - powoduje zakażenia u zwierząt i coraz częściej bywa izolowany z zakażeń u ludzi jest *Streptococcus dysgalactiae*. Ten beta-hemolizujący paciorkowiec jest znany przede wszystkim jako patogen wywołujący infekcje o różnej lokalizacji np.: u bydła, owiec, świń czy zwierząt domowych. U ludzi może powodować zakażenia skóry, gardła, tkanki łącznej, głównie u osób z obniżoną odpornością oraz zakażenia o charakterze inwazyjnym, prowadzące nawet do posocznicy i wstrząsu toksycznego.

Podjęty temat rozprawy doktorskiej: „Analiza czynników chorobotwórczości *Streptococcus dysgalactiae* – paciorkowców ropotwórczych izolowanych od ludzi i zwierząt” przez pana mgr farm. Marcina Ciszewskiego porusza ważne aspekty zakażeń występujących u ludzi, spowodowanych przez bakterie wywodzące się z drobnoustrojów chorobotwórczych dla zwierząt. Porównanie szczepów *S. dysgalactiae* izolowanych z zakażeń u zwierząt i ludzi w kontekście występujących cech wirulencji, zdolności do kolonizacji skóry ludzkiej oraz oporności na antybiotyki jest ważnym elementem badań, które mogą wyjaśnić powstające zmiany we właściwościach szczepów izolowanych od różnych gospodarzy. Interesująca jest również analiza możliwość nabycia przez *S. dysgalactiae* nowych cech ułatwiających adaptację do organizmu człowieka od innego również beta-hemolizującego paciorkowca typowo patogenego dla człowieka - *Streptococcus pyogenes*. Przeprowadzenie badań genetycznych dotyczących genów wirulencji daje szerokie możliwości porównawcze w obrębie izolowanych szczepów na podstawie danych uzyskanych z badań *in vitro* i zastosowanych symulacji komputerowych - badań porównawczych *in silico*.

Cele rozprawy doktorskiej zostały właściwie sformułowane i adekwatne do podjętego tematu pracy. Recenzowana rozprawa ma typowy układ prac eksperymentalnych, składa się 12 rozdziałów obejmujących: Wstęp, Założenia i Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim – Abstract, Piśmiennictwo, Spis tabel, Spis rycin oraz Aneks zawierający zestawione w tabelach wyniki

badan. Autor umieścił również na początku pracy wykaz użytych skrótów. Rozprawa doktorska liczy 152 strony.

We wstępie pracy zawierającym dwa podrozdziały Autor skupił się na przedstawieniu mechanizmów przemian prowadzących do przełamania bariery międzygatunkowej zwierzę-człowiek. Podstawą do analizy była rycina 1 przedstawiająca schemat drabiny ewolucyjnej prowadzącej do przekształcenia patogenów zwierzęcych w ludzkie, w nawiązaniu do przykładów nowych wirusów i bakterii zaliczanych do występujących w ostatnich latach nowych zakażeń oraz przykłady niepokojących zakażeń drobnoustrojami odzwierzęcymi, poparte danymi epidemiologicznymi w postaci 2 i 3 ryciny. Charakterystyka rodzaju *Streptococcus* obejmowała klasyfikacje i opis gatunków o największym znaczeniu chorobotwórczym dla zwierząt. Autor przedstawił również gatunek *S. pyogenes* zwracając uwagę na czynniki wirulencji i determinujące je geny. Zabrakło mi bardziej szczegółowego przedstawienia gatunku *S. dysgalactiae*, jego czynników wirulencji. Czy przytaczane przykłady zakażeń u ludzi wiązały się np. z kontaktem ze zwierzętami? Czy znana jest antybiotykooporność szczepów, które wywołały wymieniane przez Autora przypadki różnych zakażeń? Czy oprócz obniżonej odporności chorych - były inne okoliczności sprzyjające zakażeniom? Informacje te byłyby cenne w przedstawieniu gatunku we wstępie pracy, który jest przedmiotem badań.

W rozdziale Materiały i metody – Doktorant przedstawił informacje dotyczące pochodzenia szczepów. Grupa badanych szczepów *S. dysgalactiae* obejmowała 30 izolatów z zakażeń od ludzi oraz niestety tylko 6 pochodzących z zakażeń od zwierząt. Jest to bardzo mała grupa badawcza. W celu dokonania badań porównawczych Autor wykorzystał również grupę 30 szczepów *S. pyogenes* oraz szczepy *Staphylococcus epidermidis* i *Corynebacterium jeikeium* i *Corynebacterium tuberculostearicum* oraz szczepy wzorcowe użytych gatunków. Skład podłoży, odczynniki do badań i opis metod badawczych zostały przedstawione przez Autora przejrzysto uwzględniając metody zastosowane do badania cech fenotypowych i genetycznych zgromadzonych do analizy szczepów oraz sposób przeprowadzenia badań „*in silico*” z wykorzystaniem dostępnej analizy szczepu wzorcowego *S. dysgalactiae* susp. *equisimilis* ATCC 12394, którego genom został już wcześniej zsekwencjonowany i zdeponowany w bazie GenBank. Określenie lokalizacji genów kodujących czynniki wirulencji paciorkowców i ich położenie zostało wykonane z wykorzystaniem odpowiednich programów stosowanych do tego typu analiz komputerowych.

Wyniki badań zostały przedstawione przez Doktoranta w sposób jasny i przejrzysty z wykorzystaniem tabel i kolorowych rycin, zdjęć żeli elektroforetycznych reakcji PCR, histogramu, kladogramu, drzewa filogenetycznego. Identyfikacja badanych szczepów została przeprowadzona techniką MALDI-TOF opartą na analizie profili białkowych i pozwoliła na ich zaklasyfikowanie do podgatunku *S. dysgalactiae* susp. *equisimilis* (SDSE), pozostałe 30 szczepy użyte do badań porównawczych zidentyfikowano jako *S. pyogenes*. Identyfikacja *S. dysgalactiae* susp. *equisimilis* została potwierdzona genetycznie, na podstawie amplifikacji fragmentu kodującego 16S rRNA. Wyniki identyfikacji *S. dysgalactiae* nie wykazały pełnej zgodności z metodami stosowanymi w latach 90-tych opartych tylko na podstawie cech fenotypowych. Zróżnicowana zdolność do zasiedlania skóry ludzkiej przez badane szczepy SDSE wskazuje na niski potencjał kolonizacji organizmu człowieka. Ważnym etapem badań było oznaczenie przez Doktoranta lekowrażliwości izolowanych szczepów. Mam wątpliwości co do sposobu ich wykonania i interpretacji. Dlaczego Autor wykorzystuje rekomendacje dla paciorkowców KORLD z 2009 roku? Z dniem 1 kwietnia 2011 roku obowiązują w Polsce we wszystkich laboratoriach rekomendacje do interpretacji lekowrażliwości EUCAST. W podłożu do oznaczania lekowrażliwości zastosował Autor - krew baranią a nie rekomendowaną krew końską? Stwierdzenie oporności na penicylinę szczepów *S. pyogenes* budzi moje duże wątpliwości, podobnie jak oporność na wankomycynę. Tym bardziej, że Doktorant nie oznaczył wartości MIC dla tych antybiotyków, mimo bardzo ważnych wyników oporności (jakie były zakresy ich interpretacji?). Jakie zostały użyte zakresy do interpretacji lekooporności na ofloksacynę i cefotaksym? W związku z wykonaniem oznaczeń lekowrażliwości - mam również pytanie: jak przedstawia się na świecie i w Polsce oporność na penicylinę i wankomycynę szczepów *S. pyogenes*? Ostatecznie proponuję aby przed opublikowaniem wyników badań lekowrażliwości analizowanych szczepów zarówno *S. pyogenes* jak i *S. dysgalactiae* susp. *equisimilis* zostały one ponownie sprawdzone/ewent. wykonane oznaczenia i zinterpretowane ich wyniki na podstawie obowiązującej wersji rekomendacji EUCAST 2016. W dalszej części pracy Doktorant skupił się na cechach wirulencji badanych szczepów: wytwarzaniu biofilmu, hemolizy, kazeinazy, lecytynaza, streptokinazy, czynnika CAMP oraz obecności genów wirulencji. Za pomocą uniwersalnych starterów dla obu gatunków było wykrywanych 26 genów kodujących czynniki chorobotwórcze obejmujące adhezję do komórek, rozprzestrzenianie się w organizmie, rozkład czynników układu immunologicznego i toksyny. Uwagę zwróciła obecność w wysokim odsetku szczepów - genów *lmb*, *gapC*, *ska*,

*scpA*, *slo*, *smeZ*, *speGG* obecnych równocześnie w badanych gatunkach *S. dysgalactiae* susp. *equisimilis* i *S. pyogenes*. To niezwykle cenne wyniki badań potwierdzające możliwość ciężkiego przebiegu zakażenia u ludzi spowodowanego przez szczepy odzwierzęce. Wykonane badania zostały w dalszym etapie pracy rozszerzone o poszukiwanie genów kodujących czynniki wirulencji po przez analizę opartą o porównanie uzyskanych produktów reakcji PCR – w badaniach *in vitro* z wynikami otrzymanymi *in silico* przez analizę genomu szczepu wzorcowego *S. dysgalactiae* susp. *equisimilis* z zastosowanie nowoczesnej bioinformatycznej analizy podobieństwa. Określenie metodą Real-time PCR ekspresji genów wybranych czynników wirulencji było ważnym i ciekawym kolejnym elementem pracy. Wyniki wskazały, iż mimo wykrycia obecności analizowanych genów brak było ich ekspresji w szczepach odzwierzęcych, lub niektóre z nich jak np. gen kodujący białko M – nie występował w ogóle w tych izolatach. Obecność genów odpowiedzialnych za chorobotwórczość potwierdza filogenetyczne ich pokrewieństwo mimo różnic w działaniu na organizm ludzki i zwierzęcy. Autor ukazał to w opracowanym kladogramie (w oparciu o sekwencję genu *emm*) i skonstruowanym drzewie filogenetycznym oraz mapach genowych uzyskanych w wyniku analizy *in silico* umożliwiających porównanie lokalizacji genów wirulencji u *S. dysgalactiae* susp. *equisimilis* i *S. pyogenes*.

Dyskusja w rozprawie - zawiera analizę, interpretację i podsumowanie uzyskanych wyników na tle opublikowanych danych w piśmiennictwie. Jak stwierdził Doktorant, niestety niska liczebność grupy szczepów pochodzących od zwierząt nie dała podstaw do pewnych uogólnień, które byłyby wynikiem porównania szczepów wywodzących się od różnych gospodarzy. Sadzę, że na opracowanej bazie metodycznej i już częściowo (6 szczepów odzwierzęcych) uzyskanych wyników takie badania powinny być dalej kontynuowane na większej grupie badanej, co umożliwi potwierdzenie lub weryfikację wcześniejszych założeń rozprawy, szczególnie wobec dokładnie przeprowadzonej analizy *in silico* i opracowanych map genowych. Dyskusja wskazuje na właściwy dobór piśmiennictwa (271 pozycji), które zostało przytaczane przez Autora podczas interpretacji i analizy wyników badań. Przedstawienie tego problemu zakażeń i procesu ewaluacji szczepów *S. dysgalactiae* susp. *equisimilis*, które mogą nabywać geny wirulencji od klasycznych patogenów ludzkich, jakim jest *S. pyogenes* było możliwe dzięki zastosowaniu szerokiego zakresu metod badawczych.

Wnioski, w postaci 10 punktów objęły najistotniejsze informacje uzyskane na podstawie przeprowadzonych badań wskazując na konieczność weryfikacji kryteriów służących do identyfikacji *S. dysgalactiae* z uwzględnieniem cech fenotypowych i genotypowych. Zostały sformułowane właściwie wobec otrzymanych wyników badań. Uważam jednak, że punkt 8 wniosku powinien być zweryfikowany w kontekście moich wcześniejszych uwag, zawarte uogólnienia budzą moje duże wątpliwości.

Rozprawę doktorską mimo przedstawionych uwag i wątpliwości oceniam pozytywnie. Pragnę podkreślić bardzo duży wkład pracy wniesiony przez Doktoranta w wykonanie badań i ich opracowanie. Zastosowanie wielu różnych metod badawczych wskazuje na jego szerokie możliwości poznawcze i bardzo dobrą znajomość nowych aspektów i możliwości prowadzenia analiz komputerowych uzyskanych wyników badań genetycznych. Przedstawiony temat pracy, ze względu na swoją wagę, powinien być dalej kontynuowany również w kontekście innych gatunków paciorkowców chorobotwórczych dla zwierząt.

Rozprawa doktorska mgr farm. Marcina Ciszewskiego pt.: „Czynniki chorobotwórczości *Streptococcus dysgalactiae* – paciorkowców ropotwórczych izolowanych od ludzi i zwierząt” spełnia ustawowe wymagania stawiane tego typu rozprawom. W związku z powyższym zwracam się do Wysockiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr farm. Marcina Ciszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
  
Dr hab.n.med. Alina Małgorzata Olender