

**Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

**Pani mgr farm. Pauliny Glajzner**

**pt. "Adaptacja bakteryjnych patogenów zwierzęcych do nowego gospodarza –  
człowieka. Badania na modelu ziarenkowców Gram-dodatnich"**

Od wielu lat jednym z ważnych problemów w zakresie zdrowia publicznego jest zagrożenie jakie niesie dla ludzkości możliwość przenoszenia patogenów zwierzęcych na ludzi. Zjawisko przełamania barier międzygatunkowych dotyczy zarówno wirusów, u których zachodzi znacznie częściej i szybciej, jak i bakterii. Globalna pandemia, jakiej byliśmy świadkami w ostatnich latach, związana z przeniesieniem na ludzi typowo zwierzęcego wirusa SARS-CoV 2, i ogromne negatywne konsekwencje zdrowotne, społeczne i ekonomiczne jakie ona wywołała jeszcze bardziej podkreślają jak wciąż realne i groźne jest to zjawisko. Ponadto większość znanych obecnie drobnoustrojów wywołujących zakażenia u ludzi pochodzi pierwotnie od zwierząt. Każdego roku wykrywane są na świecie średnio cztery nowe gatunki drobnoustrojów potencjalnie zagrażające człowiekowi. Do przełamania barier międzygatunkowych dochodzi na styku różnych ekosystemów współbywania ludzi i zwierząt, zarówno w bliskim otoczeniu człowieka jak i na obszarze dzikiej przyrody. Rezerwuarem nowych patogenów człowieka są najczęściej ssaki, a wśród nich podkreśla się rolę ssaków kopytnych, gryzoni, nietoperzy oraz ssaków naczelnych. Główną przyczyną odpowiedzialną za zjawisko przełamania bariery międzygatunkowej jest m.in. zmienność drobnoustrojów, w tym ich czynników wirulencji, antygenowości, oraz specyficzności wobec gospodarza. Drobnoustroje, które mają zdolność zakażenia wielu różnych gospodarzy, mogą z większym prawdopodobieństwem wywołać infekcje u człowieka. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się drobnoustrojom, które stanowią mikrobiotę lub są patogenami zwierząt towarzyszącym ludziom, zwierzętom gospodarskim lub egzotycznym zwierzętom wykorzystywanym jako pożywienie człowieka.

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Glajzner wpisuje się w ten ważny i aktualny temat badawczy. Jako model badawczy Doktorantka wybrała szczepy bakterii pochodzące z dwóch, istotnych dla ludzi i zwierząt, rodzajów *Streptococcus* i *Staphylococcus*. Przedstawiciele różnych gatunków z tych obydwu rodzajów ziarenkowców Gram-dodatnich wchodzi w skład mikrobioty człowieka oraz zwierząt, ale także są groźnymi patogenami. Doktorantka analizowała u izolatów bakteryjnych pochodzących od ludzi jak i od zwierząt występowanie szerokiego panelu cech (fenotypowych jak i genotypowych) mających udział w procesie adhezji i kolonizacji gospodarza, ułatwiających inwazję gospodarza, oraz hamujących działanie układu immunologicznego gospodarza. Głównym celem rozprawy doktorskiej była ocena zdolności zaadaptowania wybranych gatunków z w/w rodzajów do gospodarza, jakim jest człowiek. Ponadto doktorantka poszukiwała cech, które mogły by stanowić marker pozwalający ocenić: (I) czy mamy do czynienia ze szczepem ludzkim czy zwierzęcym, oraz (II) czy wyizolowany szczep zwierzęcy jest zdolny do zakażenia człowieka.

Rozprawa doktorska przedstawiona jest w formie tradycyjnej – wszystkie materiały zebrano w pisemnym opracowaniu. O istotności uzyskanych w tej rozprawie wyników badań

świadczy fakt, iż część wyników zostało już opublikowanych w dwóch pracach oryginalnych o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 4,972 oraz 80 punktach MEiN:

- (1) Glajzner, P., Szewczyk, E. M., Szemraj, M. (2023). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in streptococci isolated from human and animal clinical specimens [Short Communication]. *Current Microbiology*, 80:228. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03337-6>. IF = 2,343 MEiN = 40
- (2) Glajzner, P., Szewczyk, E. M., Szemraj, M. (2023). Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from human and animals [Article]. *Folia Microbiologica*, 13. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-01007-x>. IF = 2,629 MEiN = 40

W obydwu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto problem związany z potencjałem patogennym zwierzęcych szczepów *Streptococcus* spp. do zakażenia człowieka oraz zagadnienie dotyczące lekooporności takich szczepów zostały przedstawione przez Panią mgr P. Glajzner w publikacji przeglądowej Glajzner, P., Szewczyk, E. M., Szemraj, M. (2021). Pathogenicity and drug resistance of animal streptococci responsible for human infections. *Journal of Medical Microbiology*, 70(3), 19, Article 001339. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001339> o IF = 3,196 i punktach MEiN = 70.

Rozprawa doktorska jest obszerna, liczy 188 stron druku oraz dodatkowe trzy strony oświadczeń, współautorów w/w trzech publikacji, określających wkład w ich powstanie. Układ rozprawy doktorskiej jest typowy. Napisana jest w przystępny sposób, a jej logiczny układ ułatwia czytelnikowi śledzenie realizacji celów postawionych w pracy oraz analizę uzyskanych wyników. Niezmiernie cenny jest rozdział 14. Aneks, zawierający zebrane w tabelach dokładne wyniki badań dla poszczególnych szczepów wykorzystanych w pracy, a także pomocny jest załączony na początku rozprawy Wykaz Skrótów stosowanych w pracy.

W 26-stronnicowym Wstępie do rozprawy Doktorantka rzeczowo przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą czterech zagadnień ściśle związanych z tematyką pracy: (I) analizuje temat nabywania zdolności zakażenia przez drobnoustroje gospodarza innego gatunku, w tym przedstawia przyczyny, przeszkody i etapy przełamania barier międzygatunkowych; (II) charakteryzuje gatunki o potencjale zoonotycznym z rodzajów *Streptococcus* - *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. parauberis* oraz *S. gallolyticus*, a także z rodzaju *Staphylococcus* - *S. pseudintermedius*; (III) przedstawia patogenezę zakażeń i czynniki chorobotwórczości znanych patogenów człowieka z rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus*; (IV) opisuje lekowrażliwość ziarenkowców z w/w rodzajów. Wstęp stanowi dobre teoretyczne wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej, i w pełni uzasadnia wybór tematyki badawczej pracy.

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej została wykonana prawidłowo. Eksperymenty zostały zaplanowane logicznie z jasno postawionym celem. Doktorantka prowadziła badania na szczepach wyizolowanych od ludzi (47 szczepów z rodzaju *Streptococcus* i 7 z rodzaju *Staphylococcus*) oraz od zwierząt (32 z rodzaju *Streptococcus* i 7 z rodzaju *Staphylococcus*). Należy podkreślić, iż 32 w/w odzwierzęce izolaty pochodziły z próbek mleka od krów z zapaleniem wymion, a izolacja bakterii została wykonana przez Panią mgr Paulinę Glajzner. Doktorantka przebadala 660 próbek mleka, z których wyizolowała 191 katalazo-ujemnych ziarenkowców Gram-dodatnich. Z wytypowanych do dalszych analiz 53 izolatów po wykonaniu identyfikacji testem API STREP, a następnie metodą genetyczną (wykonując reakcje PCR ze starterami dla określonych gatunków i sekwencjonując z amplifikowane produkty genów 16S rRNA charakterystyczne dla podgatunków) ostatecznie zidentyfikowała *S. uberis* (n=25), *S. parauberis* (n=2) i *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (n=5). Natomiast pozostałe szczepy, które użyła w pracy Doktorantka, zostały już wcześniej zdeponowane w kolekcjach Laboratoriów Mikrobiologicznych. Przed przystąpieniem do

zasadniczej części eksperymentalnej pracy, Doktorantka przeprowadziła reidentyfikację szczepów.

W rozdziałach nr 3. Materiały oraz nr 4. Metody, przedstawiono szczegółowo metodykę wykorzystaną przez Panią mgr P. Glajzner w rozprawie doktorskiej, w tym w 11 tabelach zawarto startery zastosowane do wykrywania genów: metabolizmu podstawowego w MLST, warunkujących kolonizację, kodujących czynniki inwazyjne, związanych z lekoopornością, a także przyczyniających się do tworzenia biofilmu przez badane szczepy.

W recenzowanej pracy doktorskiej zastosowano cały szereg metod zarówno:

(1) mikrobiologicznych (tj. izolacja bakterii z próbek mleka, identyfikacja gatunkowa bakterii przy użyciu testów API STREP, określenie szerokiego panelu cech biochemicznych badanych szczepów, zdolności szczepów do tworzenia biofilmu a także zdolności do wyrastania w surowicy ludzkiej oraz bydłowej, analiza aktywności bakteryjnej streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego oraz bydłowego, określenie profili lekooporności szczepów metodą krążkowo-dyfuzyjną),

(2) genetycznych (tj. poszukiwanie przy użyciu reakcji PCR i multipleks PCR szeregu genów wirulencji oraz genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki; badanie metodą real-time PCR poziomu ekspresji genów kodujących produkty mające wpływ na hamowanie aktywności układu immunologicznego gospodarza, genotypowanie izolatów metodą MLST).

Prawidłowo przeprowadzono część badawczą rozprawy doktorskiej. Stosowanie rozmaitych, poprawnie dobranych metod świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktorantkę.

Uzyskane w pracy wyniki Doktorantka przedstawiła w 12 tabelach w tekście głównym rozprawy doktorskiej, w 17 tabelach (niektórych wielostopniowych) w Aneksie do pracy, i na 17 rycinach. Wszystkie tabele i ryciny zawarte w pracy są czytelne oraz pomocne w interpretacji uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Cenny jest załączony na końcu pracy Wykaz Tabel i Rycin ułatwiający szybkie znalezienie i zapoznanie się z wybranymi fragmentami wyników.

Dokładna analiza uzyskanych wyników oraz ich skondensowana dyskusja na 21 stronach rozprawy doktorskiej, połączona ze wskazaniem uzyskanych przez innych badaczy rezultatów, została przeprowadzona w sposób poprawny, z analizą dostępnego piśmiennictwa przedmiotu. Zacytowane piśmiennictwo jest aktualne, obszerne, i przedstawione na 23 stronach.

W rozdziale Wnioski z Przeprowadzonych Badań, postawione przez Doktorantkę wnioski uważam za merytorycznie poprawne.

W rozprawie doktorskiej Pani mgr Paulina Glajzner w wyniku wykonanych eksperymentów i przeprowadzonej analizy uzyskała szereg interesujących wyników. Za najcenniejsze elementy rozprawy doktorskiej uważam:

1. Wykonanie szerokospektralnych badań zarówno fenotypowych jak i genetycznych w celu analizy występowania, u szczepów izolowanych od ludzi oraz od zwierząt, określonych cech predysponujących szczepy do adhezji, kolonizacji i inwazji gospodarza, cech świadczących o toksyczności bakterii oraz wykonanie analizy lekooporności badanych szczepów. Tak kompleksowe podejście do zagadnienia jest ogromnym atutem tej rozprawy i świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki oraz jej umiejętności w planowaniu poszczególnych eksperymentów oraz analizie sukcesywnie uzyskiwanych wyników. Tylko dysponując tak szerokim wachlarzem przeprowadzonych analiz jakie wykonała Doktorantka, można podjąć próbę oceny zdolności zaadaptowania określonych gatunków bakterii do człowieka jako gospodarza.

2. Wytypowanie przez Doktorantkę, po analizie własnych wyników eksperymentalnych oraz danych z piśmiennictwa, cech fenotypowych i genetycznych (jak obecność określonych genów) wskazujących na potencjalną zdolność szczepu do przełamania bariery między gospodarzem ludzkim i zwierzęcym. Wyniki dotyczące tych cech zostały zebrane w dwóch tabelach o numerach 19 i 20. Do cech tych zaliczamy: (I) obecność i ekspresję genu *ska* kodującego streptokinazę, a także test aktywacji przez streptokinazę plazminogenu ludzkiego i bydlęcego, (II) zdolność wzrostu szczepu w surowicy ludzkiej oraz bydlęcej, (III) obecność określonych genów odpowiedzialnych za kolonizację, inwazyjność i toksyczność szczepów, (IV) a w przypadku izolatów z próbek mleka zakażonych krów pomocna jest także ocena zdolności bakterii do rozkładu określonych cukrów. Na ich podstawie Doktorantka wysnuła właściwy wniosek, iż u paciorkowców na proces przełamania bariery zwierzę-człowiek mają wpływ przede wszystkim cechy szczepu pozwalające mu hamować działanie układu immunologicznego człowieka jako gospodarza.
3. Doktorantka wnioskuje, iż wskazówką do oceny zdolności adaptacji paciorkowców do organizmu człowieka może być proporcja wartości ilościowego oznaczenia aktywności streptokinazy względem plazminogenu ludzkiego i zwierzęcego. Wykonywane bowiem dotychczas metody jakościowe, a także wykrywanie genu *ska* (kodującego streptokinazę) bez badania jego ekspresji, nie są w pełni wiarygodne.
4. Doktorantka jednocześnie podkreśla złożoność całego procesu przełamania bariery międzygatunkowej, dużą zmienność w obrębie analizowanych przez nią cech chorobotwórczości wśród szczepów zarówno z rodzaju *Streptococcus* jak i *Staphylococcus*, i wskazuje na konieczność prowadzenia dalszych pogłębionych badań nad wytypowaniem markerów pozwalających ocenić zdolność szczepu do zakażenia człowieka.
5. Niezmiernie ważnym aspektem pracy jest badanie lekowrażliwości i występowania genów związanych z opornością u szczepów wyizolowanych od zwierząt. Doktorantka wykazała u szczepów zwierzęcych z rodzaju *Streptococcus* oporność na tetracyklinę (u 11/32), klindamycynę (u 4/32), erytromycynę (u 3/32) i mechanizm oporności cMLS<sub>B</sub> (u 2/32). Wszystkie szczepy odzwierzęce niezależnie od wrażliwości na tetracyklinę posiadały gen *tetM*. W przypadku szczepów *S. pseudintermedius* Doktorantka wykazała: (I) u 2/7 wyizolowanych od zwierząt obecność genu *mecA* oraz u wszystkich pochodzących od zwierząt i u 4/7 od ludzi obecność genu *blaZ*; (II) u szczepów pochodzących od zwierząt, w odróżnieniu od tych wyizolowanych od ludzi, wykazała oporność na erytromycynę, klindamycynę, tetracyklinę i fluorochinolony, oraz u 6/7 szczepów mechanizm oporności cMLS<sub>B</sub>. Występowanie takich lekoopornych szczepów u zwierząt stanowi poważne zagrożenie dla człowieka.

Bardzo proszę Doktorantkę aby wyjaśniła nasuwające się wątpliwości i odpowiedziała na następujące pytania:

1. W pracy brakuje schematu izolacji bakterii *Streptococcus* spp. z mleka krowiego. Bardzo proszę Doktorantkę o pokazanie na slajdzie tego schematu.
2. Proszę o podanie jakie geny są wykrywane przy użyciu starterów z Tabeli nr 1, oraz dlaczego nie zastosowano starterów do potwierdzenia gatunków *S. agalactiae* (2 izolaty) i *S. porcinus* (2 izolaty) zidentyfikowanych metodami fenotypowymi? I dlaczego nie użyto jako kontroli szczepów *S. agalactiae* oraz *S. porcinus*? Ponadto do jakich podgatunków należą użyte szczepy kontrolne *S. gallolyticus* ZMF SV107 i ZMF SV901?
3. Pisząc o właściwościach lipolitycznych Doktorantka zamiennie stosuje określenia fosfolipazy i lecytynazy – np. str. 46 – proszę to wyjaśnić.

4. Dotyczy rozdziału 4.1.4.3. Bardzo proszę o podanie przez Doktorantkę brakujących w pracy informacji, które z genów były poszukiwane klasyczną metodą PCR z pojedynczą parą starterów oraz jaki był skład starterów w multipleks PCR.
5. W przypadku określania ekspresji genów u badanych szczepów do jakiego szczepu odnośnikowego była ona odnoszona i dlaczego?
6. Dotyczy rozdziału Podsumowanie Wyników:
  - punkt nr 2. Cytat „Nieobecny był u nich natomiast gen *hylB* kodujący liazę hialuronianową”. Jakie szczepy miała Doktorantka na myśli?
  - punkt nr 3. Cytat „Odpowiedzialne za kolonizację badanych paciorkowców geny związane ze zdolnością do adhezji wystąpiły najliczniej wśród szczepów *S. dysgalactiae*, przy czym między dwoma podgatunkami zaobserwowano różnice pozwalające na uznanie niektórych z nich za szczególnie korzystne dla szczepów lepiej przystosowanych do zakażenia ludzi. Były to geny *lmb*, *prtF1* i *isp1*”. Natomiast z tabel w Aneksie wynika że: (I) gen *lmb* był u 34/36 szczepów SDSE od ludzi i u 5/5 SDS od zwierząt, a gen *prtF1* był u 18/36 szczepów SDSE od ludzi i u 2/5 SDS od zwierząt; (II) gen *isp1* był zaliczany w Materiałach, Wynikach, Aneksie do puli genów kodujących czynniki warunkujące inwazyjność. Bardzo proszę Doktorantkę o komentarz.
  - punkt nr 5. dotyczący szczepów *S. gallolyticus*. Cytat „*S. gallolyticus* .....miał występujące powszechnie w szczepach SDSE geny *isp1* i *dppA*”. Według tabeli A8D (dla szczepów *S. gallolyticus*) i tabeli A8B1 (dla szczepów SDSE) gen *dppA* był obecny tylko u 2/11 *S. gallolyticus*. Bardzo proszę Doktorantkę o komentarz.
7. Dotyczy poszukiwania genów lekooporności. Dlaczego w pracy Doktorantka twierdzi, że sama obecność u paciorkowców genów *parC* i *gyrA* świadczy o obecności mechanizmu oporności na fluorochinolony? Proszę także o wyjaśnienie na czym polega mechanizm oporności paciorkowców na  $\beta$ -laktamy i czy uzasadnione jest zdanie z pracy doktorskiej str. 83 „U żadnego ze szczepów nie wykryto genu *pbp2b*, kodującego oporność receptorową na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe”. Proszę także o wyjaśnienie dlaczego w pracy poszukiwano genów *aad-6* i *aphA*, jeżeli aminoglikozydy nie są zalecane przy leczeniu zakażeń wywołanych przez paciorkowce.
8. Dotyczy wrażliwości *S. pseudintermedius*. Bardzo proszę aby Doktorantka wyjaśniła jaki jest związek i co wynika z wykrycia u badanych szczepów gronkowcowych genów *blaZ*, *mecA* i ich wrażliwości lub oporności na oksacylinę 1  $\mu$ g w krążku. Proszę o wyjaśnienie zaprezentowanej oporności, oddzielnie na penicyliny i na  $\beta$ -laktamy, na rycinie 19 (w tym metodykę badania i jakie penicyliny oraz  $\beta$ -laktamy Doktorantka miała na myśli).
9. Proszę na prezentacji o przedstawienie które z typów ST oraz numerów loci u badanych *S. pseudintermedius* są nowo odkryte przez Doktorantkę – brak tego w tabeli 22.
10. W niniejszej pracy Doktorantka bardzo dokładnie przeanalizowała wyniki dotyczące szczepów *Streptococcus* spp. i wyciągnęła szereg interesujących wniosków. Jednakże zabrakło według mojej opinii wniosków dotyczących szczepów *S. pseudintermedius*. Bardzo proszę o komentarz czy pomimo analizy małej puli szczepów (7 pochodzących od zwierząt i 7 od ludzi) Doktorantka może stwierdzić które cechy *S. pseudintermedius* predysponują szczepy zwierzęce do przełamania bariery międzygatunkowej?

Ponadto rozprawa doktorska zawiera:

- liczne drobne uchybienia np. ekspresja białka a powinna być ekspresja genu, rozdział 4.1.2.1.1. dotyczy izolacji bakterii a nie ich identyfikacji; podłoże agarowe z dodatkiem BHI a powinno być podłoże agarowe BHI; punkt 4.1.3.5.1. Izolacja streptokinazy – nie opisuje

procesu otrzymania czystego białka; niezgodna z Farmakopeą pisownia ryfampicyny i gentamycyny;

- nieprawidłowości stylistyczne zdań oraz niepoprawne sformułowania

- skróty myślowe np. podłoże krwawe, w 4.1.3.5.3. z odpowiednim plazminogenem – a powinien być dokładny opis postępowania.

Jednakże przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają zasadniczej zawartości merytorycznej pracy, którą oceniam wysoko.

#### **Wniosek:**

W oparciu o powyższą recenzję, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Glajzner spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora zgodnie z art.187 ust. 1 i 2 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 r. wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Glajzner do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Warszawa, dnia 14.09.2023 r.

Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej  
i Bioanalizy

*A. Laudy*  
dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy