Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej

ul. Mickiewicza 2C, 15-089 Białystok, Poland

tel. +48 85 748 54 15, fax +48 85 748 54 16

Białystok, 12-09-2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Joanny Białeckiej pt. „Charakterystyka fenotypowa i genotypowa szczepów klinicznych *Neisseria gonorrhoeae* z uwzględnieniem wybranych cech wirulencji." wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Barbary Zawilińskiej w Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek imienia dr Jana Bobra i Zakładzie Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedry Mikrobiologii, Wydziału Lekarskiego UJ CM w Krakowie. Praca dotyczy problemu zakażeń przenoszonych drogą płciową wywołanych przez *Neisseria gonorrhoeae*. Bakterie te są przyczyną między innymi chorób zapalnych narządów miednicy mniejszej u kobiet, które mogą prowadzić do poważnych powikłań związanych z reprodukcją, w tym niepłodności i ciąży pozamacicznej. Zapobieganie następstwom i przenoszeniu tych zakażeń zależy w dużej mierze od szybkiego wykrycia i skutecznego leczenia przeciwdrobnoustrojowego. Jednakże, leczenie utrudnia brak rutynowych badań wrażliwości drobnoustrojów w opiece klinicznej oraz obserwowany w ostatniej dekadzie rozwój oporności drobnoustrojów na antybiotyki stosowane w ich leczeniu.

Rozprawa doktorska liczy 191 stron i obejmuje: wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki i ich omówienie, dyskusję, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim), wykaz cytowanego piśmiennictwa i aneks, w którym Doktorantka przedstawiła między innymi wyniki oznaczeń wartości MIC 116 szczepów *Neisseria gonorrhoeae* oraz 3 szczepów wzorcowych wg zaleceń EUCAST z uwzględnieniem pochodzenia izolatów od kobiet i mężczyzn, oraz profili ich oporności.

W rozdziale „Wstęp", Doktorantka przedstawiła charakterystykę ogólną, chorobotwórczość, diagnostykę, problemy i mechanizmy lekooporności *Neisseria gonorrhoeae,* a także leczenie zakażenia rzeżączkowego. Na uwagę i wysoką ocenę zasługuje przedstawiony we wstępie opis możliwości porównywania szczepów *Neisseria gonorrhoeae* z wykorzystaniem technik biologii molekularnej i opis czynników wpływających na patogenezę tych zakażeń.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie Doktorantka sformułowała główny cel rozprawy, którym była analiza fenotypowa i genotypowa szczepów *Neisseria gonorrhoeae* izolowanych

z materiałów klinicznych, pobranych w latach 2014-2021 od pacjentów z niepowikłanymi zakażeniami rzeżączkowymi z regionu Małopolski.

Do realizacji celu głównego posłużyły cele szczegółowe, które Doktorantka przedstawiła w formie 10 pytań: 1) Jaki jest obraz lekowrażliwości szczepów i czy zmienia się on na przestrzeni czasu, w którym była prowadzona obserwacja?; 2) Jakie klony *N. gonorrhoeae* są charakterystyczne dla naszego regionu?; 3) Czy zróżnicowanie lekowrażliwości szczepów izolowanych w naszym regionie koreluje z typem sekwencyjnym?; 4) Jaki jest udział oporności o charakterze plazmidowym?; 5) Czy istnieje zróżnicowanie szczepów izolowanych od kobiet i mężczyzn?; 6) Czy badane szczepy kliniczne gonokoków mogą mieć różną zdolność do tworzenia biofilmu?; 7) Czy na przykładzie modelu *in vitro* można określić i różnicować szczepy kliniczne *N. gonorrhoeae* pod względem ich zdolności do adherencji do komórek nabłonkowych szyjki macicy?; 8) Jaki wpływ na adherencję szczepów klinicznych *N. gonorrhoeae* do komórek nabłonkowych dróg rodnych ma obecność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Gardnerella*, które często kolonizują te drogi?; 9) Czy obecność progesteronu może wpływać na zdolności adherencyjne szczepów klinicznych gonokoków do komórek nabłonkowych szyjki macicy?; 10) W jakim stopniu badane szczepy kliniczne *N. gonorrhoeae* indukują zdolność do generowania reaktywnych form tlenu przez komórki fagocytujące?

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka objęła analizą 116 izolatów klinicznych i 3 szczepy wzorcowe. Sposób zaplanowania doświadczeń oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki i ogromnym doświadczeniu praktycznym.

Uwagę zwraca bardzo dokładny opis uzyskanych wyników i bardzo dojrzale przeprowadzona ich analiza i dyskusja. Doktorantka właściwie odniosła własne wyniki do danych z szerokiego piśmiennictwa, a sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza bardzo szeroką wiedzę w zakresie tematyki prowadzonych badań. Ze względu na ogromną potrzebę monitorowania narastającej oporności klinicznych szczepów *N. gonorrhoeae* celem optymalizacji terapii powodowanych przez bakterie, interesującym elementem przedstawionych danych jest wykazanie zmian w profilu oporności badanych szczepów w poszczególnych przedziałach czasowych. Intersujących informacji dostarcza także przeprowadzona analiza lekowrażliwości szczepów *N. gonorrhoeae* izolowanych od kobiet i mężczyzn (Ryc.17) i wykazanie hamującego wpływu baterii *Lactobacillus crispatus* i *Lactobacillus jensenii* na zdolność adherencji *N. gonorrhoeae* do powierzchni błon śluzowych. Z racji rosnącej ilości danych 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 molekularnego mechanizmu, warunkującego zdolność kolonizacji błony śluzowej przez zidentyfikowane szczepy. W tym miejscu należy podkreślić, że pomimo dużej ilości analizowanych

parametrów, prezentacja ich w postaci starannie przygotowanych tabel i rycin znacznie ułatwia ocenę pracy.

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

1. Otrzymany obraz lekowrażliwości badanych 116 szczepów klinicznych *N. gonorrhoeae* potwierdza, iż empiryczne leczenie rzeżączki ceftriaksonem lub cefiksymem oraz azytromycyną jest obecnie zasadne, natomiast stosowanie antybiotyków z innych grup musi być poprzedzone oznaczeniem lekowrażliwości izolatu bakteryjnego.

2. Niespełna 9% badanych szczepów *N. gonorrhoeae* wykazywało pełną wrażliwość na wszystkie grupy leków stosowanych od lat 40-tych ubiegłego wieku w leczeniu rzeżączki. Wysoki odsetek szczepów (41,4%) wykazywał oporność i/lub obniżoną wrażliwość na 3 lub 4 grupy antybiotyków, w tym 2 szczepy prezentowały fenotyp MDR.

3. U 23,2% szczepów metodami fenotypowymi i genotypowymi potwierdzono oporność kodowaną plazmidowo na penicylinę i tetracyklinę. Wśród nich dominowały szczepy z determinantą tetM warunkującą wysoki poziom oporności na tetracyklinę.

4. Stwierdzono znaczący udział mutacji w chromosomalnych genach penB, mtrR i ponA oraz wpływ oporności chromosomalnej na profile oporności badanych szczepów.

5. Wśród 116 szczepów *N. gonorrhoeae* za pomocą metody NG-MAST wyodrębniono 61 typów sekwencyjnych, w tym 14 nowych typów ST.

6. Dominujące typy klonalne wśród szczepów izolowanych z regionu Małopolski w latach 2014-2021 to: ST 6765, który pojawił się w latach 2020-2021, typ ST 11461, który dominował w latach 2018-2019 oraz ST1407 przeważający w latach 2014-2017.

7. W okresie prowadzonej obserwacji stwierdzono spadek częstości występowania ważnego epidemiologicznie klonu ST1407, co rzutowało na obserwowany sukcesywny spadek poziomu oporności badanych szczepów.

8. Szczepy izolowane od kobiet i mężczyzn różniły się poziomem i obrazem oporności na tetracyklinę, częstością występowania mutacji genu mtrR, częstością współwystępowania oporności i/lub obniżonej wrażliwości na antybiotyki oraz zdolnością do produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) po stymulacji zabitymi gonokokami komórek granulocytopodobnych wyprowadzonych z linii HL-60.

9. Analizowane szczepy kliniczne w zdecydowanej większości (90,5%) wykazywały zdolność do tworzenia biofilmu na powierzchni abiotycznej, ale cecha ta była zróżnicowana w zależności od szczepu. Najliczniejszą (66,4%) grupę reprezentowały szczepy średnio biofilmujące.

10. Prekolonizacja komórek SiHa ze szczepami *L. crispatus* i *L. jensenii*, poprzedzająca zakażenie szczepami klinicznymi *N. gonorrhoeae* hamowała adherencję gonokoków do komórek nabłonkowych. Nie stwierdzono, aby preinkubacja ze szczepem *Gardnerella vaginalis* lub progesteronem wpływała znacząco na adherencję gonokoków do komórek SiHa.

Z obowiązku recenzenta pragnę zaznaczyć, że nieliczne błędy redakcyjne, jak również nieścisłości w opisie metodyki czy używanej terminologii omówiono z Doktorantką bezpośrednio.

Stwierdzam, że praca autorstwa Pani mgr Joanny Białeckiej 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 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84 poz. 455)*. Tym samym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych UJ CM o dopuszczenie mgr Joanny Białeckiej 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.

prof. dr hab. med. Robert Bucki

Signed by /
Podpisano przez:

Robert Antoni
Bucki

Date / Data:
2023-09-12 16:29