



## ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 62 90  
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa  
Zakład Biologii Patogenów i Immunologii  
Uniwersytet Wrocławski  
ul. Przybyszewskiego 63-77  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 37 56 290  
fax. +48 71 325 21 51

Wrocław, 2022-03-01

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Podgórskiej

***“Analiza genów kodujących 16S rRNA z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji w celu identyfikacji bakteryjnych czynników etiologicznych infekcyjnego zapalenia wsierdza”***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Karoliny Jaworskiej, została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Anny Lutyńskiej w Zakładzie Biologii Medycznej Narodowego Instytutu Kardiologii im. Stefana kardynała Wyszyńskiego Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie. Praca z zakresu metagenomiki, mikrobiologii infekcyjnej poświęcona jest opracowaniu, walidacji metodologii i ocenie przydatności Next Generation Sequencing (NGS) genu 16S rRNA do wykrywania czynników etiologicznych infekcyjnego zapalenia wsierdza (IZW) w odniesieniu do konwencjonalnych metod hodowlanych.

Badania wykonane w pracy doktorskiej sfinansowano w ramach budżetu na realizację projektu statutowego nr. 2.29/V/17 pt. „Zastosowanie metagenomiki do identyfikacji bakteryjnych czynników etiologicznych infekcyjnego zapalenia wsierdza” zrealizowanego w Narodowym Instytucie Kardiologii, im. Stefana kardynała Wyszyńskiego, Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie

IZW obejmuje wsierdzie ścienne wyścielające ściany przedsionków i komór lub wsierdzie zastawkowe wyścielające powierzchnię zastawek. Zapalenie najczęściej rozwija się w części zastawkowej i stanowi poważną przyczynę zakażeń kardiologicznych powiązanych ze słabym rokowaniem oraz wysoką umieralnością. Obecnie w klinicznym rozpoznawaniu IZW wykorzystuje się kryteria opracowane przez Uniwersytet Duke’a obejmujące dodatnie posiewy krwi, zajęcie wsierdza w badaniu obrazowym (echokardiografia lub rezonans magnetyczny) oraz podwyższone parametry wykładników stanu zapalnego w badaniu krwi.



## ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 62 90  
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

**Celem pracy doktorskiej** Pani mgr Anny Podgórskiej został sformułowany jako opracowanie procedury i walidacji metody NGS fragmentów genu kodującego 16S rRNA do potencjalnego wdrożenia w diagnostyce zakażeń IZW. Próbkę badaną stanowiły zarówno fragmenty zastawek lub krew pacjentów z rozpoznanym klinicznie IZW poddanych zabiegom chirurgicznym oraz z wykluczonym IZW operowanych z powodu innych zaburzeń serca.

Omawiając **wstęp** pracy, stwierdzam, że bardzo szczegółowo i dogłębnie została przygotowana część opisująca charakterystykę IZW, w tym przyczyny, czynniki predysponujące, powikłania, diagnostyka oraz leczenie i zapobieganie. Druga część poświęcona jest metagenomice jako nowej strategii identyfikacji mikroorganizmów. Podane są 3 pozycje literaturowe dotyczące zastosowania metod molekularnych, w tym PCR w diagnostyce IZW. Mam zatem pytanie, czy dotychczas w literaturze nie odnotowano zastosowania metodologii NGS w badaniach IZW? Analizując aktualny stan wiedzy, dobrze byłoby podkreślić na czym polega element nowości w opracowanej przez Doktorantkę procedurze i walidacji analiz NGS.

**Rozdział materiały i metody** zawarty na ponad 60 stronach, 14 rycinach i 31 tabelach, obejmuje opis głównych metod stosowanych w badaniach czyli: chirurgiczne pobieranie materiału z zastawek, analizy krwi pacjentów, posiewy oraz badania z użyciem biologii molekularnej. W tej części pracy powinna znaleźć się informacja szczegółowa, które etapy i elementy były wykonane przez samą Doktorantkę, a które przez inne jednostki przy współpracy. Wydaje się też, że zbędne jest przepisywanie procedur z protokołów komercyjnie dostępnych zestawów Nextera, czy MiSeq (Illumina), natomiast elementy i etapy poddawane opracowaniu/dostosowaniu przez Doktorantkę powinny być zaznaczone w sposób łatwy do odnalezienia. Uwagi edytorskie: Czy w Tabeli 4 podane są faktycznie rozcieńczenia poszczególnych szczepów użytych do zakażenia krwi pobranej od ochotników? Czy może jest to finalna gęstość hodowli wyrażona w jednostkach CFU/ml?

Rozdział **wyniki** opisany został na 61 stronach w sześciu głównych podrozdziałach:

1. Wyniki badań mikrobiologicznych krwi oraz zastawek lub ich fragmentów w grupie pacjentów ze zdefiniowanym IZW
2. Optymalizacja zastosowanych w pracy metod molekularnych



3. Wyniki badań metagenomicznych w grupie pacjentów ze zdefiniowanym oraz wykluczonym IZW
4. Wyniki identyfikacji czynników etiologicznych IZW uzyskane z krwi metodami mikrobiologii klasycznej w porównaniu z wynikami uzyskanymi z zastawek lub ich fragmentów metodami molekularnymi
5. Wyniki badań mikrobiologicznych i metagenomicznych pacjentów ze zdefiniowanym IZW uzyskane w NIK-PIB w odniesieniu do wyników badań mikrobiologicznych krwi uzyskanych w innych placówkach medycznych przed przyjęciem do NIK-PIB
6. Rodzaj zastawki a wyniki identyfikacji patogenu w grupie pacjentów ze zdefiniowanym IZW

Każdy z etapów jest wyczerpująco opisany z zestawionymi danymi w tabelach oraz rycinach, chociaż niepotrzebnie dublowano niektóre informacje, jak procentowy udział wyników pozytywnych versus negatywnych (zawsze suma to 100%). Ponieważ analizowanych zależności było kilka, przydałoby się krótkie wyjaśnienie, dlaczego dokonujemy konkretnych porównań w następujących po sobie krokach badawczych i jakie jest podsumowanie każdej z tych analiz, pomimo że część wyjaśnień znajduje się w dyskusji.

Uwagi szczegółowe:

- „Tabela 78. Wyniki badań metagenomicznych wykonanych NGS i potwierdzonych sekwencjonowaniem metodą Sanger.” – Jaki był cel tego badania? Porównanie metody Illumina z Sanger?
- Jaki był cel analiz 4.5? Czy przypuszczamy zakażenia szpitalne/ kolonizacje? Jakie wnioski epidemiologiczne wynikają z tego badania?
- „Tab. 88. Wyniki posiewów krwi wśród pacjentów ze zdefiniowanym IZW uzyskane w innych jednostkach medycznych w porównaniu do wyników badań metagenomicznych uzyskanych w NIK-PIB.” Czy badania krwi i DNA były robione jednocześnie? Jeśli nie, to dlaczego dokonujemy tego porównania?
- „4.6.2. Rodzaj zastawki a wyniki metod biologii molekularnej” Jakie wnioski wpływają z tych analiz w aspekcie mikrobiologicznym? Czy są różnice w specyfice kolonizacji zastawek sztucznych w porównaniu do natywnych?

W rozdziale **wnioski** umieszczono cztery najważniejsze elementy osiągnięcia naukowego Pani mgr Anny Podgórskiej.



## ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 62 90  
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

1. Wyniki uzyskane z zastosowaniem analizy metagenomicznej z wykorzystaniem NGS oraz metody sekwencjonowania Sangera regionów zmiennych V3 i V4 genu kodującego 16S rRNA umożliwiły identyfikację bakteryjnych czynników etiologicznych IZW z dużo wyższą czułością niż klasyczne metody mikrobiologiczne. Przeprowadzone badania umożliwiły identyfikację aż 60% czynników etiologicznych IZW podczas gdy klasycznymi metodami mikrobiologii wykrywalność patogenów w posiewach krwi sięgała 25%.
2. Badania eksperymentalne w celu oceny przydatności materiału jakim jest krew do badań metagenomicznych bakterii nie wykazały zakładanej swoistości badań oraz wymagają zastosowania zaawansowanych metod walidacji w celu wykluczenia wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich.
3. Zastosowana w pracy analiza metagenomiczna pozwoliła między innymi na wykrycie czynników etiologicznych IZW, które nie zostały zidentyfikowane metodami klasycznej mikrobiologii, w tym tych które dotychczas nie zostały powiązane w sposób systematyczny z IZW. W pracy po raz pierwszy opisano przypadki zakażeń *B. quintana* we fragmentach zastawek u pacjentów ze zdefiniowanym IZW.
4. Wykrycie bakterii zasiedlających fragmenty zastawek u osób chorych ze zdefiniowanym IZW pozwoliło na poprawę rokowania ze względu na precyzyjną identyfikację czynnika etiologicznego w wyniku analiz metagenomicznych oraz włączenie celowanego leczenia.

**Dyskusja** została przygotowana bardzo starannie z omówieniem najważniejszych aspektów poruszanych w pracy. Ważnym wnioskiem wpływającym z całej pracy są omówione zalety i ograniczenia diagnostycznie metod klasycznej hodowli w porównaniu do metod molekularnych. Ciekawym wynikiem było stwierdzenie, że ze względu na brak zakładanej czułości oraz obecność inhibitorów reakcji PCR, finalnie nie udało się wykonać badań metagenomicznych z krwi. Jako materiał wyjściowy do badań metagenomicznych wykorzystano bakteryjne DNA wyizolowane z zastawek lub ich fragmentów, gdzie nie wykazano reakcji hamowania PCR. Reasumując możemy stwierdzić, że patrząc na podstawowe kryteria opracowane przez Uniwersytet Duke'a obejmujące posiewy krwi i badania obrazowe, nie do końca jesteśmy w stanie zastąpić metody klasyczne badaniami metagenomicznymi z materiału najłatwiej dostępnego jakim jest krew. Jakie zatem propozycje nowelizacji diagnostyki IZW są proponowane przez Aplikantkę?



## ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 62 90  
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Co do formalnej strony dysertacji, Pani mgr Anna Podgórska zastosowała układ oraz sposób prezentacji typowy i powszechnie przyjęty dla prac doświadczalnych w naukach biologicznych. Dysertacja zawiera ogółem 221 stron, spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp, cel i założenia pracy, wyniki, wnioski, dyskusję, spis 51 rycin, spis 89 tabel oraz 232 pozycji bibliograficznych, głównie anglojęzycznych. Praca jest prawidłowo zorganizowana w rozdziały i podrozdziały adekwatnie do prezentowanych treści. Tekst pracy jest napisany starannie, językiem poprawnym, przejrzystym i zrozumiałym.

Mam natomiast uwagi co do formy przedstawienia metod i wyników, gdzie zabrakło opisowej części doświadczeń pozwalających czytelnikowi na zrozumienie ciągłości i celowości wydarzeń, oraz sensowności porównań konkretnych wyników i wniosków płynących z poszczególnych analiz.

I tutaj proszę do doktorantki o zwięzłe przedstawienie schematu działań z uzasadnieniem jakie pytania i cele były stawiane na każdym etapie projektu. Trudno też zorientować się, które badania były wykonywane przez samą doktorantkę, a które przy współpracy z innymi jednostkami (pobieranie wycinków, krwi, badania laboratoryjne krwi, posiewy materiału, diagnostyka molekularna). Ponieważ całość pracy jest bardzo obszerna i szczegółowa, w tym materiały i metody oraz wyniki, nie mogłam się dopatrzyć konkretnych punktów opracowania i walidacji metodologii osobiście opracowanych przez Panią Magister w porównaniu do standardowej obróbki materiału i zalecanych procedur wykonywania analiz NGS podawanych w protokołach producentów. Dobrze byłoby w części na przykład wnioski lub wyniki podać końcowo dopracowaną metodologię poddaną walidacji, w celu potencjalnego jej wdrożenia do diagnostyki IZW.

**Ocena pozostałego dorobku Kandydatki*****Osiągnięcia naukowe***

Pani mgr Anny Podgórskiej jest zatrudniona od 2017 na stanowisku specjalisty badawczo technicznym w Pracowni Biologii Molekularnej w Narodowym Instytucie Kardiologii w Warszawie. Była kierownikiem dwóch prac statutowych i współwykonawcą dwóch grantów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Od marca 2020 roku brała udział w opracowaniu i walidacji metodyki wykrywania wirusa SARS Co-V 2, oraz w uruchomieniu „laboratorium covidowego” w Pracowni Biologii Molekularnej w Narodowym Instytucie Kardiologii. Kandydatka jest współautorką 35 doniesień naukowych na konferencjach i zjazdach krajowych i międzynarodowych. W latach 2011-2022 w ramach prac zespołowych

**ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 62 90  
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

ukazało się 10 publikacji w czasopismach o zasięgu zarówno krajowym jak i anglojęzycznych czasopismach z listy JCR (International Journal of Molecular Sciences, Journal of Translational Medicine, Journal of Sexual Medicine, Neuropsychobiology, Journal of Addiction Medicine) w których Pani Podgórska jest współautorem.

Pani Anna chętnie poznaje nowe techniki badawcze z zakresu nowej generacji sekwencjonowania w trakcie szkoleń w jednostkach zagranicznych (16 S/ITS Metabarcoding of microbial communities, Physalia, Berlin; International Society of Cardiovascular Infectious Diseases ISCVID, Lozanna; Next-Generation Sequencing Workshop, Applied Maths, Gandawa).

***Aktywność dydaktyczno-popularyzatorska***

Ze względu na charakter zatrudnienia w jednostce naukowej jako specjalista badawczo techniczny, Pani mgr Anna Podgórska nie ma dorobku dydaktyczno-popularyzatorskiego.

***Podsumowanie rozprawy doktorskiej***

Podsumowując przedstawiłam mi do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Anny Podgórskiej, przyznając, że Doktorantka wykonała ciekawą pracę badawczą, chociaż wyniki otrzymane w trakcie realizacji nie zostały dotąd opublikowane. Rozprawa została napisana przejrzyście pod względem językowym. Zauważone błędy i moja krytyka strony edytorskiej (być może polemiczna) nie umniejszają wartości naukowej rozprawy. Pani mgr Anny Podgórska wykazała się dużymi umiejętnościami stosowania metod i technik badawczych w zakresie współczesnej metagenomiki. Poza tym, pozostała aktywność naukowa Kandydatki, w tym udział w projektach badawczych, publikacjach oraz konferencjach naukowych, świadczy o jej dojrzałości jako specjalisty z zakresu technik genomowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, spełnia wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedkładam na ręce Pana prof. dr hab. Jarosława Pinkasa, Przewodniczącego Wysokiej Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i



## WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

### ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 62 90  
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Epidemiologii, wniosek o dopuszczenie mgr Anny Podgórskiej do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższymi nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668 późn. zm.).

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa