

**Ocena rozprawy doktorskiej por. mgr Moniki Konior
z tytułem „Analiza nosicielstwa *Neisseria meningitidis*
z identyfikacją sero- i genotypów oraz określeniem kompleksów klonalnych
w środowisku wojskowym w Polsce”.**

Inwazyjna choroba meningokokowa (ICHM) jest chorobą zagrażającą życiu, której roczna częstość występowania wynosi od 1/1000 do 1/100 000 mieszkańców w różnych częściach świata. *Neisseria meningitidis*, czynnik etiologiczny tej choroby, rozprzestrzenia się m. in. drogą kropelkową i może wywoływać okresowe wybuchy epidemiczne lub epidemie ICHM o wysokim wskaźniku śmiertelności. Badania przeprowadzone w Europie wykazały, że nosicielstwo meningokoków jest uzależnione od wieku, a najwyższa częstość występowania notowana jest u nastolatków i młodych dorosłych. Czynniki predysponującymi do zakażenia meningokokami jest aktywne lub bierne palenie, współistniejące wirusowe i/lub bakteryjne zakażenia układu oddechowego, niski status społeczno-ekonomiczny oraz trudne warunki życiowe. W populacjach zamkniętych i pół-zamkniętych, takich jak bazy wojskowe i domy akademickie młodzi ludzie w wieku 18-23 lata są szczególnie narażeni na ryzyko zakażenia i rozwoju ICHM. Należy jednakże zauważyć, że *N. meningitidis* stanowi też istotny składnik mikrobiomu jamy nosowo-gardłowej zdrowych ludzi. Do dzisiaj nie został wyjaśniony związek pomiędzy nosicielstwem a rozwojem ICHM. W celu monitorowania sytuacji epidemiologicznej i oceny skuteczności szczepień przeciwko meningokokom konieczne jest prowadzenie ciągłego nadzoru sanitarnego, zwłaszcza w środowisku wojskowym.

Rozprawa doktorska por. mgr Moniki Konior, wykonana w Zakładzie Epidemiologii i Medycyny Tropikalnej Wojskowego Instytutu Medycznego (WIM) podejmuje to wyzwanie. Rozprawa ta jest trzecią znaną mi pracą badawczą poświęconą monitorowaniu nosicielstwa meningokoków w wybranych jednostkach Wojska Polskiego. Wyniki pierwszej pracy wykonanej w 1998-1999 roku pod kierunkiem prof. Stefana Tyskiego pokazały wysoki odsetek nosicieli wśród personelu wojskowego – od 36 do 61%. W roku 2007 miał miejsce wybuch epidemiczny ICHM w jednej z jednostek wojskowych w Warszawie, w której 15 osób zostało zakażonych hyperwirulentnym szczepem *N. meningitidis*, a dwóch żołnierzy zmarło. W 2015 roku w publikacji autorstwa Korzeniewskiego i wsp. (doi: 10.1007/5584_2014_22) pokazano znacznie niższy poziom nosicielstwa (od 5 do 10%) w środowisku żołnierzy zawodowych. Od 2014 roku prowadzone są w Polsce szczepienia personelu wojskowego przeciwko meningokokom. Zatem

pozyskanie danych o aktualnej sytuacji epidemiologicznej odnośnie nosicielstwa tych ziarenkowców jest bardzo pożądane. Dobór tematyki badawczej rozprawy doktorskiej por. mgr Moniki Konor oceniam wysoko, ze względu na istotne znaczenie pozyskanych wyników dla zdrowia publicznego. Badania nosicielstwa mogą dostarczyć cennych informacji na temat epidemiologii, patogenez, występowania serogrup i możliwych dróg transmisji meningokoków.

Podstawy teoretyczne i uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej zostały klarownie przedstawione przez Doktorantkę w rozdziałach WSTĘP oraz ZAŁOŻENIA I CELE przedłożonej rozprawy. W rozdziale WSTĘP przytoczono dane dotyczące odsetka nosicieli meningokoków w różnych europejskich krajach i populacjach objętych nadzorem epidemiologicznym. Omówiono też wybrane problemy epidemiologii zakażeń meningokokami, przytaczając aktualne dane dotyczące zapadalności na IChM w Polsce i innych, endemicznych dla tej choroby, krajach świata. Rozdział ten kończy się przedstawieniem aktualnych metod identyfikacji *N. meningitidis*. W rozdziale tym zabrakło jednak omówienia aktualnie stosowanych szczepionek i analizy efektywności szczepień w środowisku wojskowym w państwach, w których szczepienia przeciwko meningokokom stosuje się od dawna.

Poziom nosicielstwa meningokoków Doktorantka określiła na podstawie analizy mikrobiologicznej wymazów z jamy nosowo-gardłowej pobranych od 1744 żołnierzy zawodowych w wieku 21-59 lat, pełniących służbę w 10 Brygadzie Kawalerii Pancernej w Świętoszowie. Wstępne etapy izolacji kolonii bakterii podejrzanych o przynależność do *N. meningitidis* wykonała w Pracowni Mikrobiologicznej WIM, natomiast identyfikację co do gatunku, serogrupy i klonu wyosobnionych izolatów przeprowadziła osobiście w Krajowym Ośrodku Referencyjnym ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego Zakładu Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Leków w Warszawie. Na istotność pozyskanych wyników istotne wpływ miały właśnie wykonane przez Doktorantkę eksperymenty z użyciem technik molekularnych, takich jak PCR i MLST (ang. *multilocus sequence typing*), czyli sekwencjonowania fragmentów siedmiu genów kodujących białka uczestniczące w podstawowych dla meningokoków szlakach metabolicznych. Uzyskane wyniki Doktorantka podała wnikliwej i prawidłowej analizie statystycznej.

Wśród uzyskanych wyników za interesującą obserwację uważam wykazanie trwałego nosicielstwa meningokoków (w ciągu co najmniej 10 miesięcy) u 8,6% żołnierzy zawodowych jednostki wojskowej w Świętoszowie. Doktorantka pokazała to zjawisko poprzez genogrupowanie oraz zastosowanie

metody MLST; dwóch precyzyjnych technik molekularnych. U 26 nosicieli w przeciągu tego czasu wykazano ten sam typ sekwencyjny izolatów, a izolaty od 27 nosicieli wykazywały ten sam typ klonalny. Spośród nich najwyższą liczbę izolatów zaliczono do genogrupy B. Czy nosiciele przetrwałych izolatów z grup C, W i Y byli szczepieni czterowalentną szczepionką? Prosiłabym o dyskusję tego zagadnienia w trakcie publicznej obrony.

Istotnym wynikiem tej rozprawy, stanowiącym oryginalny wkład naukowy Doktorantki, jest też wyodrębnienie 16 izolatów *N. meningitidis* o nieznanych dotychczas typach sekwencyjnych, które zostały zamieszczone w międzynarodowej bazie danych wzorów PubMLST, prowadzonej przez Uniwersytet Oxfordzki w Wielkiej Brytanii. Autorka wykazała też, że wśród izolatów wyosobnionych od nosicieli są izolaty należące do kompleksów klonalnych, które powodują zachorowania na inwazyjną chorobę meningokokową.

Bardzo pozytywnie oceniam krytyczną analizę wyników uzyskanych w rozprawie w rozdziale DYSKUSJA, a zwłaszcza omówienie ograniczeń poznawczych wynikających z przyjętego w pracy a obowiązującego nadal w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej badania tylko jednego izolatu wyosobnionego z pobranej próbki, w tym przypadku z wymazu z jamy nosowo-gardłowej. Tego typu podejście, uzasadnione względami ekonomicznymi, zawęża jednakże istotnie możliwości analityczne podczas badania zjawiska nosicielstwa, zwłaszcza z wykorzystaniem technik epidemiologii molekularnej. Doktorantka poddaje dyskusji niedoskonałości w przyjętej procedurze badawczej i analizuje ich wpływ na uzyskane własne wyniki oraz wyniki uzyskane przez innych autorów.

Analiza statystyczna wyników uzyskanych przez Doktorantkę potwierdziła znany już związek pomiędzy paleniem papierosów a zwiększonym prawdopodobieństwem nosicielstwa *N. meningitidis*. Palacze stanowili 68% zidentyfikowanych nosicieli meningokoków w omawianych badaniach. Biorąc pod uwagę, że obserwacja ta dotyczy jednego ze składników naturalnego mikrobiomu górnych dróg oddechowych zdrowego człowieka, aktywne palenie tytoniu może wywierać podobny wpływ na inne gatunki drobnoustrojów, tworzących to konsorcjum.

Ostatni fragment rozdziału DYSKUSJA Doktorantka poświęciła analizie celowości immunoprofilaktyki zakażeń meningokokami w Siłach Zbrojnych RP. We fragmencie tym w mojej opinii zbyt daleko idące jest wnioskowanie o przyczynach

wprowadzenia obowiązkowych szczepień przeciwko meningokokom w Wojsku Polskim. Natomiast zgadzam się z Doktorantką co do konieczności prowadzenia badań przesiewowych, dotyczących nosicielstwa meningokoków wśród żołnierzy zawodowych. Ponadto, wobec obowiązującego obecnie Rozporządzenia Ministra Obrony z 2014 roku w sprawie programu szczepień ochronnych dla żołnierzy zawodowych oraz sposobu rejestracji przeprowadzania szczepień ochronnych zwraca uwagę niska wyszczepialność (rzędu 18%) zarejestrowana przez Doktorankę w 2015 i 2016 roku na podstawie ankiet przeprowadzonych wśród żołnierzy objętych badaniem. Dociekanie przyczyn tego zjawiska wykracza jednak poza ramy tej rozprawy doktorskiej.

Na podstawie dyskusji własnych wyników Doktorantka wysnuwa cztery wnioski. Trzy pierwsze mają raczej charakter podsumowujący uzyskane w rozprawie doktorskiej wyniki. Natomiast czwarty wniosek nie jest już aktualny, ponieważ immunoprofilaktyka dla żołnierzy zawodowych została wprowadzona w 2014 roku. Oczywiście, wyniki nadzoru epidemiologicznego mogą wpływać na modyfikację obowiązujących już aktów prawnych i, jak rozumiem, taka mogła być intencja Autorki formułującej ten wniosek.

Ponadto, mam do rozprawy doktorskiej kilka innych uwag i zastrzeżeń, jak zestawiono poniżej:

1. Nie podzielam zdania Doktorantki, że „wiele zakażeń przebiega w postaci bezobjawowego nosicielstwa”. Prosiłabym o uzasadnienie powyższego twierdzenia.
2. Bakterie można policzyć, zatem piszemy o „liczbie” a nie o „ilości” bakterii.
3. W podrozdziale 3.2.5 nie określano ekspresji genów *crg* i *ctr*, jak napisano w tytule podrozdziału, lecz obecność fragmentów tych genów w DNA badanych izolatów *N. meningitidis*.
4. Podrozdział 3.2.6 – nie podano warunków amplifikacji fragmentów genów analizowanych podczas określania genogrup badanych izolatów w reakcji PCR
5. Błąd w opisie Tabeli 8: nosiciele meningokoków w 2015 byli istotnie młodszy od osób, od których nie wyosobniono *N. meningitidis*.
6. Odnośnie analizy statystycznej: w jakim celu badano związek pomiędzy paleniem a szczepieniem przeciwko meningokokom?

7. W rozprawie Doktorantka wielokrotnie używa termin „zakażenie” (np. na str. 55) w odniesieniu do kolonizacji jamy nosowo-gardłowej. W ewentualnej przyszłej publikacji proszę o korektę i odpowiednie stosowanie tego terminu.

Podsumowując, rozprawa doktorska por. mgr Moniki Konior jest pracą oryginalną, opartą o przejrzyste założenia. Realizacja celów pracy pozwoliła na uzyskanie potrzebnych dla zdrowia publicznego danych, dotyczących charakterystyki pozyskanych od nosicieli izolatów *N. meningitidis* metodami klasycznej mikrobiologii, serologii i epidemiologii molekularnej. Część eksperymentalna tej pracy była pracochłonna ze względu na liczbę próbek poddanych wstępnej analizie mikrobiologicznej oraz późniejszemu typowaniu molekularnemu. Por. mgr Monika Konior pokazała zatem w niniejszej rozprawie doktorskiej swoje zaangażowanie i samodzielność w prowadzeniu badań naukowych w oparciu o szeroką wiedzę teoretyczną, udokumentowaną w rozdziałach WSTĘP i DYSKUSJA.

Wniosek:

W związku z powyższym stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora i zgodnie z art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycznego o dopuszczenie por. mgr Moniki Konior do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Anna Trafny

Centrum Inżynierii Biomedycznej
Instytut Optoelektroniki
Wojskowej Akademii Technicznej

Warszawa, dnia 27 lipca 2017 roku