

Dr n. biol. Monika Brzychczy-Włoch

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Katedra Mikrobiologii

Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii

ul. Czysta 18, 31-121 Kraków

e-mail: mbrzych@cm-uj.krakow.pl

Kierownik Katedry: Prof. UJ dr hab. med. Małgorzata Bulanda

AUTOREFERAT
do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

Kraków
sierpień 2014

Spis treści:

1.	Imię i nazwisko.....	1
2.	Życiorys i przebieg kariery zawodowej.....	1
2.1.	Życiorys.....	1
2.2.	Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	6
2.3.	Doświadczenie zawodowe.....	6
3.	Przedstawienie osiągnięcia naukowego.....	7
3.1.	Publikacje oraz wynalazek wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	7
3.2.	Wprowadzenie.....	9
3.3.	Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego.....	11
4.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	23

1. Imię i nazwisko: Monika Brzychczy-Włoch

2. Życiorys i przebieg kariery zawodowej

2.1. Życiorys

Urodziłam się i wychowałam w Krakowie. Tam też uczęszczałam do XIII Liceum Ogólnokształcącego im. Bohaterów Westerplatte do klasy o profilu biologiczno-chemicznym. Już wtedy zafascynowana biologią, pod kierunkiem mgr Iwony Cieślak-Prochownik, przygotowałam swoją pierwszą pracę eksperymentalną pod tytułem „Wrażliwość na bodźce u *Paramecium caudatum*”. Po zdaniu matury w roku 1995 zostałam przyjęta na studia magisterskie na kierunku Biologia, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Po trzecim roku studiów wybrałam specjalność „biologia molekularna”, która w tamtym czasie była renomowanym kierunkiem, na który przyjmowano zaledwie kilkunastu studentów, a kryterium przyjęcia stanowiła wysoka średnia ocen. Okres studiów ukształtował moje zainteresowania i ugruntował wiedzę oraz sprawił, że nauka stała się moją pasją. W Instytucie Biologii Molekularnej obroniłam pracę magisterską pod kierunkiem prof. Włodzimierza Korohody w Zakładzie Biologii Komórki w roku 2000. Temat mojej pracy brzmiał: „Zastosowanie komputerowych metod analizy obrazu w badaniach wpływu sposobu utrwalania na adherencję bakterii z rodzaju *Lactobacillus* szczep 133B do różnego rodzaju podłoży”.

Bezpośrednio po zdaniu egzaminu magisterskiego, otrzymałam stypendium naukowe i rozpoczęłam 4-letnie studia doktoranckie na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Pracę doktorską pt. „Badania nad właściwościami warunkującymi udział bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* we florze ludzkiego przewodu pokarmowego” wykonałam w Katedrze Mikrobiologii UJ CM pod kierunkiem prof. Piotra Heczko. Stopień doktora nauk biologicznych uzyskałam 21 października 2005 roku. W czasie studiów doktoranckich, w roku 2003, na świat przyszedł mój pierwszy syn – Szymon, a trzy lata później w 2006 roku, urodził się mój drugi syn – Paweł. Bezpośrednio po zakończeniu studiów doktoranckich zostałam asystentem w Katedrze Mikrobiologii UJ CM, której kierownikiem do 2012 roku był prof. Piotr Heczko, a obecnie funkcję tę pełni prof. Małgorzata Bulanda. Od 2006 roku do chwili obecnej pracuję na stanowisku adiunkta.

W roku 2013, na Uniwersytecie Ekonomicznym w Krakowie, ukończyłam studia podyplomowe dla pracowników jednostek naukowych i podmiotów działających na rzecz nauki „Zarządzanie projektem badawczym i komercjalizacja wyników badań”, dodatkowo w lutym 2013 roku zdałam egzamin i uzyskałam międzynarodowy certyfikat „Project Management Associate level D”, wydany przez IPMA Polska.

Obecnie, od maja 2012 roku, realizuję pięcioletni program specjalizacji z Mikrobiologii Medycznej dla Diagnostów Laboratoryjnych.

W ostatnich latach moje zainteresowania naukowe oscylowały głównie wokół badań nad patomechanizmem zakażeń, czynnikami wirulencji, lekoopornością oraz typowaniem molekularnym wybranych drobnoustrojów chorobotwórczych powodujących zakażenia u człowieka, a także nad poszukiwaniem nowych rozwiązań, w tym nowych metod diagnostyki i profilaktyki, których celem jest ograniczenie i nadzór nad zakażeniami. Do swoich najważniejszych dokonań naukowych, unikatowych w skali naszego kraju, mogę

zaliczyć wyniki badań nad patogennością paciorkowców z grupy B (*Streptococcus agalactiae*) izolowanych z nosicielstwa u kobiet w ciąży i zakażeń noworodków, w tym detekcją czynników wirulencji, determinant oporności na antybiotyki oraz immunoreaktywnych antygenów białkowych. Badania te prowadziłam na przełomie ostatnich kilku lat we współpracy naukowej z wieloma wybitnymi ekspertami, w tym m. in. z prof. Ryszardem Lauterbachem i dr hab. Dorotą Pawlik z Kliniki Neonatologii Katedry Ginekologii i Położnictwa Wydziału Lekarskiego UJ CM, z dr hab. Krzysztofem Rytlewskim oraz dr Wojciechem Pabianem z Kliniki Położnictwa i Perinatologii Katedry Ginekologii i Położnictwa Wydziału Lekarskiego UJ CM, z zespołem prof. Andrzeja Gamiana z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu oraz ze specjalistami z sześciu środków klinicznych wchodzących w skład Polskiej Sieci Neonatologicznej, kierowanej przez prof. Ewę Helwich z Kliniki Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie.

Kolejnym moim tematem badawczym, była analiza epidemiologiczna zakażeń o etiologii gronkowców koagulazo-ujemnych występujących w populacji noworodków z bardzo małą masą urodzeniową, hospitalizowanych w polskich oddziałach intensywnej terapii neonatologicznej oraz przeprowadzenie szczegółowej molekularnej charakterystyki tych izolatów z uwzględnieniem ich lekooporności, czynników wirulencji oraz zdolności do tworzenia biofilmu. Badania te prowadziłam również przy współpracy z ośrodkami klinicznymi tworzącymi Polską Sieć Neonatologiczną.

Dzięki współpracy naukowej z dr Tomaszem Gosiewskim z Katedry Mikrobiologii UJ CM, w ostatnich latach prowadziłam także badania nad opracowaniem metod diagnostyki molekularnej sepsy oraz innych zakażeń bakteryjnych.

W okresie od 2006 do 2014 roku, po uzyskaniu przeze mnie stopnia naukowego doktora, opublikowałam jako pierwszy autor lub współautor 37 publikacji. Wśród tych publikacji, 31 pozycji stanowią pełnotekstowe prace oryginalne, 1 pogładowa, 2 popularno-naukowe, 1 opis przypadku, 1 publikacja w suplemencie czasopisma oraz 1 rozdział w książce. Jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondującym 20 manuskryptów.

Analiza bibliometryczna mojego dorobku naukowego, sporządzona przez Bibliotekę Medyczną UJ CM (z 18.07.2014 r.) według listy Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania, wykazuje następującą łączną punktację: IF=34,615 (w tym 1,489 za publikację pełnotekstową w suplemencie czasopisma); KBN/MNiSW=475; IC=129,43. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science Core Collection 1945-2014 wynosi 105, zaś Indeks Hirscha jest równy 5.

Jako autor i współautor brałam udział w licznych konferencjach i sympozjach naukowych, gdzie łącznie zaprezentowałam 37 doniesień na konferencjach międzynarodowych i 21 doniesień na konferencjach krajowych, z których kilka zostało nagrodzonych. Dodatkowo dwukrotnie (w latach 2005 i 2008) byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego międzynarodowej konferencji na temat probiotyków i ich zastosowań EUPROBIO – European Conference on Probiotics and their Applications w Krakowie.

Byłam kierownikiem 3 projektów własnych, z których 1 finansowany był ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, zaś 2 z Narodowego Centrum Nauki. Pierwszy z projektów (NN401042337) był realizowany w latach 2009 – 2012 i obejmował charakterystykę izolatów *Streptococcus agalactiae* pochodzących z inwazyjnych zakażeń i od

nosicieli oraz analizę immunoreaktywnych antygenów białkowych obecnych na powierzchni paciorkowców z grupy B. Drugi projekt (NN401615340) był realizowany w latach 2011 – 2014 i dotyczył molekularnej charakterystyki gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych z zakażeń inwazyjnych od noworodków z małą i bardzo małą masą urodzeniową, z uwzględnieniem ich lekooporności oraz czynników wirulencji. Od marca 2014 rozpoczęłam realizację kolejnego projektu (2013/09/B/NZ6/00801), którego głównym celem jest charakterystyka immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* wraz z identyfikacją epitopu rozpoznawanego przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej. Ponadto w latach 2006 – 2013 byłam kierownikiem 6 projektów realizowanych w ramach badań statutowych UJ CM finansowanych z MNiSzW. Byłam także wykonawcą 3 projektów finansowanych ze środków MNiSzW i NCN (2PO5E00430; 3PO5E08425; NN401006739) oraz jednego projektu finansowanego przez Fundację Nauki Polskiej (VENTURES/2012-10/2). Dodatkowo uczestniczyłam w charakterze wykonawcy w sieci naukowej Polska Sieć Neonatologiczna finansowanej z MNiSW (669/E-215/BWSN-0180/2008) stanowiącej program nadzoru nad zakażeniami na neonatologicznych oddziałach intensywnej terapii.

Moja praca naukowa została nagrodzona Nagrodą Dziekana Wydziału Lekarskiego UJ CM za dorobek naukowy w roku 2009. W roku 2011 otrzymałam prestiżową nagrodę Morrison Rogosa Award za działalność naukową przyznaną przez American Society for Microbiology dla kobiety mikrobiologa z Europy środkowo-wschodniej.

Mój dorobek w zakresie ochrony praw własności intelektualnej obejmuje w sumie 7 zgłoszeń patentowych, w tym 3 w trybie międzynarodowym PCT oraz 4 w Urzędzie Patentowym RP. Za najważniejsze uważam opracowanie, jako główny wynalazca, testu do diagnostyki zakażeń *Streptococcus agalactiae* (P.404498; PCT/PL2014/050018). Badania te prowadziłam przy współpracy naukowej z zespołem prof. Andrzeja Gamiana z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Innowacyjny charakter opracowanej metody został doceniony przez Zarząd Fundacji „Kobiety Nauki – Polska Sieć Kobiet Nauki”, który w lipcu 2013 roku przyznał mi wyróżnienie i dyplom uznania w ramach II Konkursu „Innowacja jest Kobietą”. Wynalazek ten zdobył także złoty medal z wyróżnieniem na 29 Międzynarodowych Targach Wynalazczości i Innowacji - INPEX® 2014 w Pittsburgh, USA. Kolejne zgłoszenia patentowe obejmujące wyniki badań o charakterze aplikacyjnym dotyczyły: sposobu izolowania DNA drobnoustrojów z krwi (P.400501; PCT/PL2013/000109) oraz sposobu jednoczesnej detekcji bakterii i grzybów w preparacie biologicznym metodą PCR (P.403996; PCT/PL2014/050029). Badania nad diagnostyką sepsy realizowałam jako wykonawca w ramach projektu kierowanego przez dr Tomasza Gosiewskiego z Wydziału Lekarskiego UJ CM. Ostatnie ze zgłoszeń, dotyczące sposobu wytwarzania wielowarstwowej polimerowej powłoki ochronnej materiałów implantacyjnych z funkcją kontrolowanego uwalniania leków (P.406603), to efekt współpracy naukowej z zespołem prof. Andrzeja Kotarby z Wydziału Chemii UJ.

Poza działalnością naukowo-badawczą jestem nauczycielem akademickim. Prowadzę zajęcia na Wydziale Lekarskim UJ CM z przedmiotów: mikrobiologia z parazytologią i immunologią, mikrobiologia kliniczna, mikrobiologia jamy ustnej z mykologią, mikrobiologia ogólna i żywności, parazytologia; oraz na Uniwersyteckim Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR, Kierunek Weterynaria z przedmiotu mikrobiologia weterynaryjna.

Podczas mojej pracy w Katedrze Mikrobiologii UJ CM aktywnie uczestniczyłam w kształceniu studentów, byłam promotorem 2 prac magisterskich oraz 4 prac licencjackich z zakresu mikrobiologii klinicznej, realizowanych we współpracy z Wydziałem Biologii i Nauk o Ziemi UJ, Wydziałem Biotechnologii, Biochemii i Biofizyki UJ oraz Wydziałem Nauk o Zdrowiu UJ CM. Aktywnie uczestniczyłam w wykonywaniu badań do 2 prac doktorskich, a obecnie, od kwietnia 2014 roku, jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Moniki Grzebyk, studentki studium doktoranckiego na Wydziale Lekarskim UJ CM. Ponadto, byłam opiekunem wakacyjnych praktyk studenckich oraz opiekunem stażu dla absolwentów finansowanego ze środków unijnych, a także uczestniczyłam w zorganizowaniu krótkoterminowych staży dla uczestników programu ESCMID Collaborative Centres (ECCs) and Observerships. Dodatkowo prowadziłam wykłady, seminaria i ćwiczenia z mikrobiologii medycznej dla diagnostów laboratoryjnych w ramach kursów specjalizacyjnych: „Serologiczna diagnostyka zakażeń bakteryjnych, zarażeń pasożytniczych i grzybiczych” oraz „Metody molekularne”.

Moja praca dydaktyczna została nagrodzona Nagrodą Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za wysoką jakość pracy dydaktycznej za rok akademicki 2011/12 przyznaną na podstawie ankiet studentów UJ CM.

Jestem członkiem 2 towarzystw międzynarodowych: American Society for Microbiology (od 2008), gdzie w latach 2011 – 2013 pełniłam funkcję ASM Poland Country Liaison oraz European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (od 2006), przy czym, w tym ostatnim, w latach 2009 – 2013 należałam do grupy roboczej ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Jestem też członkiem 3 polskich towarzystw: Polskiego Towarzystwa Probiotycznego i Prebiotycznego (od 2005) gdzie od 2012 roku do chwili obecnej jestem Członkiem Zarządu Głównego, Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego (od 2009) oraz Polskiego Towarzystwa Zakażeń Szpitalnych (od 2013). Ponadto, od 2003 roku, jestem członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych.

Dodatkowo, jestem recenzentem w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, takich jak: BioMed Central Microbiology, Diseases of Aquatic Organisms, Yonsei Medical Journal, BMC Infectious Diseases, Indian Journal of Medical Research, Epidemiology and Infection, Journal of Infection and Public Health, Medical Principles and Practice, Clinical and Vaccine Immunology, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials; oraz o zasięgu polskim: Zakażenia. Jestem także członkiem Rady Redakcyjnej czasopisma internetowego Clinical Microbiology: Open Access, wydawca OMICS Publishing Group (od 2013).

Poza tym, kilkakrotnie dokonywałam oceny eksperckiej projektów zgłaszanych na konkursy do Narodowego Centrum Badań i Rozwoju oraz do Polskiej Agencji Rozwoju Przedsiębiorczości w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

Moją pasją badawczą i zdobytą wiedzę staram się dzielić z innymi poprzez popularyzację nauki. Poza kilkoma wywiadami i artykułami popularno-naukowymi od kilku lat współpracuję z Uniwersytetem Dzieci, gdzie jako wykładowca prowadzę zajęcia dla dzieci w wieku 6 – 14 lat, z podziałem wiekowym na kierunki: Odkrywanie, Inspiracje oraz Mistrz i Uczeń. Do moich osiągnięć na tym polu należy opracowanie programu warsztatów i przeprowadzenie w latach 2011 – 2014 cyklu zajęć z mikrobiologii, w których udział wzięło ok. 1000 dzieci. Ponadto, w ramach akcji Uniwersytet w Szkole przeprowadziłam zajęcia dla uczniów krakowskich szkół podstawowych, w których uczestniczyło ok. 600 dzieci.

2.2. Wykształcenie, posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- **01.10.1995 – 30.06.2000:** Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków
12.06.2000 – stopień magistra biologii, specjalność biologia molekularna
Tytuł pracy magisterskiej:
Zastosowanie komputerowych metod analizy obrazu w badaniach wpływu sposobu utrwalania na adherencję bakterii z rodzaju *Lactobacillus* szczep 133B do różnego rodzaju podłoży.
Promotor: **Prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda**
- **01.10.2000 – 30.09.2004:** Studium Doktoranckie na Wydziale Lekarskim, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
21.10.2005 – stopień doktora nauk biologicznych
Tytuł pracy doktorskiej:
Badania nad właściwościami warunkującymi udział bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* we florze ludzkiego przewodu pokarmowego.
Promotor: **Prof. dr hab. med. Piotr Heczko**
- **15.02.2012 – 28.02.2013:** Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie, Studia podyplomowe dla pracowników jednostek naukowych i podmiotów działających na rzecz nauki „*Zarządzanie projektem badawczym i komercjalizacja wyników badań*”
25.02. 2013 – Certyfikat Project Management Associate IPMA level D no 94/2013
- **05.2012 – w toku:** Specjalizacja z Mikrobiologii Medycznej dla Diagnostów Laboratoryjnych (nr licencji diagnosty laboratoryjnego: 11391)

2.3. Doświadczenie zawodowe

- **01.10.2006 – do chwili obecnej:** Adiunkt – Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Katedra Mikrobiologii, Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii, Pracownia Ekologii Drobnoustrojów.
- **01.11.2004 – 30.09.2006:** Asystent – Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Katedra Mikrobiologii, Zakład Bakteriologii.

3. Przedstawienie osiągnięcia naukowego

Tytuł osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

„Molekularna struktura populacji, czynniki wirulencji, determinanty oporności na antybiotyki oraz immunoreaktywne antygeny białkowe w badaniach nad nosicielstwem i patogennością paciorkowców z grupy B u kobiet w ciąży i noworodków”

3.1. Publikacje oraz wynalazek wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Dorobek naukowy obejmujący problematykę wskazaną w tytule osiągnięcia naukowego zawiera się w następujących dziesięciu publikacjach oraz w wynalazku, który uzyskał ochronę i był wystawiony na międzynarodowych targach, gdzie zdobył złoty medal z wyróżnieniem.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Brzychczy-Włoch M., Pabian W., Majewska E., Żuk M., Kiełbik J., Gosiewski T., Bulanda M. (2014a). **Dynamics of colonization with group B streptococci in women during subsequent trimesters of pregnancy in relation to normal flora.** *New Microbiol.* 37(3), 307-319.
IF: 1,667; Pkt. minister.:15; liczba cytowań wg WoS:0
2. Brzychczy-Włoch M., Gosiewski T., Bulanda M. (2014b). **Multilocus Sequence Types of Invasive and Colonizing Neonatal Group B Streptococcus in Poland.** *Med. Princ. Pract.* DOI: 10.1159/000362368.
IF: 0,963; Pkt. minister.:25; liczba cytowań wg WoS: 0
3. Brzychczy-Włoch M., Górska S., Brzozowska E., Gamian A., Heczko P.B., Bulanda M. (2013a). **Identification of high immunoreactive proteins from *Streptococcus agalactiae* isolates recognized by human serum antibodies.** *FEMS Microbiol. Lett.* 349(1): 61-70.
IF: 2,049; Pkt. minister.: 25; liczba cytowań wg WoS: 0
4. Brzychczy-Włoch M., Ochońska D., Bulanda M. (2013b). **Carriage of Group B Streptococci in pregnant women from the region of Krakow and their antibiotic resistance in the years 2008-2012.** *Pol. J. Microbiol.* 62(4): 427-433.
IF: 0,768; Pkt. minister.: 15; liczba cytowań wg WoS: 0

5. Bodaszewska-Lubaś M., Brzychczy-Włoch M., Adamski P., Gosiewski T., Strus M., Heczko P.B. (2013c). **Adherence of group B streptococci to human rectal and vaginal epithelial cell lines in relation to capsular polysaccharides as well as alpha-like protein genes - Pilot Study.** *Pol. J. Microbiol.* 62(1): 85-90.
IF: 0,768; Pkt. minister.: 15; liczba cytowań wg WoS: 0
6. Brzychczy-Włoch M., Wójkowska-Mach J., Helwich E., Heczko P.B. (2013d). **Incidence of maternal GBS colonization and neonatal GBS disease among Very Low Birth Weight Polish neonates.** *Med. Sci. Monit.* 19(1): 34-39.
IF: 1,358; Pkt. minister.: 20; liczba cytowań wg WoS: 0
7. Gosiewski T., Brzychczy-Włoch M., Heczko P.B. (2012a). **The application of the multiplex PCR to detect seven different DNA targets in Group B Streptococci.** *Folia Microbiol.* 57(3): 163-167.
IF: 0,791; Pkt. minister.: 15; liczba cytowań wg WoS: 1
8. Brzychczy-Włoch M., Gosiewski T., Bodaszewska-Lubaś M., Adamski P., Heczko P.B. (2012b). **Molecular characterization of capsular polysaccharides and surface protein genes in relation to genetic similarity of group B streptococci isolated from Polish pregnant women.** *Epidemiol. Infect.* 140(2): 329-336.
IF: 2,867; Pkt. minister.: 25; liczba cytowań wg WoS: 6
9. Brzychczy-Włoch M., Gosiewski T., Bodaszewska M., Pabian W., Bulanda M., Kochan P., Strus M., Heczko P.B. (2010). **Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance.** *J. Med. Microbiol.* 59(7): 780-786.
IF: 2,380; Pkt. minister.: 27; liczba cytowań wg WoS: 10
10. Strus M., Pawlik D., Brzychczy-Włoch M., Gosiewski T., Rytlewski K., Lauterbach R., Heczko P.B. (2009). **Group B streptococcus (GBS) colonization of pregnant women and their children observed on obstetrical and neonatal wards of the University Hospital in Cracow, Poland.** *J. Med. Microbiol.* 58(2): 228-233.
IF: 2,272; Pkt. minister.: 20; liczba cytowań wg WoS: 12

Sumaryczny *impact factor* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: 15,883.

Wynalazek wchodzący w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Test diagnostyczny zakażeń *Streptococcus agalactiae* u kobiet w ciąży**
(ang. Diagnostic test of *Streptococcus agalactiae* infections in pregnant women)

Twórcy: Dr M. Brzychczy-Włoch, Dr S. Górka, Dr E. Brzozowska, Prof. A. Gamian, Prof. P. Heczko. Zgłoszenie patentowe w UP RP nr **P.404498** z dnia 28.06.2013. Zgłoszenie patentowe międzynarodowe w trybie PCT nr **PCT/PL2014/050018** z dnia 28.03.2014. Wynalazek został wystawiony na 29 Międzynarodowych Targach Wynalazczości i Innowacji - INPEX® 2014 (The Invention & New Product Exposition) w dniach 18-20 czerwca 2014 w Pittsburgh w USA, gdzie został nagrodzony złotym medalem z wyróżnieniem w kategorii medycyna.

3.2. Wprowadzenie

Paciorkowce z grupy B (ang. *group B streptococcus*, GBS), których przedstawicielem jest gatunek *Streptococcus agalactiae*, zaliczane są do bakterii komensalnych, kolonizujących u człowieka przewód pokarmowy, odbytu oraz pochwę. Gatunek ten może być przyczyną inwazyjnych zakażeń wewnątrzrodniowych płodu oraz zakażeń noworodków, związanych z dużą śmiertelnością, a także zakażeń u kobiet będących w ciąży lub położu oraz zakażeń u pacjentów w podeszłym wieku lub osób poddanych immunosupresji¹.

W latach 90-tych XX-go wieku w Stanach Zjednoczonych odnotowano wysoką liczbę zakażeń u noworodków wywołanych przez *S. agalactiae*, które przebiegały pod postacią wczesnego zespołu chorobowego, ze śmiertelnością dochodzącą do 50%. Zjawisko to było przyczyną opracowania przez Centres for Disease Control and Prevention (CDC) w 1996 roku wytycznych mających na celu zapobieganie zakażeniom GBS u noworodków. Zdobyte przez klinicystów i naukowców doświadczenia wykazały, że najbardziej efektywną metodą ograniczającą liczbę zakażeń w tej grupie pacjentów jest profilaktyka, oparta na wykonaniu badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa GBS u kobiet będących między 35. a 37. tygodniem ciąży z uwzględnieniem istniejących czynników ryzyka zakażenia. U kobiet z potwierdzoną kolonizacją dróg rodnych lub odbytu przez *S. agalactiae* wskazane jest zastosowanie odpowiedniej okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej, a także obserwacja i ewentualnie poszerzona diagnostyka noworodków w kierunku zakażenia GBS².

W krajach Europy kolonizacja kobiet ciężarnych przez paciorkowce z grupy B wynosi, według dostępnych danych literaturowych: od 6,6% w Grecji, 7% w Hiszpanii, 14% w Wielkiej Brytanii, 16% w Niemczech, 30% w Czechach, do 36% w Danii. W Polsce opisywany odsetek nosicielstwa GBS u kobiet ciężarnych różni się istotnie, w zależności od badanej populacji pacjentek oraz stosowanej metody diagnostyki i wynosi 4,3% w Lublinie, 5,13% w Łodzi, od 11,4% do 19,7% w Warszawie, 19% w Rzeszowie oraz do 30% w Krakowie³.

Paciorkowce z grupy B, pomimo wprowadzenia w wielu krajach odpowiedniej profilaktyki, nadal są główną przyczyną zachorowań i zgonów noworodków w krajach rozwiniętych. Najistotniejszym czynnikiem ryzyka zakażeń u noworodków jest nosicielstwo *S. agalactiae* u matki, wczesny wiek ciążowy oraz mała masa urodzeniowa. U noworodków, GBS może wywoływać wczesne zakażenia rozwijające się w pierwszym tygodniu życia, lub

¹ Heath PT, i inni. (2007). Perinatal group B streptococcal disease. *Clin. Obstet. Gynecol.* 21:411-24.

² Schrag S, i inni (2002). Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR.* 15: 1-22.

³ Brzychczy-Włoch M. (2013). Profilaktyka zakażeń wywołanych przez paciorkowce grupy B. *Diagnosta Laboratoryjny* 2(31): 7-10.

zakażenia o późnym początku, rozwijające się między 7 a 90 dniem życia dziecka. Zakażenia u noworodków przebiegają najczęściej pod postacią zapalenia płuc i sepsy oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Częstość zakażeń paciorkowcami z grupy B wśród noworodków wynosi w USA 0,3-2,5 przypadków na 1000 żywo urodzonych dzieci, natomiast w krajach europejskich od 0,2 w Niemczech do 9 w Hiszpanii⁴. W Polsce brak jest nadzoru i rejestracji tych zakażeń, dlatego nie posiadamy danych epidemiologicznych, a jedynie szacunkowe. Wskazują one na występowanie zakażenia u około 0,5 do 2,5 przypadków na 1000 żywo urodzonych dzieci.

Zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego z 2008 roku penicylina jest zalecanym antybiotykiem w okołoporodowej profilaktyce zakażeń i do tej pory nie odnotowano w Polsce szczepów opornych na ten antybiotyk. Dla pacjentek uczulonych na penicylinę, alternatywę stanowią antybiotyki z grupy makrolidów (np. erytromycyna) lub linkozamidów (np. klindamycyny)⁵. Niestety w ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost oporności *S. agalactiae* na te antybiotyki. Dla paciorkowców z grupy B opisano dwa główne mechanizmy oporności na makrolidy. Geny *erm* (ang. *erythromycin ribosome methylase*), w tym *ermA* i *ermB* (podklasa *ermTR*), kodują enzym metylazę 23S rRNA, który odpowiada za metylację miejsca wiązania dla erytromycyny i klindamycyny w rybosomie. Ekspresja tych genów opisywana jest jako fenotyp MLS_B wykazujący krzyżową oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B i może mieć charakter konstytutywny (kMLS_B) lub indukcyjny (iMLS_B). Geny *mefA* i *mefE* (ang. *macrolide resistance M phenotype*) kodują drugi z mechanizmów, który oparty jest na pompie usuwającej antybiotyk z wnętrza komórki bakteryjnej. Ekspresja tych genów opisywana jest jako fenotyp M⁶.

Otoczka wielocukrowa (ang. *capsular polysaccharide*, CPS) jest podstawowym, najlepiej poznanym czynnikiem zjadliwość paciorkowców z grupy B. Struktura polisacharydów budujących otoczkę jest zróżnicowana w zależności od szczepu i określa serotyp bakterii. Do tej pory opisano dziesięć serotypów *S. agalactiae*, w tym Ia, Ib, II-IX. Podstawową rolą otoczki wielocukrowej jest ochrona bakterii przed fagocytozą przez makrofagi, co zapobiega dalszym etapom aktywacji układu immunologicznego. Poznanie częstości występowania określonych serotypów dla wybranych populacji ma istotne znaczenie w badaniach epidemiologicznych, a także w rozwoju prac nad skonstruowaniem poliwalentnej szczepionki przeciwko zakażeniom GBS, nad którą obecnie trwają intensywne badania i której głównym składnikiem są wybrane polisacharydy powierzchniowe *S. agalactiae*⁷.

Serotypowanie określające immunologiczny typ otoczki polisacharydowej, jest najczęściej przeprowadzane przy użyciu testów serologicznych. Jednakże, dzięki poznaniu sekwencji alleli w locus *cps*, odpowiadającym za biosyntezę otoczki, obecnie coraz powszechniej stosuje się metodę PCR. Określenie serotypu to podstawowy element charakterystyki izolatów paciorkowców z grupy B, jednakże ze względu na zbyt małą rozdzielczość, nie jest to metoda wystarczająca do celów epidemiologicznych. Ponadto, opisane zjawisko wymiany genów otoczki (ang. *serotype switch*) jest powszechne wśród tych

⁴ Fraile M.R. i inni (2001). Prevention of group B streptococcal neonatal disease. A plea for a European Consensus. *Clin. Microbiol. Infect.* 7: 25-7.

⁵ Kotarski J. i inni (2008). Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków. *Gin. Pol.* 79: 221-3.

⁶ Gherardi G. i inni. (2007). Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2909-16.

⁷ Johri A. i inni (2006). Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. *Nature Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro1552.

paciorkowców, przez co istnieje konieczność wprowadzenia dodatkowych metod typowania izolatów *S. agalactiae*⁸.

W ostatnich latach coraz większego znaczenia nabierają badania nad białkami *S. agalactiae*, głównie należącymi do rodziny Alp (ang. *Alpha-like proteins*). Białka te są najlepiej poznanymi i opisanymi białkami powierzchniowymi GBS. Do białek tych zaliczamy białko: Alfa-C, Epsilon (znane również pod nazwą Alp1 lub Epsilon/Alp1), Alp2, Alp3, Alp4 oraz Rib, kodowane odpowiednio przez alleliczne geny: *bca*, *epsilon*, *alp2*, *alp3*, *alp4* oraz *rib*. Wykazano, że niektóre z tych białek posiadają silne właściwości immunogenne i skoniugowane w eksperymentalnych szczepionkach z CPS istotnie podnoszą jego immunogenność. Ponadto, typowanie szczepów GBS w zależności od genów kodujących białka z rodziny Alp jest bardzo przydatne w badaniach epidemiologicznych i jest powszechnie stosowane w subtypowaniu poszczególnych serotypów GBS⁹.

Paciorkowce z grupy B charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną, która zależy między innymi od szerokości geograficznej, badanej populacji oraz typu zakażenia. *S. agalactiae* to gatunek charakteryzujący się dużym zróżnicowaniem populacji dlatego typowanie molekularne pełni kluczową rolę w badaniach epidemiologicznych. Do najczęściej stosowanych metod typowania należą metody dostarczające danych względnych: RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA*) i PFGE (ang. *pulsed field gel electrophoresis*) oraz bezwzględnych: MLST (ang. *multi locus sequence typing*). Analiza RAPD wykorzystująca metodę PCR, jest prostą i stosunkowo najtańszą z tych metod, jednakże z uwagi na bardzo małą siłę dyskryminacji jej użyteczność jest niewielka. Metoda PFGE charakteryzuje się największą rozdzielczością badanych izolatów i wysoką powtarzalnością, a jej zastosowanie ma ogromne znaczenie w bezpośrednim porównywaniu izolatów w obrębie badanej grupy. Z kolei, typowanie metodą MLST dostarcza jednoznacznych danych identyfikujących izolaty, w pełni porównywalnych pomiędzy laboratoriami i umożliwiających tworzenie baz danych na podstawie przypisanych im typów sekwencyjnych (ang. *sequence type*, ST), które tworzą główne kompleksy klonalne (ang. *clonal complex*, CC)¹⁰.

3.3. Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego

Badania nad paciorkowcami z grupy B rozpoczęłam w roku 2003, będąc członkiem zespołu kierowanego przez prof. Piotra Heczko. W latach 2003 – 2006 byłam wykonawcą projektu numer 3PO5E08425 finansowanego ze środków MNiSzW pt. „Znaczenie kolonizacji paciorkowcem grupy B (paciorkowiec bezmleczności, *Streptococcus agalactiae*) jako czynnik ryzyka zakażeń matek i noworodków”, którego kierownikiem była dr hab. Dorota Pawlik z Kliniki Neonatologii Katedry Ginekologii i Położnictwa Wydziału Lekarskiego UJ CM.

W Polsce dostępność danych epidemiologicznych opisujących częstość występowania *S. agalactiae* u kobiet w ciąży i noworodków, była i jest bardzo ograniczona. Rozpoczynając badania nad paciorkowcami z grupy B, poza doniesieniami literaturowymi z zagranicznych ośrodków, w tym głównie ze Stanów Zjednoczonych, brak było polskich opracowań oraz

⁸ Poyart C. i inni (2007). Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 45(6): 1985-8.

⁹ Creti R. i inni (2004). Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-protein-like protein genes. *J. Clin. Microbiol.* 42:1326-9.

¹⁰ Jones N. i inni (2003). Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2530-6.

zredagowanych zaleceń dotyczących wykrywania nosicielstwa GBS u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków. Dlatego też celem pierwszej pracy, rozpoczynającej monotematyczny cykl publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, poświęconych badaniom nad paciorkowcami z grupy B, była próba określenia częstości nosicielstwa *S. agalactiae* u kobiet w ciąży, a także określenie częstości kolonizacji noworodków tymi paciorkowcami w populacji pacjentek Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie hospitalizowanych na oddziale położniczym [Strus i inni, 2009]. Badania zostały przeprowadzone na grupie 340 kobiet w ciąży z podziałem na pacjentki z ciążą prawidłową oraz ciążą wysokiego ryzyka oraz na grupie 362 noworodków.

W badaniach tych, po raz pierwszy w Polsce, zostały wdrożone rekomendacje zalecane przez CDC, mające na celu przeprowadzenie badań przesiewowych u ciężarnych w kierunku GBS i profilaktykę zakażeń u noworodków¹¹. Metoda diagnostyki nosicielstwa GBS zakładała pobieranie od kobiet będących pomiędzy 35. a 37. tygodniem ciąży dwóch wymazów, w tym pierwszego z pochwy i drugiego z odbytu. Następnie zastosowanie płynnych podłoży wybiórczo-namnażających celem wstępnej preinkubacji pobranych materiałów i dopiero później hodowlę na stałych podłożach namnażających. Dodatkowo w celu szybkiej detekcji paciorkowców z grupy B w preparatach bezpośrednich zastosowano molekularną technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization*, FISH). Dzięki wykorzystaniu metody losowej amplifikacja polimorficznego DNA (ang. *random amplified polymorphic DNA*, RAPD) przeprowadzono także typowanie molekularne wyizolowanych szczepów *S. agalactiae* w celu wykazania dróg ich nabywania przez noworodki.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, iż kobiety będące w ciąży wysokiego ryzyka osiągnęły kolonizację GBS na poziomie 20%, zaś kobiety z ciążą prawidłową 17,2%. Częstość kolonizacji GBS u noworodków z ciąży wysokiego ryzyka wynosiła 35%, zaś z ciąży prawidłowych 26,7%. Ponadto, wykazano dwukrotnie wyższy odsetek kolonizacji pacjentek z grupy wysokiego ryzyka oraz ich dzieci szczepami opornymi na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B, w porównaniu z pacjentkami z ciążą fizjologiczną. Potwierdzono także przydatność metody FISH do szybkiej diagnostyki nosicielstwa paciorkowców grupy B. Metodę tą charakteryzował krótki czas oznaczenia, ok. 4-5 godzin, w przeciwieństwie do metody zalecanej przez CDC trwającej 3 – 4 dni. Zastosowanie metody RAPD potwierdziło występowanie identycznych genetycznie izolatów *S. agalactiae* u noworodków i ich matek, zaś w pojedynczych przypadkach wskazywało na możliwość horyzontalnej transmisji szczepów GBS ze środowiska szpitalnego.

Uzyskane wyniki stanowiły istotny punkt wyjścia do dalszych szczegółowych badań nad paciorkowcami z grupy B oraz stanowiły także podstawę opracowania ogólnopolskich rekomendacji dotyczących wykrywania nosicielstwa paciorkowców z grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustrój wydanych pod patronatem Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego (PTG) w 2008

¹¹Schrag S. i inni (2002). Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR* 15: 1-22.

roku^{12,13}. Jako członek grupy roboczej brałam aktywny udział w opracowaniu powyższych rekomendacji.

W celu uzyskania rzetelnych danych epidemiologicznych przedstawiających odsetek nosicielstwa *S. agalactiae* u kobiet z powiatu krakowskiego w kolejnej pracy analizie retrospektywnej poddano grupę 3363 pacjentek będących w trzecim trymestrze ciąży [Brzywczy-Włoch i inni, 2013b]. Badaniami objęto pacjentki NZOZ Szpitala na Siemiradzkiego, im. Rafała Czerwiakowskiego w Krakowie diagnozowane w kierunku nosicielstwa GBS zgodnie z rekomendacjami PTG w Pracowni Diagnostyki Mikrobiologicznej Katedry Mikrobiologii UJ CM w latach 2008 – 2012.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono wysoki odsetek kolonizacji kobiet ciężarnych przez paciorkowce z grupy B, który w poszczególnych pięciu latach objętych badaniem mieścił się w przedziale wartości od 25% w roku 2010 do 30% w latach 2008 i 2009, ze średnią wartością równą 28%.

Nosicielstwo *S. agalactiae* jednocześnie w pochwie, jak i odbycie oznaczono u 20% kobiet włączonych do badania, co w przeliczeniu na pacjentki GBS-dodatnie stanowiło 71% badanych. Uzyskane wyniki były istotne statystycznie i potwierdziły konieczność pobierania wymazów z odbytu, równoległe z wymazami z pochwy, gdyż 14% pacjentek GBS-dodatnich wykazywało nosicielstwo jedynie w pochwie, zaś 15% kobiet było skolonizowanych paciorkowcami tylko w odbycie.

Obserwowana dynamika zmian w poszczególnych miesiącach roku kalendarzowego, analizowana w okresie pięciu lat objętych badaniem, wykazywała statystycznie istotny wzrost częstości nosicielstwa GBS w miesiącach zimowych, w porównaniu do pozostałych pór roku.

Analizując lekooporność wykazano, iż wszystkie szczepy *S. agalactiae* izolowane w okresie pięciu lat objętych badaniem były wrażliwe na penicylinę, ampicylinę, nitrofurantoinę oraz ofloksacynę. Wykazano natomiast wysoki odsetek izolatów *S. agalactiae* opornych na erytromycynę, który w analizowanym okresie pięciu lat mieścił się w przedziale wartości od 22% w roku 2009 do 29% w roku 2012, ze średnią wartością równą 25%, oraz wysoki odsetek izolatów opornych na klindamycynę od 17% w roku 2009 do 25% w roku 2012, ze średnią wartością równą 20%. Wśród izolatów opornych dominował konstytutywny fenotyp oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (kMLS_B), stanowiąc 82%, następnie fenotyp M 11% oraz fenotyp indukcyjny (iMLS_B) 7%.

Analiza uzyskanych wyników w świetle danych literaturowych, wykazała najwyższy w skali naszego kraju i jeden z wyższych w porównaniu do innych krajów europejskich, odsetek nosicielstwa GBS wśród ciężarnych. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono konieczność ujednoczenia metodyki badań w kierunku nosicielstwa GBS oraz wprowadzenie standardów diagnostyki mikrobiologicznej, we wszystkich ośrodkach ginekologiczno-położniczych w Polsce w celu przeprowadzenia szczegółowej analizy epidemiologicznej z terenu całego kraju. Ponadto, w związku z bardzo wysokim odsetkiem szczepów opornych na makrolidy sięgającym w badanej grupie 25%, za wzorem

¹² Kotarski J. i inni (2008). Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków. *Gin. Pol.* 79: 221-3.

¹³ Heczko P.B. i inni (2008). Zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustrój. *Zakażenia* 2: 87-96.

rekomendacji CDC z 2010 roku¹⁴, należałoby rozważyć wycofanie erytromycyny z okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej i uaktualnienie obowiązujących od 2008 zaleceń PTG oraz ponowne ich wydanie, wzorem innych krajów, pod patronatem wszystkich polskich towarzystw, bezpośrednio związanych z problemem profilaktyki zakażeń u noworodków.

Kolejne badania nad nosicielstwem paciorkowców z grupy B u kobiet w ciąży miały na celu monitorowanie dynamiki kolonizacji dróg moczowo-płciowych oraz odbytu analizowane w trzech trymestrach ciąży oraz w porożu. Ocenie poddano także wybrane składniki fizjologicznej mikrobioty i ich zmiany gatunkowe oraz ilościowe obserwowane w badanej grupie pacjentek będących nosicielkami GBS, a także w grupie kontrolnej pacjentek nieskolonizowanych *S. agalactiae* [Brzychczy-Włoch i inni, 2014a].

Analizując otrzymane wyniki, wykazano, że obserwowana kolonizacja dróg moczowo-płciowych i odbytu przez paciorkowce z grupy B u kobiet diagnozowanych w kolejnych trymestrach ciąży miała charakter ciągły, przerywany lub okresowy, przy czym rezerwuarem szczepów GBS był przewód pokarmowy.

Biorąc pod uwagę poszczególne trymestry wykazano różnice w odsetku nosicielstwa GBS w badanej grupie pacjentek, które osiągało następujące wartości: trymestr I - 21%, trymestr II - 14% oraz trymestr III - 17% .

Populacja GBS w pochwie utrzymywała się na stałym poziomie w ciąży i porożu, osiągając średnią wartość 4×10^4 cfu/ml (ang. *colony forming units*, cfu). Wykazano istotne różnice w liczbie GBS w odbycie, gdzie w trzecim trymestrze odnotowano największe wartości średnie równe 4×10^5 cfu/ml, zaś w porożu najmniejsze 2×10^3 . Analizując masywność kolonizacji GBS maksymalne wartości z posiewów odnotowane dla wymazów z pochwy wynosiły 1×10^6 cfu/ml, z odbytu 4×10^6 oraz moczu 4×10^5 .

Bezobjawową bakteriurię GBS oznaczono u 13% pacjentek. Wykazano korelację pomiędzy występowaniem bezobjawowej bakteriurii u pacjentek, a masywną kolonizacją pochwy i odbytu przez GBS oraz utrzymywaniem się *S. agalactiae* u poszczególnych pacjentek, przez cały okres objęty badaniem.

Wyniki z ilościowej metody amplifikacji qPCR w czasie rzeczywistym dla wymazów pobranych z pochwy i odbytu były porównywalne z wynikami z metody posiewów, zaś w przypadku próbek moczu były niższe o dwa rzędy wielkości, co wskazywało na obecność w moczu naturalnych inhibitorów amplifikacji DNA. W przypadku wymazów z pochwy i odbytu potwierdzono większą czułość metody qPCR w porównaniu do metody hodowli, gdyż dla 7% materiałów ujemnych w posiewie uzyskano w tej metodzie wynik dodatni.

W celu przeprowadzenia analizy genetycznego podobieństwa izolatów GBS określono ich serotypy oraz przeanalizowano wzory restrykcyjne. Dzięki zastosowaniu metody PFGE (ang. *pulsed field gel electrophoresis*) porównano profile genetyczne izolatów GBS pochodzących od poszczególnych pacjentek z różnych trymestrów ciąży oraz z porożu, na podstawie których wykazano występowanie dwóch różnych klonów GBS u 27% badanych,

¹⁴ Verani J.R. i inni (2010). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59: 1-32.

które charakteryzowały się przynależnością do różnych serotypów i były obecne czasowo w pochwie lub odbycie. U pozostałych 73% pacjentek potwierdzono obecność tylko jednego klonu GBS utrzymującego się czasowo lub stale w drogach rodnych lub odbycie. Badanie pacjentek w położu, potwierdziło obecność tych samych klonów GBS, jakie były stwierdzone w czasie trwania ciąży, pomimo zastosowanej profilaktyki antybiotykowej. Tylko w jednym przypadku, u pacjentki w położu, odnotowano obecność innego typu PFGE, który nie występował u niej w ciąży.

Dodatkowo, analiza wybranych składników fizjologicznej mikrobioty dróg rodnych oraz odbytu przeprowadzona w trzech trymestrach ciąży w dwóch grupach pacjentek nie wykazała istotnych statystycznie różnic w składzie gatunkowym oraz ilościowym. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wytwarzające nadtlenek wodoru (H_2O_2 -dodatnie) oznaczono w wymazach z pochwy pobranych od wszystkich badanych pacjentek, podczas gdy gatunki z rodzaju *Lactobacillus* H_2O_2 -ujemne oraz bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* występowały u ok. 50% pacjentek, głównie w wymazach pobranych z odbytu. Z kolei rodzaj *Candida* oznaczono w wymazach z pochwy u 30% badanych. Na podstawie uzyskanych wyników, potwierdzono, że paciorkowce z grupy B nie wpływają na zmiany ilościowe i gatunkowe pozostałych składników fizjologicznej mikrobioty dróg rodnych kobiet, przez co stanowią jej element i powinny być zaliczane do drobnoustrojów oportunistycznych, a nie typowych patogenów.

Z uwagi na fakt, że wcześniejsze wyniki badań własnych nad transmisją paciorkowców z grupy B na noworodki wykazały, iż odsetek skolonizowanych dzieci jest wyższy w grupie noworodków urodzonych z ciąży wysokiego ryzyka, celem kolejnej pracy była ocena częstości występowania zakażeń w grupie noworodków z małą masą urodzeniową [Brzychczy-Włoch i inni, 2013d]. Dodatkowo szczegółowej analizie poddano poprawność wdrożenia rekomendacji PTG w grupie kobiet przedwcześnie rodzących.

Analizą retrospektywną objęto sześć polskich jednostek perinatologicznych (W1, W2, L1, P1, K1, S1) realizujących w roku 2009 nadzór nad zakażeniami w ramach Polskiej Sieci Neonatologicznej (PSN), kierowanej przez Prof. Ewę Helwich z Kliniki Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. Zgromadzone dane dotyczyły 812 kobiet, w tym 137 z ciążą mnogą (17%), które urodziły 910 dzieci z małą i bardzo małą masą urodzeniową (≤ 1500 g) spełniających kryteria włączenia zgodnie z protokołem nadzoru PSN.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano iż badanie bakteriologiczne wykonano zaledwie u 34% pacjentek, przy czym materiał badany stanowił w większości przypadków jedynie wymaz pobrany z pochwy, z pominięciem wymazu z odbytu. Odsetek badanych kobiet wahał się w zależności od ośrodka, wynosząc 2% w ośrodku L1, zaś 93% w ośrodku W2, a obserwowane różnice były istotne statystycznie. W grupie badanych pacjentek kolonizację paciorkowcami z grupy B wykazano u 19%, przy czym najwyższy odsetek nosicielstwa GBS odnotowano w ośrodku P1 (27%), zaś najniższy w ośrodkach W1 i S1 (8%), obserwowane pomiędzy ośrodkami różnice były istotne statystycznie. Stwierdzono, że częstość oznaczenia GBS w badanych materiałach, jest istotnie statystycznie związana z liczbą wykonywanych badań bakteriologicznych, to jest, im więcej badań wykonano

w danym ośrodku, tym większe było prawdopodobieństwo uzyskania wyniku dodatniego w kierunku GBS.

Okołoporodową profilaktykę antybiotykową przeciwko zakażeniom o etiologii GBS, zastosowano zaledwie u 47% pacjentek z potwierdzoną kolonizacją przez paciorkowce z grupy B, przy czym odnotowano istotne statystycznie różnice pomiędzy ośrodkami.

Przypadki wczesnych zakażeń o etiologii GBS w grupie 910 noworodków z małą masą urodzeniową zarejestrowano u sześciorga dzieci. Cztery przypadki zakażeń GBS (66%) stwierdzono w ośrodku W2, który istotnie częściej, niż inne ośrodki, wykonywał badania bakteriologiczne dróg rodnych u ciężarnych i miał istotnie wyższą wykrywalność GBS w badanej grupie kobiet. Może to wskazywać, na fakt, iż uzyskane wyniki dotyczące częstości zakażeń *S. agalactiae* u noworodków z małą masą urodzeniową, były zaniżone ze względu na słabą wykrywalność GBS w innych ośrodkach. Pacjentki będące matkami czworga dzieci z ośrodka W2, u których rozpoznano zakażenie, były nosicielkami *S. agalactiae* i zostały poddane odpowiedniej okołoporodowej profilaktyce antybiotykowej. Pozostałe dwa przypadki zakażeń odnotowano w ośrodkach S1 oraz L1, przy czym w momencie porodu, nie znano statusu nosicielstwa paciorkowców z grupy B u tych matek. Należy więc podkreślić, że w badanej grupie noworodków z małą masą urodzeniową i wczesnym wiekiem ciążowym, podanie okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej przeciwko zakażeniom GBS, okazało się nieskuteczne aż w 67% przypadków.

Wartość współczynnika zachorowalności na zakażenia GBS o wczesnym początku wynosiła w badanej grupie noworodków 6,6/1000 żywo urodzonych dzieci. Dominującą formą kliniczną tych zakażeń było zakażenie krwi odnotowane w 83% przypadków, natomiast zapalenie płuc stanowiło 17%. Ogółem, wczesne zakażenia GBS stanowiły 4,2% wszystkich zakażeń (6 przypadków na 142 zachorowania). Zakażeniom tym towarzyszył wysoki współczynnik śmiertelności sięgający 33%, co było najprawdopodobniej związane z badaną grupą noworodków, u których istniał szereg innych czynników ryzyka, m.in. wczesny wiek urodzeniowy i mała masa urodzeniowa.

Prezentowane dane wykazały bardzo wysoki współczynnik zakażeń o etiologii GBS w grupie noworodków z małą masą urodzeniową oraz potwierdziły, że wdrożenie odpowiednich procedur, nie zwalnia od prowadzenia nadzoru nad wczesnymi zakażeniami o etiologii GBS u noworodków z małą i bardzo małą masą urodzeniową, a kluczowe znaczenie w profilaktyce tych zakażeń ma właściwa współpraca pomiędzy położnikiem, laboratorium mikrobiologicznym oraz neonatologiem.

Badania nad charakterystyką izolatów *S. agalactiae* pochodzących z zakażeń i od nosicieli oraz analizą immunoreaktywnych antygenów białkowych obecnych na ich powierzchni realizowałam w latach 2009 – 2012 w ramach grantu własnego numer N N401 042337 finansowanego ze środków MNiSW.

W celu przeprowadzenia charakterystyki molekularnej izolatów *S. agalactiae* pochodzących z nosicielstwa u kobiet w ciąży wykorzystano metodę multipleks PCR dzięki której detekcji poddano poszczególne *cps* kodujące polisacharydy powierzchniowe, a także geny kodujących białka z rodziny Alp [**Brzychczy-Włoch i inni, 2012b**]. Dodatkowo w celu

analizy molekularnej struktury populacji przeprowadzono typowanie przy zastosowaniu elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE).

W populacji paciorkowców z grupy B pochodzących z nosicielstwa u ciężarnych dominował serotyp III (35%), następnie Ia (20%), V (17%), II (15%), Ib (8%) oraz IV (5%), przy czym, w badanej grupie nie stwierdzono szczepów należących do serotypów VI, VII, VIII. Wykazano iż rozkład serotypów odbiegał od losowego.

Analizując występowanie genów kodujących białka powierzchniowe z rodziny Alp wykazano, iż w badanej populacji kobiet dominowały izolaty z genem *epsilon* (26%), następnie *rib* (22%), *alp2* (21%), *bca* (17%) i *alp3* (14%), przy czym nie stwierdzono szczepów z genem *alp4*. Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy prawdopodobieństwem wystąpienia poszczególnych genów kodujących białka Alp a określonymi serotypami. Gen *epsilon* występował u izolatów z serotypem Ia, Ib i IV, gen *bca* u izolatów z serotypem Ib i II, gen *rib* u izolatów z serotypem II i III, gen *alp3* u izolatów z serotypem V oraz *alp2* u izolatów z serotypem III.

Analiza profili genetycznych uzyskanych dzięki zastosowaniu metody PFGE wykazała bardzo dużą zmienność genetyczną szczepów GBS izolowanych z przypadków nosicielstwa od kobiet będących w ciąży. Serotypy Ib, II i III charakteryzowały się największą zmiennością genetyczną, zaś serotyp V, szczególnie szczepy odporne na makrolidy z genem *alp3* wykazywał największe podobieństwo genetyczne.

Kolejne badania koncentrowały się na zagadnieniach dotyczących mechanizmów oporności na antybiotyki stosowane w profilaktyce oraz leczeniu zakażeń GBS i przedstawiała strukturę populacji szczepów *S. agalactiae* opornych na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B [Brzychczy-Włoch i inni, 2010]. Izolaty GBS o fenotypach oporności typu kMLS_B, iMLS_B oraz M poddano typowaniu przy zastosowaniu metod: multipleks PCR, RAPD oraz PFGE.

Wśród opornych izolatów GBS dominował serotyp V (67%), następnie II (15%), Ia (11%) i III (7%). Najczęściej występującym genem kodującym białka z rodziny Alp był gen *alp3* (70%), następnie *rib* (11%), *epsilon* (7,5%), *bca* (7,5%) oraz *alp2* (4%). Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy występowaniem oporności na makrolidy, a serotypem V i genem *alp3*.

Detekcji poddano geny kodujące oporność na erytromycynę, z których *ermB* wykazano u wszystkich izolatów z fenotypem kMLS_B należących do serotypu V, natomiast geny *mefA/mefE* oznaczono u izolatów z fenotypem M, reprezentujących serotyp Ia.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników wykazano, że metoda PFGE w porównaniu do metody RAPD, charakteryzowała się znacznie wyższą siłą dyskryminacji. Analiza profili genetycznych uzyskanych w metodzie PFGE, potwierdziła stosunkowo dużą zmienność genetyczną izolatów GBS opornych na makrolidy, wśród których największe podobieństwo genetyczne i występowanie identycznych genetycznie klonów GBS wykazano dla izolatów należących do serotypu V z genem kodującym białko Alp3 oraz genem oporności *ermB*.

Analizując wyniki stwierdzono, że obserwowane wśród paciorkowców z grupy B zjawisko nabywania oporności, związane jest nie tylko klonalnym rozprzestrzenianiem się

szczepów GBS w populacji, ale także z horyzontalnym przenoszeniem genów kodujących oporność pomiędzy paciorkowcami.

W celu przeprowadzenia analizy populacyjnej izolatów GBS pochodzących z zakażeń i nosicielstwa u noworodków, w kolejnej pracy wykorzystano opracowaną w ostatnich latach technikę, jaką jest metoda MLST (ang. *multi locus sequence typing*) [Brzychczy-Włoch i inni, 2014b]. Amplifikacji i sekwencjonowaniu poddano siedem genów, które są niezbędne do utrzymania podstawowego metabolizmu komórkowego (ang. *housekeeping genes*), w tym geny: *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkl*. Przy pomocy baz sekwencyjnych oznaczono przynależność szczepów GBS do typów sekwencyjnych (ST), a następnie do grup klonalnych (CC) oraz przeanalizowano otrzymane wyniki i zestawiono je z wynikami z innych ośrodków naukowych. Praca ta stanowiła pierwsze porównanie polskich izolatów *S. agalactiae* pochodzących od zdrowych noworodków skolonizowanych przez paciorkowce z grupy B oraz od noworodków z zakażeniem, z izolatami tego gatunku z innych krajów. Molekularna struktura populacji izolatów GBS pochodzących od noworodków uwzględniała także wyniki z metody multipleks PCR zastosowanej w kierunku oznaczenia serotypów, genów kodujących białka z rodziny Alp oraz genów kodujących oporność na makrolidy.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że w grupie zdrowych noworodków dominowały izolaty GBS z serotypem III (60%), a następnie Ia (20%), II (10%), V (5%) i Ib (5%). Podobnie wśród noworodków z rozpoznaniem zakażeniem GBS dominował serotyp III (50%), następnie II (27%), V (14%) i Ia (9%). W badanych grupach noworodków nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w rozkładzie serotypów.

Analizując izolaty GBS pod względem genów kodujących białka Alp wykazano, iż u noworodków zdrowych występowały głównie izolaty posiadające gen *alp2* (50%), następnie *epsilon* (25%), *rib* (10%), *bca* (10%) i *alp3* (5%). Z kolei, w grupie noworodków z zakażeniem dominował gen *rib* (58%), następnie *bca* (23%), *alp2* (9%), *alp3* (5%) oraz *epsilon* (5%). Wykazano istotność statystyczną pomiędzy izolatami GBS pochodzącymi z nosicielstwa, a genem *alp2* oraz izolatami z zakażeń a genem *rib*.

W badanej grupie noworodków szczepy GBS wykazujące oporność były izolowane jedynie od dzieci z zakażeniem, przy czym oporność na erytromycynę była odnotowana u 27% izolatów, podczas gdy na klindamycynę u 23%. Wśród opornych izolatów GBS największy odsetek równy 93% stanowiły szczepy z konstytutywnym (kMLS_B) fenotypem oporności na makrolidy, linkozamidy i sterptograminy B, podczas gdy szczepy z indukcyjnym (iMLS_B) fenotypem oporności stanowiły jedynie 7%. U wszystkich szczepów opornych na makrolidy potwierdzono obecność genu *ermB*.

Zastosowanie metody MLST umożliwiło oznaczenie 14 różnych typów ST, z czego 10 typów wchodziło w skład jednej z czterech głównych grup klonalnych: CC10, CC17, CC19 oraz CC23. Najwięcej izolatów tworzyło kompleks CC23 (49%) reprezentowaną przez typy sekwencyjne: ST-23, ST-220, ST-249; następnie CC19 (17%): ST-19, ST-106, ST-286; CC17 (10%): ST-17; oraz CC10 (10%): ST-10, ST-12, ST-358. Ponadto, w badanej puli izolatów GBS oznaczono pojedyncze typy ST, nie tworzące kompleksów klonalnych, takie jak: ST-1, ST-22, ST-255 oraz ST-410. Badania te umożliwiły także wyodrębnienie dwóch nowych

typów sekwencyjnych: ST-637 i ST-638, które zgłoszono do międzynarodowej bazy epidemiologii paciorkowców z grupy B opracowanej na podstawie wyników z metody MLST (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>)¹⁵. Wśród szczepów GBS izolowanych z zakażeń wykazano obecność międzynarodowego klonu epidemicznego o zwiększonej wirulencji (ang. *hypervirulent clone*) ST-17 (20%). Ponadto, wykazano istotność statystyczną pomiędzy występowaniem typu ST-17 a zakażeniem oraz typu ST-23 a kolonizacją noworodków.

Poznanie zależności pomiędzy otoczkowymi polisacharydami oraz białkami powierzchniowymi z rodziny Alp, a stopniem adherencji paciorkowców z grupy B do komórek epitelialnych, jest istotne w badaniach nad patomechanizmem zakażeń GBS. Dlatego też celem kolejnej pracy było wykazanie stopnia adherencji wybranych izolatów klinicznych paciorkowców z grupy B do ustalonych linii komórkowych, w tym ludzkiej linii gruczolakoraka okrężnicy HT-29 oraz linii nowotworu epidermoidalnego sromu i pochwy A-431 [Bodaszewska-Lubaś i inni, 2013c]. Badaniom poddano izolaty kliniczne *S. agalactiae* posiadające różne polisacharydy powierzchniowe, reprezentujące serotypy: Ia, Ib, II, III i V oraz zawierające różne geny kodujące białka z rodziny Alp, w tym: *alp2*, *alp3*, *bca*, *epsilon* i *rib*.

Analiza uzyskanych wyników wykazała większą adherencję paciorkowców do linii HT-29, będącej modelem nabłonka okrężnicy, niż do linii A-431, stanowiącej model nabłonka pochwy, a obserwowane różnice były istotne statystycznie.

Adherencja *S. agalactiae* do linii A-431 zależała istotnie statystycznie zarówno od serotypu, jak również, od genów kodujących białka z rodziny Alp. Największą adherencję do linii A-431 wykazywały izolaty reprezentujące serotyp III, zaś najmniejszą należące do serotypu Ia. Izolaty GBS z genem *alp2* lub genem *rib* wykazywały znacznie większą adherencję do badanej linii, niż izolaty z genem *alp3*.

Badania nad stopniem adherencji paciorkowców do linii HT-29 wykazały istotne statystycznie różnice jedynie w odniesieniu do genów kodujących białka z rodziny Alp. Potwierdzono, iż największą zdolność do adherencji mają izolaty z genem *alp2* lub genem *rib*, w przeciwieństwie do izolatów z genem *bca* lub *epsilon*.

Zaobserwowane zjawisko, zwiększonej adherencji *S. agalactiae* do linii HT-29 może tłumaczyć fakt, że GBS kolonizują głównie końcowy odcinek przewodu pokarmowego, który stanowi rezerwuar tych bakterii i z którego dochodzi do kolonizacji pochwy. Z kolei obserwowana największa adherencja izolatów z serotypem III do linii A-431, koreluje z faktem, iż aż 35% izolatów GBS kolonizujących drogi rodne kobiet reprezentuje ten serotyp. Wyniki wskazujące na największą zdolność do adherencji izolatów z genem *rib*, potwierdzają natomiast opisywaną przez innych autorów, kluczową rolę białka Rib w patomechanizmie zakażeń GBS.

¹⁵ Jolley K.A., i inni (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 11: 595.

Szybka diagnostyka w kierunku nosicielstwa paciorkowców z grupy B gwarantuje natychmiastowe wdrożenie celowanej profilaktyki, a w razie rozwoju zakażenia odpowiedniej terapii antybiotykowej, dlatego celem kolejnych badań było opracowanie szybkiej metody molekularnej do diagnostyki oraz dodatkowo do przeprowadzenia wstępnej charakterystyki GBS w oparciu o najważniejsze determinanty patogenności [Gosiewski i inni, 2012a]. Wynikiem prowadzonych badań było opracowanie i wystandaryzowanie nowej procedury multipleks PCR, która umożliwiła detekcję siedmiu sekwencji podczas pojedynczej reakcji PCR. W opracowanej metodzie amplifikacji poddano siedem najważniejszych determinant genetycznych paciorkowców z grupy B, ważnych z punktu widzenia badań nad patogennością tych bakterii, a także istotnych z punktu widzenia analiz epidemiologicznych: (1) gen *cfb* kodujący czynnik CAMP umożliwiający potwierdzenie gatunku; geny operonu *cps* – (2) *cps1aH*, (3) *cps1a/2/3II* i (4) *cps5O* – specyficzne dla najczęściej występujących w Polsce serotypów Ia, III i V; geny kodujące oporność na makrolidy – (5) *ermB* i (6) *mefA/E*; (7) odcinek *gbs2018* S10 specyficzny dla międzynarodowego hiperwirulentnego klonu ST-17. Standaryzacji poddano zarówno skład mieszaniny reakcyjnej jak i program amplifikacji celem uzyskania specyficznych produktów o zróżnicowanej wielkości od 153 do 1826 pz. Wynikiem badań było opracowanie metody multipleks PCR, która może stanowić przydatne narzędzie do badań przesiewowych zarówno w diagnostyce jak i epidemiologii zakażeń GBS, poprzez znaczne obniżenie kosztów oraz nakładu pracy.

W związku z trwającymi w ostatnich latach badaniami nad poszukiwaniem antygenów GBS, które w przyszłości można będzie zastosować jako składniki szczepionki, celem kolejnych badań było oznaczenie i przeprowadzenie identyfikacji konserwatywnych białek GBS, wykazujących silnie właściwości immunogenne [Brzychczy-Włoch i inni, 2013a]. Analizie poddano białka wyizolowane z 60 różnych genetycznie szczepów *S. agalactiae*, które rozdzielano przy zastosowaniu metody SDS-PAGE, a następnie poprzez zastosowanie immunoblotingu badano ich reaktywność przy użyciu surowic pochodzących od kobiet w ciąży skolonizowanych GBS oraz od pacjentów z zakażeniem, a także od osób z grupy kontrolnej GBS-ujemnych. Identyfikacja wybranych immunogennych białek prowadzona była przy wykorzystaniu metody spektrometrii mas LC-MS/MS. Porównanie uzyskanych mas peptydów i ich fragmentów z bazą danych sekwencji białkowych (NCBI, UniProt) przeprowadzono przy pomocy programu MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) oraz analizy statystycznej wiarygodności uzyskanych przypisań, dzięki którym ustalono listę białek obecnych w wybranych próbkach.

Analizując uzyskane wyniki potwierdzono obecność immunoreaktywnych białek prawie we wszystkich badanych izolatach GBS. Przy czym, niektóre szczepy produkowały dodatkowe immunogenne białka, które reagowały z większością badanych surowic pobranych od pacjentów GBS-dodatnich, zaś pojedyncze izolaty nie produkowały żadnych białek reagujących z badanymi surowicami. Oznaczone białka immunoreaktywne nie wykazywały aktywności immunologicznej z surowicami pochodzącymi od pacjentów z grupy kontrolnej.

Stężenie białek było różne w zależności od badanych izolatów GBS i mieściło się w przedziale od 0,2 do 2,7 mg/ml, ze średnią wartością równą 0,749 mg/ml. Zaobserwowano pewne istotne różnice w średniej ilości stężenia białka w zależności od serotypu GBS.

Wykazano, że szczepy z serotypem V posiadają największe stężenie białek o średniej wartości równej $1,18 \pm 1,12$ mg/ml, podczas gdy izolaty z serotypu Ia wykazywały najmniejsze stężenie białka o średniej równaj $0,5 \pm 0,29$ mg/ml.

Zaobserwowano, identyczną reaktywność izolowanych białek z przeciwciałami obecnymi w próbkach surowicy pobranych od matek oraz ich dzieci. Ponadto, zanotowano wyraźny wzrost reaktywności przeciwciał obecnych w surowicach uzyskanych od pacjentek w położu, w porównaniu do próbek pobranych od tych samych pacjentek będących w III trymestrze ciąży.

Zauważono korelację pomiędzy typem zakażenia z którego pochodziły izolaty GBS, a reaktywnością z surowicami, przy czym najbardziej reaktywne okazały się białka wyizolowane ze szczepów pochodzących z zakażeń układu moczowego.

Cztery wybrane białka (ok. 45 – 50 kDa), występujące w większości badanych izolatów GBS, charakteryzujące się wysoką immunoreaktywnością, poddano analizie metodą LC-MS/MS, z której otrzymane wyniki dla pierwszego białka (47 kDa) wskazywały na 89% homologii z białkiem ang. trigger factor, dla drugiego białka (47,4 kDa) 81% homologii z enolazą, dla trzeciego białka (50,6 kDa) 71% homologii z dehydrogenazą aldehydową oraz dla czwartego białka (44 kDa) 76% homologii z czynnikiem elongacji Tu. Warty podkreślenia jest fakt, iż białko trigger factor, w przeciwieństwie do pozostałych, nie było wcześniej opisywane w literaturze jako białko wykazujące immunoreaktywność.

Właściwości antygenowe wykazano także dla białek o masie cząsteczkowej około 40, 60 i 90 kDa. które reagowały z większością badanych surowic, przez co mogą stanowić bardzo ciekawy materiał dalszych analiz.

Wyniki wstępne przeprowadzonych badań wskazywały na to, że niektóre z białek GBS wykazujące immunoreaktywność z badanymi surowicami, mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie nie tylko jako antygeny szczepionkowe, ale także jako nośniki lub adiuwanty w szczepionkach polisacharydowych podnosząc ich immunogenność.

Wyniki te stanowią także istotny punkt wyjścia do dalszych badań nad immunoreaktywnymi białkami *S. agalactiae* i ich epitopami wiążącymi, które będą realizowane w ramach najnowszego projektu własnego numer 2013/09/B/NZ6/00801, finansowanego w latach 2014 – 2017 ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Wykorzystując aplikacyjny charakter uzyskanych wyników, moim nowatorskim wkładem w rozwój diagnostyki laboratoryjnej było opracowanie, jako główny wynalazca, testu umożliwiającego diagnostykę nosicielstwa oraz zakażeń powodowanych przez paciorkowce z grupy B. Możliwość użycia wytypowanych immunoreaktywnych białek GBS w teście diagnostycznym została zastrzeżona zgłoszeniem patentowym, które zostało złożone w Urzędzie Patentowym RP w 2013 roku (**P.404498**) oraz w trybie międzynarodowym (**PCT/PL2014/050018**) w 2014 roku. Badania nad wynalazkiem realizowane były przy współpracy naukowej z zespołem Prof. Andrzeja Gamiana z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Wynalazek został opracowany jako odpowiedź na narastający odsetek kolonizacji paciorkowcami z grupy B wśród kobiet w ciąży, a także wzrost liczby zakażeń GBS

w populacji noworodków przedwcześnie urodzonych oraz u osób w podeszłym wieku, pacjentów z cukrzycą oraz w immunosupresji.

Zasada opracowanego testu opiera się na wykorzystaniu specyficznej reakcji wybranych konserwatywnych immunoreaktywnych białek obecnych u paciorkowców z grupy B z przeciwciałami znajdującymi się w surowicy pacjentów. Jest to pierwszy zestaw immunoenzymatyczny typu ELISA do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko *S. agalactiae*. Metoda ta charakteryzuje się krótkim czasem oznaczenia (ok. 3 godziny), wysoką czułością i specyficznością, a także nie wymaga drogiego sprzętu oraz wyspecjalizowanego laboratorium. Test ten przedstawia alternatywę dla współcześnie stosowanych metod diagnostyki nosicielstwa paciorkowców z grupy B oraz poprzez dostarczenie nowych danych stanowi ich poszerzenie. Ponadto wpisuje się on w polskie rekomendacje dotyczące profilaktyki zakażeń perinatalnych o etiologii GBS.

Należy zaznaczyć, że innowacyjność i aplikacyjny charakter prowadzonych badań nad tym wynalazkiem została potwierdzona otrzymaniem dyplomu uznania od Fundacji Kobiety Nauki w ramach konkursu „Innowacja jest Kobietą” (czerwiec 2013). Wynalazek ten został także wystawiony na 29 Międzynarodowych Targach Wynalazczości i Innowacji - INPEX® 2014 (The Invention & New Product Exposition) w Pittsburgh w USA, gdzie został nagrodzony złotym medalem z wyróżnieniem w kategorii medycyna (czerwiec 2014).

Obecnie w ramach współpracy z Centrum Innowacji, Transferu Technologii i Rozwoju Uniwersytetu Jagiellońskiego (CITTRU UJ) odbywa się promocja wynalazku i poszukiwanie partnerów biznesowych zainteresowanych jego komercyjnym wykorzystaniem.

Komplet dziesięciu prac opublikowanych w latach 2009 – 2014, zaprezentowanych jako osiągnięcie naukowe, przedstawia dynamiczny i zróżnicowany genetycznie obraz epidemiologiczny *S. agalactiae* w Polsce, dostarczając istotnych danych wnoszących wkład w formowanie zaleceń i rekomendacji terapeutycznych i profilaktycznych, niezbędnych w codziennej praktyce lekarskiej, a także przydatnych w pracach nad opracowaniem polskiej szczepionki przeciwko zakażeniom paciorkowcami z grupy B. Ze względu na duże zróżnicowanie populacyjne i ogromne zdolności adaptacyjne *S. agalactiae*, obserwowane następstwo presji selekcyjnej ze strony człowieka, w postaci stosowanej profilaktyki i terapii antybiotykowej oraz obecności w kraju hiperwirulentnych klonów międzynarodowych, istotnym będzie dalsze monitorowanie sytuacji epidemiologicznej. Dlatego też wyniki zgromadzone w ramach prezentowanego osiągnięcia, są unikatowe w skali naszego kraju i stanowią niezbędny punkt odcięcia do dalszych analiz.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Okres moich badań po uzyskaniu stopnia doktora (lata 2006 – 2014), poza tematem przedstawionym jako osiągnięcie naukowe, charakteryzował się prowadzeniem równoległe kilku innych tematów badawczych, związanych z szeroko pojętą mikrobiologią medyczną.

Do najważniejszych z pozostałych tematów naukowo-badawczych mogę zaliczyć następujące badania:

1. **Molekularna charakterystyka gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych z zakażeń inwazyjnych od noworodków z małą i bardzo małą masą urodzeniową z uwzględnieniem ich lekooporności oraz czynników wirulencji.**
2. **Opracowanie skutecznych metod wykrywania bakterii i grzybów we krwi opartych o detekcję kwasów nukleinowych u chorych z sepsą.**
3. **Badania nad opracowaniem innowacyjnych powłok polimerowych, mających zastosowanie w medycynie.**

Pierwszy z tematów realizowałam w latach 2009-2014 w ramach współpracy z sześcioma neonatologicznymi ośrodkami klinicznymi wchodzącymi w skład Polskiej Sieci Neonatologicznej (669/E-215/BWSN-0180/2008), kierowanej przez prof. Ewę Helwich z Kliniki Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie, a także w ramach projektu własnego finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (N N401 615 340), którego byłam kierownikiem.

Celem projektu było przeprowadzenie analizy epidemiologicznej zakażeń o etiologii gronkowców koagulazo-ujemnych występujących w populacji noworodków z bardzo małą masą urodzeniową, hospitalizowanych w polskich oddziałach intensywnej terapii neonatologicznej oraz przeprowadzenie szczegółowej molekularnej charakterystyki tych izolatów z uwzględnieniem ich lekooporności, czynników wirulencji oraz zdolności do tworzenia biofilmu. Współwykonawcami projektu byli, między innymi, prof. Maria Borszewska-Kornacka z Kliniki Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Szpitala Klinicznego im. Ks. Anny Mazowieckiej w Warszawie oraz dr hab. Ewa Gulczyńska z Kliniki Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka, Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

W ramach prowadzonych badań powstało kilka publikacji oraz doniesień zjazdowych prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Pierwsza z prac była poświęcona analizie czynników ryzyka późnych zakażeń krwi, ze szczególnym uwzględnieniem zakażeń o etiologii gronkowców koagulazo-ujemnych (ang. *coagulase-negative staphylococci*, CNS), które w badanej grupie noworodków z małą masą urodzeniową dominowały i stanowiły aż 62,5%, ze śmiertelnością wynoszącą 2,4% [Wójkowska-Mach J., i inni (2014). **Surgical operations and other risk factors of the Late-Onset Bloodstream Infections of Very-Low-Birth-Weight Infant. Data from the Polish Neonatology Surveillance Network in 2009-2011.** *BMC Infect. Dis.* 18: 14:339]. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej nie potwierdzono żadnego istotnego związku pomiędzy bakteryjną etiologią późnych zakażeń krwi (LO-BSI), w tym zakażeń o etiologii CNS, a badanymi czynnikami ryzyka, takimi jak: masa urodzeniowa, wiek urodzeniowy, długość hospitalizacji przed obserwacją pierwszych objawów zakażenia oraz zastosowaniem procedur inwazyjnych (m. in. CVC, PVC, MV, CPAP, TPN).

Kolejna publikacja dotyczyła opisu epidemii zakażeń krwi u noworodków wywołanych przez gronkowce koagulazo-ujemne oraz sposobu interwencji mającej na celu wygaszenie ogniska epidemicznego na oddziale neonatologicznym [Brzychczy-Włoch M., i inni (2013). **Outbreak Intervention for Bloodstream Infections Caused by Methicillin Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in Neonatal Intensive Care Unit.** *Clin. Microbiol.* 2(4): 115]. W badaniach tych w celu przeprowadzenia dochodzenia epidemiologicznego zastosowano metodę typowania molekularnego z zastosowaniem elektroforezy pulsacyjnej (metoda PFGE). Wyniki badań potwierdziły klonalne oraz horyzontalne rozprzestrzenianie się klonów CNS na oddziale neonatologicznym i wykazały, że klony te były przenoszone pomiędzy dziećmi na rękach personelu medycznego. W badaniach tych potwierdzono zarówno monoklonalną, jak i poliklonalną etiologię zakażeń krwi, w przypadku których od noworodków izolowano dwa szczepy klonalne reprezentujące dwa gatunki: *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus haemolyticus*.

W celu zbadania lekooporności izolatów klinicznych CNS pochodzących z zakażeń od noworodków z małą masą urodzeniową zastosowano metody fenotypowe oraz metody molekularne, umożliwiające detekcję genów kodujących oporność na antybiotyki [Brzychczy-Włoch M., i inni (2013). **Prevalence of antibiotic resistance in multi-drug resistant coagulase-negative staphylococci isolated from invasive infection in very low birth weight neonates in two Polish NICUs.** *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 12: 41]. Detekcji poddano geny kodujące oporność m. in. na metycylinę, aminoglikozydy i makrolidy. W badanej puli izolatów wykazano bardzo wysoki odsetek szczepów metycylinoopornych, który wynosił dla izolatów *S. epidermidis* 98% zaś dla *S. haemolyticus* 100%. Ponadto, potwierdzono wysoki odsetek szczepów wielolekoopornych, który przeważał u izolatów reprezentujących gatunek *S. haemolyticus* w stosunku do *S. epidermidis*. Dodatkowo izolaty poddano typowaniu w kierunku kasety *SCCmec*, które potwierdziło, że gronkowce koagulazo-ujemne stanowią niebezpieczny rezerwuár genów oporności oraz są źródłem nowych typów kasety *SCCmec*.

Badanie wybranych czynników wirulencji CNS zaangażowanych w proces adherencji i tworzenia biofilmu oraz w patogenezę zakażeń prowadzono przy zastosowaniu metod fenotypowych [Grzebyk M., i inni (2013). **Fenotypowa ocena hydrofobowości powierzchni oraz zdolności do tworzenia biofilmu przez gronkowce koagulazo-ujemne izolowane z zakażeń od noworodków z bardzo małą masą urodzeniową.** *Med. Dośw. Mikrobiol.* 65(3): 149-159] oraz molekularnych, umożliwiających detekcję wybranych genów zaangażowanych w tworzenie biofilmu.

Przeprowadzone badania nad fenotypową oceną hydrofobowości powierzchni oraz zdolnością do tworzenia biofilmu wykazały różnice pomiędzy badanymi gatunkami, przy czym izolaty *S. haemolyticus* wykazywały statystycznie istotnie silniejszą zdolność do produkcji śluzu oraz tworzenia biofilmu, niż izolaty *S. epidermidis*.

Występowanie oraz udział genów operonu *ica*, odpowiadającego za syntezę polisacharydu PIA/PNAG (ang. *polysaccharide intercellular adhesin*), stanowiącego główny składnik biofilmu CNS oraz elementu inercyjnego IS256, a także genów regulatorowych *sarA*, genów wspomagających adherencję *atlE* oraz genu uczestniczącego w tzw. *quorum-sensing* *agrA* przeprowadzono przy zastosowaniu metody multipleks PCR. Potwierdzono wysoki odsetek izolatów posiadających badane geny, przy czym wykazano istotne

statystycznie różnice gatunkowe pomiędzy izolatami z gatunku *S. epidermidis* i *S. haemolyticus*.

Analiza genetycznego podobieństwa izolatów CNS wykonana metodą PFGE z zastosowaniem programu GelCompareII potwierdziła występowanie endemicznych klonów *S. epidermidis* i *S. haemolyticus*, charakteryzujących się wielolekoopornością oraz zdolnością do tworzenia biofilmu, które utrzymywały się w badanej grupie noworodków na dwóch badanych oddziałach intensywnej terapii neonatologicznej przez okres trzech lat objętych analizą. Ponadto, wykazano wysoką homogeniczność populacji gronkowców kagulazoujemnych izolowanych od noworodków oraz silne spokrewnienie szczepów izolowanych na obu badanych oddziałach, co mogło być wynikiem ich transmisji horyzontalnej lub presji selekcyjnej. Na podstawie zmian dynamiki populacji obu gatunków wykazano wyższą stabilność genetyczną gatunku *S. epidermidis* niż *S. haemolyticus*.

Typowanie molekularne przeprowadzone przy wykorzystaniu metody MLST z zastosowaniem programu ChromasPro 1.5 (Digital River) oraz bazy danych (<http://pubmlst.org>) umożliwiło dla izolatów z gatunku *S. epidermidis* oznaczenie typów sekwencyjnych (ang. *sequence type*, ST), które należały do następujących typów: ST-59, ST-5, ST-22, ST-88, ST-35. Zastosowanie algorytmu eBURST (<http://eBURST.mlst.net>) umożliwiło przypisanie oznaczonych typów ST do trzech międzynarodowych i najczęściej opisywanych w literaturze fachowej kompleksów klonalnych (ang. *clinal complex*, CC): CC I, CC II-5, CC II-89.

Kolejnym tematem badawczym, realizowanym w latach 2010-2013 było opracowanie skutecznych metod wykrywania bakterii i grzybów we krwi opartych o detekcję kwasów nukleinowych u chorych z sepsą. Badania te były realizowane w ramach projektu finansowanego z Narodowego Centrum Nauki (N N401 006739), kierowanego przez dr Tomasza Gosiewskiego, przy współpracy naukowej z lek. med. Danutą Jurkiewicz-Badacz z Centrum Szczepień Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II oraz dr Anną Kędziarską, Kierownik Zakładu Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

Wyniki prowadzonych badań zostały opublikowane w kilku publikacjach naukowych o zasięgu międzynarodowym oraz prezentowane na licznych zjazdach naukowych. Pierwsza z prac dotyczyła oceny aktywności termostabilnych polimeraz DNA w obecności hemu, który uznawany jest za najważniejszy inhibitor metody PCR w czasie rzeczywistym, stosowanej w diagnostyce sepsy [Gosiewski T., i inni (2013). **Evaluation of the activity of thermostable DNA polymerases in the presence of heme, as a key inhibitor in the real time PCR method in diagnostics of sepsis.** *Acta Biochim. Pol.* 60(4): 603-6]. Kolejna z prac prezentowała wyniki badań mających na celu porównanie metod stosowanych do izolacji DNA bakterii i grzybów chorobotwórczych z krwi oraz opisywała nowo opracowaną metodę uzyskania wysokiej jakości matryc do reakcji PCR [Gosiewski T., i inni (2014). **Comparison of methods for isolation of bacterial and fungal DNA from human blood.** *Curr. Microbiol.* 68(2): 149-155]. Z kolei, w celu jednoczesnego wykrywania bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, grzybów drożdżowych i pleśniowych opracowano nową metodę NESTED-multiplex-real time PCR, opisana w kolejnej pracy [Gosiewski T., i inni (2014).

A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood. *BMC Microbiol.* 4;14:144].

Aplikacyjny charakter uzyskanych wyników dotyczących sposobu izolowania DNA drobnoustrojów z krwi został zastrzeżony w Urzędzie Patentowym RP (**P.400501**) oraz w trybie międzynarodowym (**PCT/PL2013/000109**). Podobnie, metodyka dotycząca sposobu jednoczesnej detekcji bakterii i grzybów w preparacie biologicznym metodą PCR, startery oraz zestaw do detekcji bakterii i grzybów została objęta dwoma zgłoszeniami patentowymi (**P.403996**; **PCT/PL2014/050029**).

W ostatnich latach uczestniczyłam także w interdyscyplinarnych badaniach stosowanych nad innowacyjnymi biomateriałami, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie między innymi w ortopedii. Badania te prowadziłam głównie w ramach współpracy naukowej z zespołem prof. Andrzeja Kotarby z Wydziału Chemii UJ, jako wykonawca projektu dotyczącego funkcjonalizowania powłok polimerowych na powierzchni implantu metalowego w kierunku kontrolowanego uwalniania leków (VENTURES/2012-10/2). Uzyskane wyniki były prezentowane na kilku międzynarodowych konferencjach naukowych oraz zostały częściowo opublikowane [Gołda M. i inni (2013). **Oxygen plasma functionalization of parylene C coating for implants surface: nanotopography and active sites for drug anchoring.** *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 33(7): 4221-4227].

Wyniki o charakterze aplikacyjnym dotyczące sposób wytwarzania wielowarstwowej polimerowej powłoki ochronnej materiałów implantacyjnych z funkcją kontrolowanego uwalniania leków zostały objęte zgłoszeniem patentowym UP RP (**P.406603**).

Ponadto, w ramach badań nad opracowaniem innowacyjnych powłok polimerowych, w ostatnim czasie rozpoczęłam współpracę naukową z dr hab. Elżbietą Pamułą, Prof. AGH z Katedry Biomateriałów Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Prowadzone badania mają na celu ocenę aktywności bakteriobójczej biomateriałów zawierających antybiotyki w kontakcie ze szczepami bakterii wywołującymi zakażenia w układzie kostnym. Wstępne wyniki badań były już prezentowane na sympozjum naukowym z zakresu innowacyjnych technologii stosowanych w naukach biologicznych i medycznych.

Szczegółowy wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych wraz z informacją o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki stanowi odrębny załącznik do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Dr n. biol.
Monika Brzychczy-Włoch