

Prof. dr hab. Zofia Zwolska  
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc  
Warszawa ul. Płocka 26

## Recenzja

### Pracy doktorskiej lek. Anny Gostkowskiej-Malec pt:

„ Gruźlica u chorych z niewydolnością nerek, przewlekle dializowanych i po transplantacji nerek. Kliniczne i molekularne dochodzenia epidemiologiczne”

W epidemiologii gruźlicy, podobnie jak i w innych chorobach zakaźnych, zidentyfikowanie źródła zakażenia oraz szczegółowe prześledzenie jego transmisji w środowisku stanowią zasadnicze cele badawcze i diagnostyczne.

W gruźlicy, do niedawna dochodzenie do źródła zakażenia prowadzono w sposób konwencjonalny opierając się na wywiadzie lekarskim a z metod laboratoryjnych na ocenie właściwości fenotypowych prątków gruźlicy. Działo się to za sprawą późnego, w stosunku do innych bakterii, odkrycia genomu prątków gruźlicy.

Typowanie genetyczne prowadzi do ustalenia indywidualnych wzorów molekularnych badanych szczepów, dzięki czemu możliwe jest określenie pokrewieństwa pomiędzy nimi. Jak wynika z wielu badań, prątki należące do kompleksu *M. tuberculosis* stanowią grupę w dużym stopniu homogeną genetycznie. Na przykład w obszarze operonu rybozomalnego mniej podatne na zmiany ewolucyjne są nie tylko geny kodujące poszczególne rodzaje RNA, lecz także występujące między nimi sekwencje rozdzielające, które u wielu gatunków bakterii są regionami polimorficznymi i wykazują znaczne zróżnicowanie sekwencji nukleotydowej.

Podobnie, zachowawczość sekwencji charakteryzuje wiele genów strukturalnych prątków gruźlicy, a częstość występowania synonimicznych mutacji punktowych około 0,01 %

( 1 mutacja na każde 10 000 nukleotydów). Dodatkowo brak jednoznacznych dowodów potwierdzających horyzontalny przepływ genów wśród prątków gruźlicy przemawia za klonalnym charakterem ich ewolucji. Charakter ten w znacznej mierze jest zdeterminowany specyfiką samego organizmu takich jak: którego długi czas wzrostu, latentna faza rozwoju oraz wyspecjalizowana , izolowana nisza życiowa. Wszystko to nie sprzyja zwiększeniu zmienności genetycznej prątków gruźlicy. Ten niski poziom zmienności genetycznej istotnie ogranicza możliwości różnicowania prątków gruźlicy z użyciem metod molekularnych.

Doktorantka w swojej pracy prowadziła molekularne dochodzenia epidemiologiczne u chorych na gruźlicę z niewydolnością nerek, przewlekle dializowanych i po transplantacji nerek, którzy to chorzy z racji stanu immunosupresji, w jakiej się znajdują, stanowią bardzo trudną w diagnozowaniu grupę. Gruźlica u nich jest chorobą wielopostaciową z niecharakterystycznymi objawami klinicznymi i radiologicznymi i przez to jest niezwykle trudna do rozpoznania . Temat podjęty jest nie tylko niezwykle nowoczesny, wykonany przy użyciu najnowocześniejszych metod molekularnych, ale posiada walory edukacyjne, dla lekarzy innych specjalności, którzy napotykają w opiece nad chorym trudności diagnostyczne.

Doktorantka doskonale poradziła sobie z problemami szerokiej diagnostyki nawiązując współpracę z dwoma ośrodkami mikrobiologicznymi, w których wykrywano gruźlicę i przeprowadzono badania molekularne. Bez ich pomocy wykonanie pracy tak nowoczesnymi metodami byłoby niemożliwe.

Grupę badawczą Doktorantki stanowiło 24 chorych z przewlekłą chorobą nerek i rozpoznaną gruźlicą. Chorych podzielono na 3 grupy wg. sposobu leczenia : chorzy dializowani, po przeszczepie nerki i z niewydolną własną nerką. W grupach tych dokonano indywidualnej analizy historii zachorowania na gruźlicę. Zbieranie materiału i danych przeprowadzono w latach 2009-2011 zgodnie ze sztuką lekarską , wprowadzając dane do ankiety własnego autorstwa. Oceniono wyniki badań diagnostycznych, radiologicznych, testu tuberkulinowego, Quantiferonu i badań mikrobiologicznych.

Głównym celem pracy było zbadanie pokrewieństw genetycznych szczepów *M.tuberculosis* i przeprowadzenie analizy dróg transmisji prątków gruźlicy wśród ww. chorych.



Oprócz tego w pracy doktorantka postawiła sobie inne cele, a wszystkie one dotyczyły wskazania trudności na jakie napotyka lekarz w diagnostyce gruźlicy i leczeniu chorych z niewydolnością nerek.

Wszystkie postawione cele zostały spełnione co znalazło swoje odbicie w dobrze sformułowanych wnioskach.

Na uwagę zasługuje fakt, że u 80 % chorych uzyskano potwierdzenie mikrobiologiczne gruźlicy poprzez wyhodowanie szczepów *M.tuberculosis*. Potwierdzono to również i badaniach histologicznych. Można tutaj doszukiwać się dwóch powodów takiej sytuacji: doskonała diagnostyka mikrobiologiczna lub/i zaawansowany stan chorobowy.

Gruźlicę rozpoznała Doktorantka 4 razy częściej u chorych z czynną nerką przeszczepioną niż u przewlekle dializowanych.

Badania molekularne budowy DNA metodą spoligotypowania u szczepów prątków że bakterie wyhodowane od 12 chorych nie są jeszcze zarejestrowane w międzynarodowej bazie wzorów molekularnych. Wśród zarejestrowanych pochodzących od 8 chorych dominował spoligotyp H4 35 dosyć powszechny typ molekularny występujący w Polsce. Autorka przeprowadziła bardzo wnikliwą, wieloczynnikową analizę statystyczną współzależności wielu czynników osobniczych, mikrobiologicznych i klinicznych poszukując korelacji pomiędzy nimi.

Tylko jeden z parametrów wykazywał znamiennej istotność różnic tj. czasu od rozpoznania niewydolności nerek do rozwoju gruźlicy u chorych bez potwierdzenia mikrobiologicznego w stosunku do grupy z wyhodowanymi prątkami.

Badania pokrewieństw genetycznych, w materiale Doktorantki, wykonane trzema metodami z różnym potencjałem różnicującym wykazały obecność 3 grup epidemiologicznych składających się ze szczepów blisko spokrewnionych filogenetycznie. Szczepy te izolowano od 10, 5 i 2 chorych, co wyraźnie wskazuje na transmisję gruźlicy w tych grupach chorych. Należy podkreślić, że większość chorych (16/67 %) należała do pierwszego kręgu epidemiologicznego, którego cechą jest trwały kontakt.

Praca ma typowy układ. Jest poprzedzona wstępem opisującym z dużą starannością epidemiologię gruźlicy w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem własnego regionu tj.

województwa dolnośląskiego. Moją uwagę zwróciły dane dotyczące drastycznie niskich odsetków ludzi wyleczonych z gruźlicy w 2012 r. tj. poniżej 50 %. Ponadto lek. Anna Gostkowska-Malec szeroko opisuje patogenezę gruźlicy i stan supresji immunologicznej u chorych z niewydolnością nerek. Na szczególną uwagę zasługuje obszerna, 15-stronnicowa „Dyskusja”, w której Doktorantka w sposób dojrzały i wnikliwy przedstawia trudności na jakie napotyka diagnostyka gruźlicy u osób z niewydolnością nerek. 197 pozycji piśmiennictwa zostało wybranych i zacytowanych w sposób właściwy.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest pierwszą tego typu w Polsce, gdzie u ww chorych przeprowadzono molekularne dochodzenia do źródła zakażenia, wykazując jasno transmisję *Mycobacterium tuberculosis* pomiędzy chorymi. Praca napisana jest bardzo dobrym polskim językiem i jest bogato ilustrowana przejrzystymi rycinami i tabelami.

Nie odnalazłam w pracy żadnych elementów, które mogłyby być poddane krytyce.

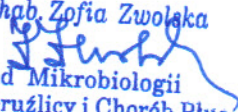
Zwracam się zatem do Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z uprzejmą prośbą do dopuszczenia lek. Anny Gostkowskiej-Malec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na oryginalność pracy, walory naukowe i edukacyjne proszę Wysoką Radę o stosowne wyróżnienie pracy.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Zofia Zwolska

2 marzec 2015 r.

Prof. dr hab. Zofia Zwolska  
  
Zakład Mikrobiologii  
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc