



UNIwersytet w Białymstoku

Instytut Biologii

Zakład Mikrobiologii

15-245 Białystok, ul. Konstantego Ciołkowskiego 1J

Tel. + 48 857 388 410, Fax +48 857 388 414

dr hab. Izabela Święcicka, Prof. UwB
Kierownik Zakładu Mikrobiologii

Białystok, 24 sierpnia 2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Joanny Chmielewskiej, zatytułowanej
„Analiza genetycznych markerów wirulencji i profili lekooporności
patogennych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od pacjentów
ambulatoryjnych z zakażeniem układu moczowego”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierunkiem dr hab. n. med. Katarzyny Leszczyńskiej. Rozprawę przygotowano w języku polskim w postaci monografii.

Ocena znaczenia naukowego tematyki badawczej podjętej przez doktorantkę

Recenzowana dysertacja stanowi interesujące dzieło naukowe z zakresu biologii *Escherichia coli*. Głównym celem pracy było wyznaczenie determinant wirulencji oraz lekooporności szczepów tego gatunku pozyskanych od pacjentów z zakażeniem układu moczowego (ZUM). Pomimo, iż pierwsze szczepy *E. coli* zostały opisane już pod koniec XIX wieku, wiele zagadnień dotyczących tego mikroorganizmu pozostaje nie wyjaśnionych, szczególnie z punktu widzenia genetycznych podstaw patogenności. Na całym świecie jest duże zainteresowanie *E. coli*, z racji systematycznie wzrastającej liczby infekcji powodowanych przez tego oportunistycznego patogena. W tym względzie szczególnie niebezpieczne i szeroko rozpowszechnione są szczepy powodujące ZUM, tzw. szczepy uropatogenne *E. coli* (UPEC). Pomimo, że badaniom poddano szczepy z województwa podlaskiego, to rozprawa doktorska pani Sylwii J. Chmielewskiej ma charakter uniwersalny, gdyż dostarcza wiele nowych danych na temat czynników wirulencji oraz lekooporności izolatów UPEC. Szczególne znaczenie naukowe podjętej tematyki wynika z odniesienia badań do dużej liczby nowo izolowanych szczepów, co pozwala na dogłębną ocenę występowania, wirulencji i lekooporności uropatogennych *E. coli*. Rola Doktorantki w rozwoju badań nad *E. coli* jest znacząca, a wyniki zaprezentowane w recenzowanej

pracy mają nie tylko charakter opisowy, ale też posiadają duży potencjał aplikacyjny tak w medycynie jak i w epidemiologii.

Ocena opisu aktualnego stanu wiedzy, doboru celów badań oraz metod badawczych

We *Wstępie*, na podstawie bogatego i dobrze dobranego piśmiennictwa, Autorka wyczerpująco scharakteryzowała badany gatunek bakterii, przedstawiając poszczególne patotypy *E. coli*, z podziałem na patogeny jelitowe, pozajelitowe oraz związane z ZUM. Szczegółowo zostały też przedstawione czynniki wirulencji oraz podstawy lekooporności *E. coli*. Niemniej, w moim odczuciu część *Wstępu* poświęcona fimbriom mogłaby być znacznie skrócona. Jednakże rozumiem fascynację Autorki fimbriami, gdyż rzeczywiście w przypadku *E. coli* są to znaczące czynniki wirulencji, szczególnie w pierwszym etapie infekcji, tzw. adhezji patogena do komórek gospodarza. Bardzo szeroko opisano też zjawisko zakażeń układu moczowego. Szczególnie cenny w tym zakresie jest fakt, iż Autorka dostrzega inne mikroorganizmy potencjalnie związane z ZUM oraz przedstawia odmienne obrazy przebiegu infekcji u dzieci i dorosłych. *Wstęp* kończy podrozdział poświęcony antybiotykoterapii zakażeń układu moczowego. Po analizie *Wstępu* zaintrygowały mnie dwa problemy. Po pierwsze, Doktorantka pisze „Zmieniające się środowisko stymuluje powstanie nowych kombinacji genów wirulencji, powodując rozprzestrzenianie się nieobserwowanych dotąd nowych patogennych klonów *E. coli*.” Czy możliwa jest sytuacja odwrotna, iż zmieniające się środowisko powoduje utratę determinant patogenności? Drugie moje pytanie dotyczy szczepionek przeciwko ZUM. Czy w ocenie Doktorantki z punktu widzenia epidemiologii i przebiegu ZUM, poszukiwania szczepionek przeciw uropatogennym szczepom *E. coli* jest uzasadnione? W którym momencie nastąpiłoby podanie szczepionki? Dodatkowo zwracam uwagę na dwie sprawy. Na stronie 35, Autorka wskazuje, iż proteazy serynowe zostały filogenetycznie podzielone na dwie klasy. Nie jest to trafne stwierdzenie, gdyż filogeneza odnosi się do organizmów, a nie poszczególnych białek. Na stronie 45 Autorka podkreśla, iż „zastosowanie nieuzasadnionej terapii może skutkować selekcją szczepów opornych”. Z biologicznego punktu widzenia mówimy o „presji selekcyjnej”, a nie „selekcji”.

Cele badawcze zostały sformułowane precyzyjnie, odzwierciedlają tytuł rozprawy doktorskiej oraz są zgodne z aktualnym stanem wiedzy odnośnie *E. coli*. Badania przeprowadzono za pomocą różnorodnych metod fenotypowych oraz technik biologii molekularnej. Schemat eksperymentów jest logiczny i spójny. W pierwszym etapie Doktorantka izolowała szczepy na podłożach wybiórczo-różnicujących z niemal tysiąca prób moczu i określiła odsetek prób z bakteriurią znaną, wskazując na wysoki poziom ZUM. Następnie dokonała identyfikacji wyizolowanych szczepów na podstawie

obserwacji mikroskopowych oraz analiz biochemicznych. Dobrym rozwiązaniem było zastosowanie API testów, które generalnie w przypadku bakterii Gram-ujemnych dają wysoce prawdopodobne wyniki identyfikacyjne. W części analiz fenotypowych Doktorantka pokusiła się o określenie profili białkowych z zastosowaniem spektrometrii mas w technice MALDI-TOF. Przyznaję, iż umieszczenie wyników tych analiz w rozdziale *Material i Metody* jest dla mnie niezrozumiałe. Prawdopodobnie przedstawiając spektrogramy dla trzech szczepów *E. coli* w rozdziale dysertacji poświęconym metodom badawczym, Doktorantka kierowała się brakiem możliwości wykonania MALDI-TOF dla wszystkich wyizolowanych szczepów, ale równocześnie chciała wskazać na znaczenie tej metody w identyfikacji bakterii. Następnie określono wrażliwość izolatów na antybiotyki i chemioterapeutki. Znaczną część pracy poświęcono wyznaczeniu wybranych determinant wirulencji za pomocą techniki PCR. Do analiz zastosowano metodę PCR pozwalającą na jednoczesne testowanie obecności trzech genów w jednej próbce (multiplex PCR). Jestem ciekawa, jakimi przesłankami kierowano się przy wyborze genów do testowania w jednej reakcji PCR? W tym miejscu chciałabym podkreślić, iż istotnie dokonano właściwego wyboru genów do analiz, a otrzymane wyniki pozwoliły na określenie wirulotypów w oparciu o szeroki zestaw determinant. Stwierdzam, iż zastosowane metody pozwoliły na realizację postawionych celów oraz wysoko oceniam opanowanie warsztatu naukowego przez Doktorantkę.

Ocena osiągniętych wyników oraz wniosków

Dzięki przeprowadzeniu wieloetapowych badań w oparciu o różnorodne techniki fenotypowe i genotypowe, otrzymano interesujące wyniki, które w dysertacji zostały bardzo szczegółowo opisane oraz przedstawione w postaci Tabel i Rycin. Do oceny wyników zastosowano analizę statystyczną, co pozwoliło na wyłonienie istotnie statystycznych danych i dało podstawy do wysunięcia wniosków. Mając na celu znalezienie różnego rodzaju korelacji, np. antybiotykooporność *versus* grupa filogenetyczna, antybiotykooporność *versus* wirulotyp, przedstawiono bardzo dużo cennych danych. Jednakże, niekiedy czytający dysertację może gubić się w ogromnej liczbie prezentowanych wyników i ich wieloaspektowości. Z pewnością podział tego rozdziału na podrozdziały skutkowałby większą przejrzystością tej sekcji dysertacji oraz ułatwiałby analizę otrzymanych danych. Powyższa uwaga jest jedynie subiektywną opinią recenzenta odnośnie sposobu prezentacji i w żaden sposób nie rzutuje na wysoką ocenę otrzymanych wyników badań.

Pomimo, iż czynnikiem etiologicznym ZUM są najczęściej bakterie Gram-ujemne, to w badaniach własnych Doktorantka stwierdziła znaczny odsetek bakterii Gram-dodatnich (~31%),

głównie *Enterococcus faecalis*, wśród mikroorganizmów wyizolowanych z moczu od pacjentów z ZUM. We *Wstępie* Doktorantka podkreśla, iż uropatogenne szczepy *E. coli* są przyczyną 75-95% przypadków ZUM (strona 16). Zatem wyizolowanie bakterii Gram-dodatnich aż w 31% prób moczu, może wskazywać, iż mamy do czynienia ze zmieniającą się tendencją odnośnie znaczenia *E. coli* jako głównego czynnika etiologicznego ZUM. W *Dyskusji* Doktorantka szeroko odniosła się do tego zagadnienia, opierając się na rekomendacjach Hryniewicz i Holeckiego (dane internetowe) oraz Hryniewicz i wsp. (2001), jak i pracach opisujących czynniki etiologiczne ZUM w innych krajach. W wyniku analizy filogenetycznej wykazano, iż uropatogenne szczepy *E. coli* przynależą do trzech spośród czterech grup filogenetycznych opisywanych w odniesieniu do tego gatunku bakterii, z których grupy B2 i D były dominujące. Zarówno z biologicznego, jak i z medycznego punktu widzenia, jest to interesujący wynik, choć w istocie zgodny z danymi literaturowymi. Znaczną część badań poświęcono wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki, uzyskując wyniki wskazujące na istnienie wśród tej grupy bakterii szczepów opornych na wiele leków. Wśród tej grupy bakterii wykazano oporność głównie na sulfonamidy, fluorochinolony oraz antybiotyki β -laktamowe. Są to badania bardzo cenne z medycznego punktu widzenia oraz ze względu na procedury leczenia przypadków ZUM. Niewątpliwie testowanie tak dużej liczby różnorodnych antybiotyków należy uznać za trafnie podjęte i istotne z punktu widzenia tematyki pracy. Bardzo cenne są też analizy poszukiwania wirulotypów oraz korelacji wirulotypów z grupami filogenetycznymi *E. coli*.

Wyniki zostały przeanalizowane w oparciu o aktualny stan wiedzy. W *Dyskusji* dość wnikliwie odniesiono się do wszystkich wątków badań, a autorka szeroko porównuje otrzymane wyniki z danymi literaturowymi. Mając jednak na myśli moje zainteresowanie filogenezą i strukturą populacji bakterii, chciałbym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się podczas obrony do zagadnienia zróżnicowania populacji *E. coli* pod względem wirulotypów w ujęciu globalnym. Precyzując, czy szczepy *E. coli* danej grupy filogenetycznej z danego kontynentu charakteryzują się zbliżonym wirulotypem, a izolaty z innych obszarów klasyfikowane do tej samej grupy filogenetycznej mogą mieć odmienne wirulotypy? Generalnie rozdział *Dyskusja* sprawia wiele kłopotów młodym adeptom nauki. Najczęściej pojawiającym się zarzutem jest powtarzanie wcześniejszych treści. Autorka recenzowanej pracy, generalnie uniknęła tego problemu. Tylko niewiele treści przedstawionych we *Wstępie*, głównie odnoszących się do budowy i funkcji fimbrii oraz systemu wychwytu żelaza, zostały następnie powtórzone w *Dyskusji*. Podsumowując tę część recenzji, stwierdzam, że Doktorantka otrzymała interesujące wyniki, które pozwalają na głębsze zrozumienie patogenności *E. coli*. W większości wyniki zostały krytycznie przedyskutowane w oparciu o bogate piśmiennictwo.

Ocena prezentacji rozprawy

Układ rozprawy doktorskiej jest generalnie zgodny z zasadami przyjętymi dla prac naukowych. Pewnym zaskoczeniem jest, jak wyżej wspomniałam, umieszczenie w rozdziale *Materiał i Metody* wyników analiz z MALDI-TOF. Podobnie, w mojej ocenie ryciny przedstawiające wyniki rozdziałów elektroforetycznych produktów PCR, powinny być umieszczone w rozdziale *Wyniki*. Praca jest dobrze przygotowana pod względem estetycznym i jest napisana poprawnym językiem. Niemniej przy tak obszernej rozprawie trudno jest uniknąć potknięć językowych bądź też skrótów myślowych. Niezgodności językowe zaznaczyłam w tekście dysertacji, a w tym miejscu mając na celu wywiązanie się z obowiązku recenzenta, zwracam uwagę na kilka sprawy. W spisie treści nie podano wyjaśnienia dla skrótu UEPC. We *Wstępie* nie znajduję odniesienia do Ryc. 1 i Ryc. 2. Na stronie 26 dysertacji, skróty sideroforów podano kursywą. Tymczasem skróty białek piszemy wielką literą i bez kursywy, a skróty genów piszemy małą literą i kursywą. Wydaje się, iż Autorka zna powyższą zasadę, gdyż w pozostałym tekście nie znaleziono w/w odstępstw. W pracy Doktorantka dość nietypowo umieszcza tytuły tabel pod tabelami. Natomiast jest generalnie przyjęte, iż tytuły tabel winny poprzedzać tabele, natomiast tytuły rycin umieszczamy pod rycinami. Nie jestem przekonana do sformowania „Usp jest nową genotoksyną”. Podejrzewam, że Autorka ma na myśli, iż „Usp jest nowo opisaną genotoksyną”. Tych kilka potknięć językowych bądź edytorskich nie stoi w sprzeczności z moją pozytywną oceną formy prezentacji rozprawy.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Sylwii Joanny Chmielewskiej przedstawia interesującą wartość naukową z zakresu wirulencji i lekooporności szczepów uropatogennych *E. coli*. Doktorantka dobrze zaplanowała i konsekwentnie zrealizowała badania oraz osiągnęła interesujące wyniki. Praca została starannie przygotowana, a drobne niedociągnięcia edytorskie mają charakter techniczny i nie mogą w żaden sposób rzutować na wysoką merytoryczną ocenę rozprawy. Wobec powyższego stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw Nr 154 poz. 1365), stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Z tego względu wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Sylwii Joanny Chmielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

