

Lublin, 24.08.2016 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Sylwii Joanny Chmielewskiej pt. „Analiza genetycznych markerów wirulencji i profili lekooporności patogennych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od pacjentów ambulatoryjnych z zakażeniem układu moczowego” wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem dr hab. n. med. Katarzyny Leszczyńskiej

Zakażenia układu moczowego (ZUM) zajmują, po grypie i infekcjach grypopodobnych, drugie co do częstości występowania schorzenie w populacji pozaszpitalnej, zwłaszcza wśród kobiet, stanowiąc około 10-20% zakażeń u pacjentów ambulatoryjnych. Głównym czynnikiem etiologicznym tych zakażeń są bakterie Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae*, przede wszystkim uropatogenne szczepy *Escherichia coli*. Szczepy te wykazują znaczne zróżnicowanie w zakresie czynników wirulencji, odpowiadających za adhezję bakterii do urothelium, zdolność ich przetrwania oraz inwazji układu moczowego; wiedza na temat częstości występowania poszczególnych czynników wirulencji pozwala na zrozumienie złożonych mechanizmów patogenyzy ZUM. Ponadto, istotnym problemem jest narastająca oporność uropatogennych szczepów *E. coli* na antybiotyki i chemioterapeutyki, powszechnie stosowane w leczeniu ZUM, co jest ważne zwłaszcza z punktu widzenia aktualizacji wytycznych terapii empirycznej tych zakażeń u pacjentów ambulatoryjnych.

Celem pracy doktorskiej Pani mgr Sylwii Chmielewskiej była wielostronna charakterystyka populacji uropatogennych szczepów *E. coli* izolowanych z przypadków znamiennej bakteriurii u pacjentów ambulatoryjnych z rozpoznaniem lub podejrzeniem ZUM, obejmująca ocenę przynależności izolatów bakteryjnych do grup filogenetycznych, określenie profili ich lekooporności z uwzględnieniem występowania najważniejszych mechanizmów oporności na antybiotyki beta-laktamowe, ocenę częstości występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji. Ponadto, istotne było dokonanie analizy zależności pomiędzy wirulotypem a profilem lekooporności badanych izolatów.

Oceniając pracę pod względem formalnym, należy zaznaczyć, że liczy ona 181 stron oraz składa się z rozdziałów typowych dla rozpraw doktorskich o charakterze eksperymentalnym takich, jak Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Piśmiennictwo. Główne rozdziały pracy poprzedzono Wykazem nazw i skrótów. Należy zwrócić uwagę, że ten Wykaz został nadmiernie rozbudowany do 7 stron; powinny w nim pojawić się tylko najważniejsze nazwy i skróty, najczęściej używane w tekście. Ponadto, w pracy zamieszczono Wykaz tabel oraz Wykaz rycin. Piśmiennictwo liczy 177 odpowiednio dobranych pozycji, w tym prawie połowę publikacji z ostatnich pięciu lat.

Wstęp pracy zawiera charakterystykę *E. coli*, z uwzględnieniem szczepów jelitowych i pozajelitowych, w szczególności szczepów uropatogennych i ich najważniejszych czynników patogenności. We Wstępie przedstawiono problem biofilmu bakteryjnego, w tym również w aspekcie ZUM, klasyfikację i etiologię tych zakażeń oraz ich leczenie. Wstęp świadczy o ugruntowanej wiedzy Doktorantki w tematyce związanej z rozprawą doktorską. Warto też zwrócić uwagę, że Doktorantka jest pierwszym autorem bardzo wartościowej pracy poglądowej dotyczącej znaczenia uropatogennych szczepów *E. coli* w etiopatogenezie ZUM w świetle najnowszych badań, która ukazała się w bieżącym roku w Postęпах Mikrobiologii, prestiżowym czasopiśmie wydawanym przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów.

W rozdziale Materiał i metody Doktorantka opisała szczegółowo pochodzenie i pobieranie moczu od pacjentów ambulatoryjnych – dzieci i dorosłych z województwa podlaskiego z rozpoznaniem lub podejrzeniem ZUM. Gdzie były wykonywane te badania? Czy pacjenci zostali poinformowani o udziale w badaniach? Czy odpowiednia Komisja Bioetyczna wyraziła zgodę na przeprowadzenie tych badań? Materiał do badań stanowiło 113 szczepów *E. coli* wyizolowanych w monokulturze z przypadków znamiennej bakteriiurii ocenianej metodą Hoepricha. Izolację i identyfikację szczepów bakteryjnych wykonywano w oparciu o klasyczne metody diagnostyczne, jak również stosując metodę profilu białkowego (tzw. białkowego odcisku palca) przy użyciu nowoczesnej techniki MALDI-TOF. Przyjmuje się, że jedna kolonia odpowiada jednej jednostce tworzącej kolonie, a nie jednej komórce. Oczywiście, w przypadku bakterii Gram-ujemnych, w tym *E. coli* zazwyczaj odpowiada jednej komórce. Ocenę wrażliwości badanych szczepów *E. coli* na antybiotyki i chemioterapeutyki wykonywano metodą dyfuzyjno-krażkową. Dobrze byłoby jednak określić wartości najmniejszego stężenia hamującego (MIC) dla badanych leków. Ponadto, opisano fenotypowe metody wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki beta-laktamowe jak,

wytwarzanie beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), cefalosporynaz AmpC oraz karbapenemaz. W rozdziale tym opisano również metodę izolacji DNA oraz primery i warunki reakcji PCR (multiplex PCR) stosowane do oceny przynależności badanych szczepów *E. coli* do grup filogenetycznych oraz do wykrywania wybranych genów wirulencji; opisano też elektroforetyczną metodę detekcji produktów reakcji PCR. Zdolność badanych szczepów *E. coli* do tworzenia biofilmu oceniano stosując mikroskop konfokalny – bakterie namnażano na szkiełkach podstawowych, wybarwiając biofilm za pomocą TTC. Do analizy uzyskanych wyników zastosowano odpowiednie metody statystyczne. Przedstawiony opis zastosowanych metod badawczych świadczy o ugruntowanej wiedzy Doktorantki w zakresie metodyki badań przeprowadzonych w toku pracy doktorskiej.

W rozdziale Wyniki Doktorantka opisała uzyskane w toku pracy następujące dane eksperymentalne: (i) częstość izolacji uropatogenów, w tym *E. coli*, uwzględniając wiek i płeć pacjentów, (ii) ocenę wrażliwości badanych szczepów *E. coli* na antybiotyki i chemioterapeutyki wraz z określeniem profili lekooporności (iii) przynależność filogenetyczną badanych szczepów *E. coli*, (iv) częstość występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji u badanych szczepów *E. coli*, w tym czynniki odpowiedzialne za adhezję, transport żelaza, toksyczność i inwazyjność, wraz z określeniem zespołu genów, tzw. wirulotypu, (v) analizę korelacji pomiędzy profilem lekooporności a przynależnością filogenetyczną badanych szczepów *E. coli* oraz występowaniem poszczególnych genów odpowiedzialnych za ich wirulencję. Przedstawione wyniki świadczą o dobrym zaplanowaniu poszczególnych eksperymentów, stanowiących spójną i logiczną całość. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci tabel i rycin. Tytuły tabel zazwyczaj umieszcza się nad tabelami. Bardziej czytelne byłoby przedstawienie tabel i rycin związanych z konkretnym problemem w kontekście omawianych wyników, a nie ich grupowanie pod względem formy prezentacji wyników.

Rozdział Dyskusja stanowi wnikliwą i wszechstronną analizę wyników uzyskanych przez Doktorantkę w toku pracy w konfrontacji z wynikami innych autorów z ośrodków badawczych w kraju i zagranicą. Ważne jest odniesienie uzyskanych danych do wyników projektu ARESC (Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey in Cystitis) – wieloośrodkowego, międzynarodowego, prospektywnego badania epidemiologicznego, realizowanego w latach 2003-2006 wśród kobiet z niepowikłanym zakażeniem dolnych dróg moczowych, w którym brał również udział promotor niniejszej rozprawy – dr hab. Katarzyna Leszczyńska. Badania epidemiologiczne tego typu mają istotny wymiar aplikacyjny,

zwłaszcza w kontekście rekomendowanej terapii empirycznej. Jest to ważne w świetle narastającej lekooporności bakterii, w tym również uropatogennych szczepów *E. coli*, zmieniającej się na przestrzeni lat oraz w zależności od regionu geograficznej i badanej populacji. W przypadku antybiotyków beta-laktamowych, monitorowanie lekooporności uropatogenów wymaga również określenia mechanizmu oporności. Doktorantka zwraca uwagę, że istotny problem wśród uropatogennych szczepów *E. coli* mogą stanowić szczepy ESBL-dodatnie, a realne zagrożenie w aspekcie skuteczności antybiotyko- i chemioterapii stanowią szczepy klasyfikowane jako MDR. Szczególny problem wśród uropatogenów stanowią szczepy odporne na beta-laktamy i fluorochinolony. Ważną częścią Dyskusji, zasługującą na szczególną uwagę jest analiza korelacji pomiędzy występowaniem zespołów genów wirulencji uropatogennych szczepów *E. coli*, a tym samym stopniem ich wirulencji w zależności od ich profili lekooporności i przynależności do grup filogenetycznych.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła logiczne wnioski, wskazujące, że problem zakażeń układu moczowego u pacjentów ambulatoryjnych w aspekcie etiologii tych zakażeń, wirulencji uropatogennych szczepów *E. coli* i ich lekooporności jest aktualny, złożony i wymaga ciągłego monitorowania.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne i wartościowe rozwiązanie problemu badawczego, jakim jest ocena wirulencji uropatogennych szczepów *E. coli* izolowanych od pacjentów ambulatoryjnych w aspekcie przynależności filogenetycznej i lekooporności tych bakterii. Pewne niedociągnięcia zauważone w pracy, głównie o charakterze redakcyjnym, nie umniejszają jej wartości i mogą być skorygowane podczas przygotowywania pracy do druku. Praca ma ważny aspekt poznawczy i praktyczny. Spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim pod względem merytorycznym i formalnym. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Joanny Chmielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej

prof. dr hab. Anna Malm