Prof. dr hab. Wanda Małek
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19
20-033 Lublin
E-mail: wanda.malek@poczta.umcs.lublin.pl

Lublin, 10.04.2017r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR ANNY SIEŃKO PT. „GENETYCZNE PODSTAWY LEKOOPORNOŚCI I WIRULENCJI KLINICZNYCH SZCZEPÓW *ENTEROCOCCUS FAECALIS I ENTEROCOCCUS FAECIUM*"

Rozprawa doktorska mgr Anny Sieńko jest mocno osadzona w tematyce badań Pani prof. dr hab. Elżbiety Tryniszewskiej, kierownika Zakładu Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i promotora ocenianej rozprawy. Badaniom prowadzonym pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Elżbiety Tryniszewskiej można przypisać co najmniej dwie wyróżniające się cechy, tj. wieloletnie zainteresowanie narastającą opornością bakterii na antybiotyki i niesłychanie solidną i konsekwentną metodologią badawczą.

Oceniana praca doktorska, wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Elżbiety Tryniszewskiej jest dziełem obszernym i ważnym. Badania mgr Anny Sieńko, przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej, dotyczą narastającej oporności na antybiotyki wśród szczepów *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* i wskazują na konieczność ciągłego monitorowania lekooporności tych bakterii, ich wirulencji, pokrewieństwa i rozprzestrzeniania się w oparciu o metody fenotypowe i molekularne związane z analizą genów determinujących powyższe cechy.

Narastająca i szybko rozprzestrzeniająca się oporność bakterii na antybiotyki, w tym wielolekooporność występująca głównie w środowisku szpitalnym, to jeden z ważniejszych problemów zdrowia publicznego na świecie. Konsekwencją tego zjawiska jest ograniczenie skuteczności leczenia infekcji, a więc i zwiększona zachorowalność oraz śmiertelność zwłaszcza wśród osób z deficytami układu immunologicznego. Z powyższych względów, każde nowe osiągnięcie naukowe w kierunku lepszego poznania mechanizmów lekooporności, pokrewieństwa genetycznego, a co za tym idzie dróg rozprzestrzeniania się mikroorganizmów patogennych są ważne nie tylko ze względów naukowych, ale i potencjalnie praktycznych, tj. w terapii chorób infekcyjnych.

Z powyższych względów, problem badawczy podjęty przez mgr Annę Sieńko w rozprawie doktorskiej uważam za merytorycznie istotny, a wyniki uzyskane w trakcie wykonywania pracy doktorskiej niewątpliwie wnoszą do nauki światowej nowe informacje i wpływają na jej rozwój.

Rozprawa napisana jest według tradycyjnego układu prac naukowych z dziedziny nauk biologicznych. Praca liczy 224 strony, opatrzona jest 29 tabelami, 47 rycinami, wykazem skrótów wykorzystanych w rozprawie oraz informacją o źródłach finansowania badań. Praca doktorska mgr Anny Sieńko podzielona jest na rozdziały zatytułowane: Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody,

Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Summary, Piśmiennictwo i Finansowanie Badań. W różnych miejscach pracy doktorskiej mgr Anna Sieńko powołuje się na 368 pozycji literatury głównie z ostatnich lat co potwierdza aktualność problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Oceniana rozprawa jest starannie przygotowana i napisana jest poprawnym językiem naukowym (drobne potknięcia w tym względzie wymienię w dalszej części recenzji).

W obszernym „Wstępie", liczącym 46 stron, Doktorantka przedstawiła: taksonomię i historie badań taksonomicznych bakterii rodzaju *Enterococcus*, ich morfologię i cechy biochemiczne zobrazowane na rycinach i w tabeli, miejsca ich bytowania, zakażenia przez nie wywołane, opisała czynniki wirulencji, mechanizmy oporności na antybiotyki i wskazała na konieczność monitorowania lekowrażliwości i wirulencji bakterii rodzaju *Enterococcus* w szpitalu i na poziomie globalnym. Rozdział ten opracowany jest ciekawie. Wskazuje on, że mgr Anna Sieńko bardzo dobrze zna zagadnienia związane z tematem pracy doktorskiej. Informacja zawarta we „Wstępie" jest również dobrym uzasadnieniem podjętych zadań badawczych , w pełni zrealizowanych przez mgr Annę Sieńko w trakcie wykonywania pracy doktorskiej. Moje drobne uwagi, które absolutnie nie obniżają wartości merytorycznej tej części pracy dotyczą następujących stwierdzeń:

- Doktorantka np. pisze „*Enterococcus* syntetyzują D-mleczan", wg mnie powinno być bakterie rodzaju *Enterococcus* syntetyzują D-mleczan;
- Stwierdzenia „zdolność do rozkładu argininy" str. 20, czy w tym wypadku arginina miała służyć jako źródło węgla (tak przypuszczam) czy też azotu;
- Zdolności bakterii rodzaju *Enterococcus* do wytwarzania zewnątrzkomórkowych nadtlenków i ich wpływu na wzmożony wzrost, czy tutaj chodzi o eliminację konkurentów o pokarm???, proszę o kilka słów wyjaśnienia;
- Określenia „Feromon aktywuje syntezę wielu genów", str. 34;
- Przyrostków w nazwach antybiotyków, czy piszemy gentamicyna czy też gentamycyna, podobnie, netylmicina czy też netylmycina;
- Podjednostka 12S rRNA str. 46.

Cel pracy doktorskiej został sformułowany jasno i uważam go za poważne wyzwanie naukowe. Doktorantka przedstawiła również cztery szczegółowe zadania badawcze. Podjęcie się identyfikacji genów determinujących oporność bakterii na badane antybiotyki i genów kodujących czynniki wirulencji oraz analiza pokrewieństwa genetycznego klinicznych szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* były ważnymi zadaniami nie tylko poznawczymi, ale i potencjalnie praktycznymi.

Kolejny rozdział obejmuje opisy materiałów i metod zastosowanych w pracy. Autorka scharakteryzowała materiał badawczy, którym były szczepy *E. faecalis* i *E. faecium* i przedstawiła ich pochodzenie. Opisała fenotypowe metody wykorzystane w charakterystyce tych szczepów, tj.: testy biochemiczne, analizę lekowrażliwości, zdolności hemolitycznych, zdolności do tworzenia biofilmów, test detekcji β-laktamaz oraz metody molekularne takie jak: izolacja DNA chromosomalnego i

plazmidowego, analiza ilościowa i jakościową DNA, amplifikacja badanych genów, elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR, analiza pokrewieństwa badanych szczepów w oparciu o połączone sekwencje siedmiu genów metabolizmu podstawowego metodą MLST. Przedstawiła w jaki sposób określała typy sekwencyjne badanych izolatów i kompleksy klonalne, a na końcu Doktorantka opisała metody i testy statystyczne wykorzystane w analizie wyników. Wszystko to zostało także dobrze zobrazowane na rycinach i tabelach.

Kończąc ocenę tego rozdziału stwierdzam, że zakres metod, a więc i badań był stosowny do założonych celów, i że techniki badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej zostały opisane dokładnie, co niewątpliwie ułatwia interpretację wyników.

Rezultaty pracy mgr Anna Sieńko opisała w sposób jasny, szczegółowy oraz profesjonalny. W pierwszym etapie badań Doktorantka określiła wrażliwość badanych szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* na 13 antybiotyków, o różnym mechanizmie działania, wykorzystując E-test. Na potrzeby analizy statystycznej Doktorantka dokonała transformacji logarytmicznej wartości MIC dla poszczególnych antybiotyków i wyniki przedstawiła w formie wykresów ramka-wąsy. Antybiotykami o relatywnie najwyższej aktywności hamowania wzrostu izolatów *E. faecalis* i *E. faecium* był linezolid i tigecyklina, które wykazały minimalnie większa aktywność wobec szczepów *E. faecium*. Zgodnie z obowiązującymi kryteriami wg EUCAST, w oparciu o wartości MIC, szczepy obu badanych gatunków skategoryzowano jako: wrażliwe, (S), średniowrażliwe (I) i oporne (R).

W kolejnej części badań Doktorantka oceniła zdolność badanych baterii do syntezy β-laktamazy, hemolizyny i produkcji biofilmu. Żaden z izolatów nie produkował enzymów z grupy β-laktamaz. Zdecydowana większość szczepów *E. faecalis* (91.2%) nie wykazała zdolności hemolitycznych podczas gdy zdolność do α i β-hemolizy stwierdzono, odpowiednio u 86.7% i 3.4% szczepów *E. faecium*. Ważnym czynnikiem chorobotwórczości bakterii jest ich zdolność tworzenia biofilmu. W badanej populacji *E. faecium* potencjalna zdolność tworzenia biofilmu została udokumentowana dla 86.7% szczepów i tylko dla 11.1% szczepów *E. faecalis*.

Za bardzo istotny element pracy doktorskiej mgr Anny Sieńko uważam identyfikację genów kodujących enzymy modyfikujące aminoglikozydy, genów determinujących oporność na antybiotyki glikopeptydowe i genów kodujących czynniki wirulencji w tym pięć genów operonu cytolizyny. W przypadku dwóch genów determinujących oporność wysokiego stopnia na gentamycynę: *aph(3')-IIIa* i *aac(6')-Ie-aph(2'')-IUa* oraz genu *ant(6'-Ia)* kodującego oporność wysokiego stopnia na streptomycynę stwierdzono istotnie statystycznie częstsze ich występowanie w szczepach *E. faecium* niż w szczepach *E. faecalis*. Żaden szczep *E. faecium* nie posiadał genów cytolizyny, które zidentyfikowano u 53.3% szczepów *E. faecalis*. Geny kodujące enterokokowe białko powierzchniowe Esp, białko wiążące kolagen Ace i hialuronidazę Hyl stwierdzono istotnie statystycznie częściej wśród szczepów *E. faecium* niż u *E. faecalis* podczas gdy geny kodujące substancję agregującą As, żelatynazę GelE i adhezynę wsierdzia EfaA wykazano istotnie statystycznie częściej u szczepów *E. faecalis* niż u *E. faecium*.

Za bardzo ważny wątek pracy doktorskiej mgr Anny Sieńko uważam analizę pokrewieństwa genetycznego szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* metodą MLST. Badania te Doktorantka przeprowadziła w oparciu o połączone sekwencje siedmiu genów metabolizmu podstawowego. Wyniki tych badań, zaprezentowane w formie dendrogramu, wyraźnie wskazują, że szczepy *E. faecalis* z zakażeń charakteryzują się największym zróżnicowaniem typów sekwencyjnych, tj. wyróżniono wśród nich 13 różnych ST należących do 11 kompleksów klonalnych (CC) podczas gdy w populacji *E. faecalis* z kolonizacji wyróżniono tylko cztery ST należące do trzech CC, a wśród szczepów *E. faecium* z zakażeń i kolonizacji odpowiednio, pięć i trzy typy sekwencyjne, które zostały sklasyfikowane do jednego tego samego kompleksu klonalnego CC17 co wskazuje na klonalne rozprzestrzenianie się tych szczepów wśród pacjentów Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego i Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego.

Znając profile alleliczne badanych izolatów, ustalone metodą MLST, Doktorantka umiejscowiła je w obrębie całej populacji *E. faecalis* i *E. faecium*, których dane są dostępne w międzynarodowej bazie PubMLST. Przedstawione schematy, obrazujące strukturę całej populacji *E. faecalis*, pokazują duże rozproszenie typów sekwencyjnych, a więc ich małe pokrewieństwo. Schemat populacji *E. faecium* z klonalnego kompleksu CC17 potwierdza wysoki stopień pokrewieństwa między badanymi szczepami tego gatunku i ich pochodzenie od wspólnego przodka o typie sekwencyjnym ST17.

Reasumując ocenę rozdziału „Wyniki" chcę podkreślić, że Doktorantka przejrzyście opisała rezultaty swoich badań oraz jasno i profesjonalnie je zaprezentowała w tabelach i na rycinach. Część wyników przedstawiła w rozdziale „Materiały i Metody", między innymi bardzo ładny rozdział elektroforetyczny produktów reakcji amplifikacji genu *ddl E. faecalis* i *E. faecium* (Rycina 8) co wskazuje, że mgr Anna Sieńko dobrze opanowała procedurę izolacji DNA i reakcji PCR. Stwierdzam również, że Doktorantka bardzo dobrze zna i wykorzystuje programy komputerowe do analizy sekwencji DNA. Mam dwa pytania odnoszące się do ryciny 42 i 43. Na jakiej podstawie szczepowi *E. faecalis* Nr 2 (Rycina 42) przydzielono odrębny typ sekwencyjny, skoro, jak wynika to z filogramu, połączone sekwencje jego siedmiu genów są identyczne z analogicznymi sekwencjami szczepów oznaczonych jako 1, 4, 25, 69, które zostały sklasyfikowane do innego typu sekwencyjnego ST16. Drugie moje pytanie dotyczy ryciny 43. Jak można wyjaśnić fakt, że szczepy *E. faecium* 37, 48, 59 z zakażeń, o tak odmiennym typie sekwencyjnym względem pozostałych izolatów tego gatunku pochodzących z zakażeń przydzielono do jednego wspólnego kompleksu klonalnego CC17.

Z zainteresowaniem przeczytałam również „Dyskusję" opracowaną w oparciu o wyniki badań własnych i dostępne dane, głównie z najnowszej literatury przedmiotu. Przedstawiona dyskusja wskazuje na duże znaczenie podjętego problemu badawczego, zwłaszcza w aspekcie poznawczym. Chcę podkreślić dużą staranność jaką wykazała Doktorantka w przedstawieniu i dyskusji wyników oraz w doborze cytowanej literatury. W rozdziale tym mgr Anna Sieńko w sposób dojrzały przeanalizowała i dokonała syntezy uzyskanych wyników.

W kolejnym rozdziale mgr Anna Sieńko przedstawiła dziewięć poprawnie sformułowanych wniosków i krótką ich interpretację.

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim zostało syntetycznie przygotowane i obejmuje wszystkie elementy niezbędne w tego typu opracowaniach.

Rozprawę doktorską mgr Anny Sieńko kończy starannie dobrany wykaz piśmiennictwa, ściśle związany z tematyką prowadzonych przez Autorkę badań i wykaz źródeł ich finansowania. Chcę podkreślić, że w spisie literatury Doktorantka zamieściła wiele prac polskich autorów.

Wniosek końcowy

Uważam, że Pani mgr Anna Sieńko przedstawiła bardzo dobrą rozprawę doktorską, w której uzyskała istotne naukowo wyniki. Doktorantka niewątpliwie potrafi samodzielnie zaplanować doświadczenia naukowe, przeprowadzić odpowiednie badania, wyciągnąć poprawne wnioski i opisać wyniki swoich prac w formie rozprawy naukowej. W świetle powyższych danych uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska, wykonana pod kierownictwem Pani prof. dr hab. Elżbiety Tryniszewskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Anny Sieńko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto ze względu na wysoki poziom merytoryczny ocenianej rozprawy, duże znaczenie poznawcze problemu badawczego oraz staranne i przejrzyste opracowanie uzyskanych wyników, stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UM w Białymstoku o stosowne wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

Małek

prof. dr hab. Wanda Małek