

Lublin, dn. 30.05.2017 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Sieńko pt. „Genetyczne podstawy lekooporności i wirulencji klinicznych szczepów *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*” wykonanej w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Elżbiety Anny Tryniszewskiej

Ziarniaki Gram-dodatnie z rodzaju *Enterococcus*, zwane enterokokami, należą do drobnoustrojów oportunistycznych, stanowiących ważne patogeny szpitalne. Z klinicznego punktu widzenia istotne znaczenie mają dwa gatunki enterokoków – *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* ze względu na ich powszechne występowanie oraz zdolność do nabywania oporności na wiele antybiotyków stosowanych w praktyce szpitalnej. Szczepy enterokoków odporne na wankomycynę lub odporne na oksazolidynony należą do tzw. patogenów alarmowych, które są przyczyną ciężkich i trudnych do leczenia infekcji.

Oceniana praca doktorska Pani mgr Anny Sieńko jest kolejną pracą zrealizowaną w zespole badawczym kierowanym przez Panią prof. dr hab. Elżbietę A. Tryniszewską, obejmującą szeroko zakrojone zagadnienia z zakresu epidemiologii molekularnej w aspekcie genetycznych podstaw lekooporności bakteryjnych patogenów występujących w Polsce północno-wschodniej jako ważne czynniki etiologiczne zakażeń szpitalnych. Stanowi ona ważne ogniwo w opracowaniu aktualnej mapy epidemiologicznej regionu w tym zakresie.

Celem pracy Pani mgr Anny Sieńko była analiza występowania na poziomie fenotypu i genotypu wybranych mechanizmów lekooporności wśród klinicznych szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* izolowanych od pacjentów hospitalizowanych w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym oraz Uniwersyteckim Dziecięcym Szpitalu Klinicznym w Białymstoku. Doktorantka postawiła sobie również za cel analizy porównawcze w zakresie występowania genów lekooporności w zależności od gatunku oraz statusu szczepu (zakażenie vs kolonizacja). Ponadto, Doktorantka oceniała wśród badanych szczepów zdolność do hemolizy

i tworzenia biofilmu w aspekcie ich wirulencji. Cel został jasno sformułowany, odzwierciedlając zadania badacze zaplanowane do realizacji w toku pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym i zawiera następujące rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Summary i Piśmiennictwo. Zachowane zostały odpowiednie proporcje pomiędzy najważniejszymi rozdziałami, tj. Wstępem oraz badaniami własnymi Doktorantki wraz z ich omówieniem. Ponadto, w rozprawie zawarta jest informacja, że badania te zostały zrealizowane w ramach 3 projektów realizowanych w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, w tym dwóch finansowanych z dotacji projakościowej Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego oraz jednego z dotacji statutowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku; kierownikiem tych projektów była Doktorantka. Oprócz głównych rozdziałów, rozprawa zawiera Wykazy tabel, rycin oraz skrótów. Praca liczy 224 strony i zawiera 29 tabel oraz 47 rycin. Piśmiennictwo obejmuje 368 pozycji, w tym około 140 pozycji z ostatnich pięciu lat. Uważam, że liczbę pozycji literaturowych można by zredukować do najważniejszych publikacji w tej tematyce, cytując kilka istotnych pozycji o znaczeniu historycznym oraz te najnowsze.

Oceniając rozprawę doktorską pod względem merytorycznym, należy zaznaczyć, że Doktorantka we Wstępie wykazała się wszechstronną znajomością problemów dotyczących zakażeń wywoływanych przez enterokoki, zwłaszcza *E. faecalis* i *E. faecium*, w tym czynników wirulencji tych drobnoustrojów, naturalnych i nabytych mechanizmów lekooporności oraz znaczenia zakażeń enterokokowych w aspekcie ich epidemiologii, profilaktyki i leczenia u pacjentów hospitalizowanych, szczególnie w przypadku zakażeń, których czynnikami etiologicznymi są szczepy wielooporne (MDR). Doktorantka podkreśliła, że z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia istotne znaczenie mają wankomycynooporne szczepy enterokoków (VRE), należące głównie do *E. faecium*, ze względu na ich bezobjawowe nosicielstwo, klonalne rozprzestrzenianie się oraz możliwość wywołania epidemii zakażeń szpitalnych i ograniczone opcje terapeutyczne. Szczepy te stanowią szczególne zagrożenie dla pacjentów hematologicznych i onkologicznych, w tym pacjentów pediatrycznych.

W rozdziale Materiał i metody Doktorantka zaznaczyła, że badania prowadzono na losowo wybranych szczepach *E. faecalis* (45 szczepów) i *E. faecium* (30 szczepów), pochodzących z kolekcji Zakładu Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej

wyzolowanych z materiałów klinicznych od pacjentów hospitalizowanych w latach 2012-2014 w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym oraz Uniwersyteckim Dziecięcym Szpitalu Klinicznym w Białymstoku. Szczepy te podzielono na dwie grupy - izolowane z przypadków zakażeń oraz kolonizujące górne drogi oddechowe, przewód pokarmowy czy pochwę. W toku pracy stosowano zarówno metody fenotypowe, jak i metody z wykorzystaniem technik biologii molekularnej. W pierwszym etapie określano lekowrażliwość badanych szczepów zgodnie z zaleceniami EUCAST (European Committee on Antimicrobial Sensitivity Testing), oznaczając najmniejsze stężenie hamujące (MIC) metodą dyfuzji antybiotyku z utworzeniem gradientu stężeń w podłożu, co pozwoliło m.in. na zdefiniowanie fenotypów oporności na antybiotyki aminoglikozydowe oraz wankomycynę. Wytwarzanie beta-laktamaz wykrywano przy użyciu testu cefinazowego. Wykrywano właściwości hemolityczne enterokoków. Zdolność do tworzenia biofilmu wykrywano stosując metodę probówkową Christensena oraz metodę posiewu na podłoże z czerwieni Kongo. Czy Doktorantka próbowała zastosować metodę z fioletem krystalicznym z wykorzystaniem 96-dołkowych mikropłytek titracyjnych? Metoda ta pozwala na ilościową ocenę zdolności tworzenia biofilmu przez drobnoustroje. Metody biologii molekularnej stosowane w drugim etapie pracy opisano szczegółowo, uwzględniając izolację genomowego i plazmidowego DNA, warunki amplifikacji poszczególnych genów oraz detekcję produktów PCR. Sekwencjonowanie produktów PCR wykonywano w firmie Genomed S.A. Doktorantka wykrywała wybrane geny warunkujące oporność na wankomycynę, geny kodujące enzymy modyfikujące aminoglikozydy oraz geny determinujące czynniki wirulencji. Określanie pokrewieństwa badanych szczepów wraz z oceną ich klonalnego rozprzestrzeniania się wykonywano stosując metodę MLST (Multilocus Sequence Typing) w oparciu o sekwencjonowanie siedmiu genów metabolizmu podstawowego. Odpowiednia interpretacja uzyskanych wyników przez Doktorantkę była możliwa dzięki opanowaniu przez nią trudnego warsztatu bioinformatycznego, np. aplikacje eBURST oraz umiejętnego korzystania z ogólnodostępnych, międzynarodowych baz danych, np. PubMLST, co zasługuje na szczególne podkreślenie. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono, wykorzystując program STATA 13.1. Dlaczego Doktorantka zastosowała rozbudowane statystyki opisowe dla przedstawienia wyników dotyczących lekowrażliwości badanych enterokoków? Jak przedstawiają się te dane w odniesieniu do danych literaturowych?

Wyniki uzyskane w toku pracy Doktorantka przedstawiła w postaci 10 tabel i 36 rycin, opisując je w sposób systematyczny. Doktorantka opisała: (i) pochodzenie badanych

szczepów (zakażenie vs kolonizacja, rodzaj materiału klinicznego pobranego od pacjenta, oddziały szpitalne), (ii) wrażliwość enterokoków na beta-laktamy, aminoglikozydy, glikopeptydy, linezolid, tigecyklinę, trimetoprim-sulfametoksazol oraz chinuprystynę-dalfoprystynę, (iii) częstość występowania zdolności do hemolizy i tworzenia biofilmu, (iv) występowanie badanych genów w DNA genomowym i plazmidowym, (v) porównanie lekowrażliwości, właściwości hemolitycznych, zdolności do tworzenia biofilmu oraz występowania badanych genów wśród szczepów izolowanych z przypadków zakażeń oraz szczepów „nosicielskich”, (vi) pokrewieństwo genetyczne enterokoków metodą MLST, umożliwiającą zdefiniowanie typów sekwencyjnych (ST) i kompleksów klonalnych (CC). Na szczególną uwagę zasługuje analiza struktury badanych szczepów *E. faecalis* (szczepy z zakażeń – 13 ST należące do 11 CC; szczepy z kolonizacji – 4 ST należące do 3 CC) i *E. faecium* (szczepy z zakażeń – 5 ST należących do 1 CC; szczepy z kolonizacji – 3 ST należące do 1 CC), pozwalająca na ich umiejscowienie w całej populacji szczepów należących do tych gatunków.

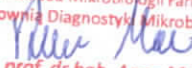
Rozdział Dyskusja stanowi wnikliwą i wszechstronną analizę wyników uzyskanych przez Doktorantkę w toku pracy w konfrontacji z wynikami innych autorów z ośrodków badawczych w kraju i zagranicą, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła logiczne wnioski, wskazujące, że problem lekooporności enterokoków, w tym *E. faecalis* i *E. faecium*, u pacjentów hospitalizowanych w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym oraz Uniwersyteckim Dziecięcym Szpitalu Klinicznym w Białymstoku jest aktualny i wymaga ciągłego monitorowania, zwłaszcza w aspekcie możliwości klonalnego rozprzestrzeniania się. Szczególne zagrożenie stwarza *E. faecium* ze względu na łatwość transmisji i ograniczone znacznie opcje terapeutyczne w porównaniu z *E. faecalis*. W przypadku *E. faecium* wszystkie szczepy należały do CC17 i wywodziły się od wspólnego przodka ST17. Należy zaznaczyć, że antybiotykami o najwyższej (100%) skuteczności *in vitro* okazały się linezolid i tigecyklina. Częstość występowania VRE wynosiła 4,4% w przypadku *E. faecalis* oraz 16,7% w przypadku *E. faecium*.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne i bardzo wartościowe rozwiązanie problemu badawczego, jakim jest monitorowanie zakresu, stopnia i rozprzestrzeniania się lekooporności enterokoków w Polsce północno-wschodniej na poziomie molekularnym. Ma to szczególne znaczenie w dobie narastającej oporności

patogenów szpitalnych na antybiotyki i chemioterapeutyki, zwłaszcza tzw. patogenów alarmowych. Pani mgr Anna Sieńko jest niewątpliwie ekspertem w tej dziedzinie. Pewne niedociągnięcia zauważone w pracy, głównie o charakterze redakcyjnym i błędów edytorskich, oraz komentarze zawarte w treści recenzji nie wpływają na ogólną, bardzo wysoką ocenę pracy i mogą być skorygowane podczas przygotowywania pracy do druku.

Recenzowana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Anny Sieńko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej i jej istotne znaczenie w aspekcie ogólnościowego problemu lekooporności enterokoków i konieczności wprowadzania skutecznych narzędzi monitorująco-kontrolujących, stawiam wniosek o wyróżnienie tej pracy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej

prof. dr hab. Anna Malm