

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Marty Książczyk

Pt” Określenie czynników wirulencji oraz analiza filogenetyczna pozajelitowych patogennych oraz komensalnych szczepów *Escherichia coli* izolowanych z różnych grup kregowców” której promotorem jest dr hab. Gabriela Bugla- Płoskońska prof. UWr z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego a promotorem pomocniczym dr n. wet Maciej Kuczkowski z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Pałeczki *Escherichia coli* są bakteriami powszechnie występującymi w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt a także w środowisku naturalnym: w glebie, wodzie, na roślinach. Większość tych bakterii jest niechorobotwórcza dla ludzi, a niektóre gatunki probiotyczne wykazują korzystne działanie na układ immunologiczny człowieka. Pałeczki *E. coli* posiadają niezwykle plastyczny genom, co oznacza, że często i z łatwością nabywają geny kodujące różne czynniki wirulencji. Wymiana genów między bakteriami, zachodząca zarówno w środowisku naturalnym jak i w organizmach ludzi i zwierząt umożliwia im adaptację do zmieniających się warunków bytowania. Niestety, proces ten przyczynia się również do okresowego pojawiania się nowych chorobotwórczych szczepów bakterii odpowiedzialnych za ciężkie zakażenia, czego przykładem może być szczep *E. coli* O104:H4, odpowiedzialny za epidemię w Niemczech w 2011 roku. Szczep ten był hybrydą trzech patotypów Shiga-toksynogennych, enteroagregacyjnych oraz pozajelitowych *E.coli*. Wymiana genów między bakteriami jest zjawiskiem naturalnym, zachodzącym w zbiornikach wodnych, glebie jak i w jelicie ludzi i zwierząt. Wzrost poziomu higieny w społeczeństwach krajów wysoko rozwiniętych z jednej strony znacząco ograniczył częstość występowania zakażeń przewodu pokarmowego przez niektóre patogeny np. pałeczki *Shigella*, z drugiej strony spowodował większą wrażliwość mieszkańców na okresowo pojawiające się nowe drobnoustroje chorobotwórcze. Dlatego bardzo ważne jest śledzenie dla celów epidemiologicznych jakie cechy wirulencji i lekooporności mogą przenosić szczepy na danym obszarze. Stąd też wybór tematu pracy uważam za zasadny i aktualny, zarówno w aspekcie poznawczym jak i aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska mgr Marty Książczyk jest bardzo obszerna i liczy 221 stron. Układ jest typowy dla tego rodzaju opracowań. Bardzo cennym dodatkiem jest podany na wstępie pracy, szczegółowo opracowany spis tabel, rycin, skrótów oraz spis publikacji naukowych prezentujących wyniki zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Obszerny wstęp, przedstawiony na 30 stronach, w oparciu o bogate piśmiennictwo jest dobrym wprowadzeniem do części doświadczalnej pracy.

W pierwszej części wstępu przedstawiony został aktualny stan wiedzy o komensalnych i patogennych szczepach *E. coli*. Autorka omawia czynniki wirulencji patotypów jelitowych *E. coli* występujących u ludzi, gadów i wywołujących kolibakteriozy u ptaków. W dalszej części zwraca uwagę na czynniki wirulencji pozajelitowych szczepów *E. coli* wywołujących zakażenia u ludzi i bydła. Ostatnia część poświęcona jest oporności szczepów na bakteriobójcze działanie surowicy i lekooporności oraz analizie pokrewieństwa filogenetycznego szczepów *E. coli*.

Głównym celem rozprawy było określenie czynników wirulencji oraz analiza filogenetyczna pozajelitowych patogennych oraz komensalnych szczepów *E. coli* izolowanych od różnych grup kręgowców. Cel pracy zredagowany jest jasno i konkretnie wypunktowany, wymienione cele szczegółowe informują bliżej o programowanych badaniach a podjęta tematyka jest aktualna i uzasadnia celowość przedstawionych badań.

Materiały i metody to część opracowania, która definiuje sposoby i warunki prowadzenia badań a szczegółowe opisy pozwalają na obiektywną ocenę prawidłowości użytych procedur.

Do badań wykorzystano 87 szczepów *E. coli* przynależnych do trzech grup: szczepy *E. coli* izolowane z kałomoczu zdrowych gadów, uropatogenne szczepy *E. coli* izolowane od pacjentów z infekcjami dróg moczowych i szczepy wywołujące infekcje pozajelitowe tzw kolibakteriozy u ptaków. Wyizolowane z materiału biologicznego szczepy poddano analizie morfologicznej, biochemicznej i genetycznej. W sposób rzeczowy i konkretny przedstawiono schematy doświadczeń, jasno i wyczerpująco opisano zarówno stosowane metody mikrobiologiczne jak i genetyczne. Ponadto patogenność szczepów sprawdzono na modelu larw barciaka większego a analizę filogenetyczną przeprowadzono z zastosowaniem czułych metod badawczych RA-PFGE i ERIC-PCR.

Wyniki badań, które przeprowadziła doktorantka przedstawione są w kolejności logicznie zaplanowanych etapów pracy. Są opisane oraz zobrazowane, 19 tabelami i 26 rycinami. Prowadzenie badań i ich dokumentacja nie budzą zastrzeżeń. Bardzo pomocne w śledzeniu wyników pracy były wnioski szczegółowe podsumowujące cykl badań.

Nie zgadzam się z 4 wnioskiem podsumowującym rozdział 5.1 i 5.2 cyt metody identyfikacji bakterii opierające się na cechach filogenetycznych nie powinny być używane jako wyłączne metody identyfikacji tylko jako dodatkowe analizy”. W rutynowej diagnostyce bakteriologicznej są to wystarczające metody pod warunkiem, że mają bardziej niż wykorzystaną w tej pracy rozbudowaną diagnostykę biochemiczną opatą często na 20-22 cechach biochemicznych oraz morfologii bakterii. Natomiast do badań epidemiologicznych czy dla przyspieszenia diagnostyki metody molekularne są bardziej precyzyjne w procedurze identyfikacji drobnoustrojów.

W dyskusji doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z doniesieniami z najnowszego piśmiennictwa co potwierdza cytowanie 85 pozycji z ostatnich pięciu lat. Uzasadnia celowość większości aspektów prowadzonych badań. W mojej opinii dyskusja, dotycząca poruszanych zagadnień została przeprowadzona interesująco. Bardzo ważną obserwacją było wykazanie, że niektóre szczepy APEC i UPEC mają bardzo podobne wzory genetyczne czyli wykazują bliski stopień pokrewieństwa filogenetycznego chociaż analiza z zastosowaniem metod RA-PFGE i ERIC-PCR wykazała ogromne zróżnicowanie pokrewieństwa filogenetycznego pomiędzy szczepami *E. coli* izolowanymi od ludzi, ptaków i gadów i nie zidentyfikowano dwóch takich samych profili restrykcyjnych.

Należy podkreślić, że innowacyjnym elementem pracy była analiza szczepów *E. coli* izolowanych od zdrowych gadów, ponieważ niewiele wiadomo o zwierzętach zmiennocieplnych jako rezerwuarze pałeczek i tak jak podkreśliła w podsumowaniu doktorantka wskazana jest kontynuacja badań mikrobiomu zwierząt należących do różnych grup systematycznych.

Doktorantka podsumowuje swoje badania w 8 punktach, które są prostą konsekwencją uzyskanych w badaniach wyników i odnoszą się do poszczególnych celów pracy.

Podsumowując uważam pracę za wartościową, prezentującą szeroki zakres badań zmierzających do naświetlenia podjętego tematu. Praca została wykonana rzetelnie i dobrze

udokumentowana. Autorka wykazała dobre przygotowanie merytoryczne, dojrzałość naukową w planowaniu, realizacji i analizie wyników badań. Uzyskane wyniki mają znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

Przedstawiam kilka uwag które należy traktować jako polemikę z autorem rozprawy, w niczym nie umniejszającej jej niewątpliwej wartości.

1. str 25 Zamiast stwierdzenia szczepy *E. coli* „najczęściej posiadają fimbrie” ... powinno być ... fimbrie typu I powszechnie występują u wszystkich szczepów *E. coli* co potwierdzono badaniami genetycznymi wykrywając gen *fim C* odpowiedzialny za syntezę fimbri typu I ryc. 5.12 u wszystkich szczepów.
2. str 26 Zbyt często i w nieodpowiedni sposób zastosowano słowo prewalencja. Prewalencja, w epidemiologii określa częstości występowania danej choroby w ściśle określonym okresie, niezależnie od czasu wystąpienia choroby, w przeliczeniu na 10 000 lub 100 000 osób. W skład mikrobioty jelit wchodzi głównie bakterie beztlenowe z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i one stanowią około 90% ogółu drobnoustrojów a nie *E.coli*.
3. str 28 błędne nazwy patotypów *E. coli* np. enterotokrwotoczne, enterotoinwazyjne enterokrwotoczne, enteroinwazyjne – literówka
4. tabela 2.1 Enteroinwazyjne szczepy *E. coli* (EIEC) są zdolne do inwazji i niszczenia komórek nabłonka okrężnicy, co najczęściej odpowiada za wodniste biegunki. U niewielu chorych zakażenie przyjmuje postać czerwonki z obecnością krwi i leukocytów w próbkach kału dlatego nie możemy określać objawów chorobowych wywołanych przez te szczepy jako czerwotka bakteryjna
5. str 49Szczepy *E. coli* wykazują oporność na teracyklinę..... raczej tetracyklinę
6. tabela 4.2 termin nie objawowe infekcje..... Bezobjawowe zakażenia
7. str 77 tytuł tabeli 4.6 liczne literówki i brak fragmentu tytułu
8. str 80 Jaką gęstość szczepów *E. coli* (OD) zastosowano do oznaczania wrażliwości na antybiotyki, ponieważ gęstość hodowli bakteryjnej ma istotny wpływ na wynik antybiogramu

9. W podsumowaniu wyników pracy zabrakło mi opinii doktorantki, którą z zastosowanych metod genetycznych poleca jako najbardziej czułą i swoistą do określenia czynników wirulencji szczepów i analizy filogenetycznej.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pt Określenie czynników wirulencji oraz analiza filogenetyczna pozajelitowych patogennych oraz komensalnych szczepów *Escherichia coli* izolowanych z różnych grup kręgowców spełnia wymogi stawiane tego typu opracowaniom na stopień naukowy doktora.

Przekładam Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Marty Książczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie i nagrodzenie rozprawy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
kierownik
Gosińskiak
prof. dr hab. Grażyna Gościńskiak