

Dr hab. Jarosław Bystróż, prof. nadzw. UPWr
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Książczyk

**pt. „Określenie czynników wirulencji oraz analiza filogenetyczna
pozajelitowych patogennych oraz komensalnych szczepów *Escherichia coli*
izolowanych z różnych kręgowców”**

wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii
Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem promotora dr hab. Bugli-Płoskońskiej prof. UWr.
oraz promotora pomocniczego dr n. wet. Macieja Kuczkowskiego

Podstawę prawną wykonania recenzji rozprawy doktorskiej stanowi Uchwała Nr 215/2017 Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 23 listopada 2017 roku.

Pałeczki *E. coli* odznaczają się dużą różnorodnością i szerokim spektrum organizmów, które mogą zasiedlać, jednak ich podstawowym rezerwuarem są zwierzęta stałocieplne. Do gatunku *E. coli* należą zarówno szczepy komensalne jak i patogenne wywołujące u ludzi i zwierząt infekcje jelitowe oraz pozajelitowe. W krajach Unii Europejskiej bakterie te są istotnym czynnikiem infekcji jelitowych ludzi. Według danych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) pałeczki STEC, należące do grupy patogennych, jelitowych *E. coli*, w 2016 r. klasyfikowane były na 4 miejscu wśród drobnoustrojów zoonotycznych wywołujących infekcje ludzi. Jednym z ich źródeł jest żywność pochodzenia zwierzęcego, głównie mięso przeżuwaczy. Patogenne, jelitowe *E. coli* stanowią obecnie lepiej poznaną grupę niż szczepy patogenne pozajelitowe (ExPEC). Wiadomo jednak, że pozajelitowe patogenne *E. coli* również mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt, gdyż odpowiedzialne są między innymi za infekcje układu moczowego oraz opon mózgowo-rdzeniowych u ludzi, a u zwierząt za kolibakteriozy drobiu czy zapalenie gruczołu mlekowego krów. Szczególne znaczenie z punktu widzenia bezpieczeństwa zdrowia ludzi stanowią szczepy należące do typu ST131 obejmującego wielolekooporne, globalnie rozpowszechnione, patogenne, pozajelitowe *E. coli* odpowiedzialne głównie za zakażenia układu moczowego. Pałeczki należące do tego typu klonalnego posiadają wysoką zdolność

adaptacji do różnorodnych warunków środowiskowych. Są one zaliczane są do grupy tzw. „new-emerging pathogens”, a za jedną z dróg ich rozprzestrzeniania uważa się żywność, głównie mięso drobiowe i jego przetwory. Jednym z elementów ocenianej pracy doktorskiej, poza oceną obecności czynników wirulencji czy wrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe jest także oznaczenie genotypów ST szczepów pozajelitowych wyisobnionych od ludzi i drobiu, co stanowi istotny element oceny zagrożenia zdrowia publicznego.

Wśród scharakteryzowanych do tej pory populacji *E. coli* najslabiej poznaną stanowią szczepy występujące u zwierząt zmiennocieplnych. Wiadomo, że zwierzęta te mogą być bezobjawowymi nosicielami pałeczek *E. coli*, jednakże wiedza dotycząca epidemiologii szczepów występujących u tej grupy zwierząt jest niewielka. Zatem ważnym zadaniem jest ocena potencjału zoonotycznego szczepów *E. coli* występujących u zwierząt zmiennocieplnych, czego podjęła się Autorka pracy.

Temat pracy doktorskiej mgr Marty Książczyk obejmuje aktualne zagadnienia związane z oceną potencjału chorobotwórczego pozajelitowych *E. coli* pochodzących od ludzi i drobiu oraz określeniem potencjału zoonotycznego, a zwłaszcza nie badanej do tej pory w Polsce, populacji komensalnych *E. coli* wyisobnionej od gadów.

We wstępie rozprawy doktorskiej mgr Marta Książczyk scharakteryzowała pałeczki *E. coli* pod względem ich właściwości biochemicznych i fizjologicznych, przedstawiła klasyfikację oraz chorobotwórczość tych drobnoustrojów. Następnie szczegółowo opisała aktualne dane dotyczące dystrybucji czynników wirulencji u poszczególnych pozajelitowych patotypów *E. coli* oraz omówiła potencjał zoonotyczny pozajelitowych szczepów *E. coli* identyfikowanych u zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem szczepów wywołujących kolibakteriozy u ptaków (APEC). Zaprezentowała też dane dotyczące epidemiologii *E. coli* izolowanych od gadów, zwracając uwagę na skąpość tego typu badań w skali światowej. Kolejny podrozdział wstępu poświęcono charakterystyce grup filogenetycznych *E. coli*, z uwzględnieniem technik ich oznaczania. Doktorantka omówiła problematykę narastania oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe oraz obecności szczepów wielolekoopornych wśród jelitowych i pozajelitowych *E. coli*. Rozdział ten kończy opis mechanizmów oporności szczepów pozajelitowych *E. coli* na bakteriobójcze działanie surowicy. Należy podkreślić, że informacje zawarte w każdym podrozdziale wstępu są aktualne, a niewątpliwą zaletą tej części pracy są ryciny i tabele, syntetycznie obrazujące omawiane zagadnienia.

W rozdziale „Cele badawcze” Autorka podała główny cel pracy doktorskiej, którym jest określenie czynników wirulencji i analiza filogenetyczna trzech grup izolatów tj. pozajelitowych uropatogennych *E. coli* (UPEC), pozajelitowych *E. coli*, wywołujących kolibakteriozę u ptaków (APEC) oraz *E. coli* izolowanych od gadów. Następnie w punktach wymieniono zadania badawcze, którymi są: identyfikacja grup filogenetycznych *E. coli*, dystrybucja genów wirulencji, ocena wrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe, ocena bakteriobójczej aktywności surowicy, ocena patogenności *in vivo* oraz analiza pokrewieństwa filogenetycznego.

Rozdział „Materiały i metody”, składający się z dziesięciu podrozdziałów, Autorka poświęciła na opis:

- pozyskiwania materiału do badań, hodowli i identyfikacji izolatów *E. coli* na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych,
- potwierdzania przynależności gatunkowej izolatów techniką PCR i MALDI-TOF,
- określania grup filogenetycznych (A – F) izolatów *E. coli* metodą Quadruplex-PCR,
- oznaczania obecności genów wirulencji przy zastosowaniu multiplex-PCR,
- oznaczania wrażliwości izolatów *E. coli* na substancje przeciwdrobnoustrojowe,
- oznaczania wrażliwości izolatów *E. coli* na surowicę ludzką,
- wykonania testu patogenności *in vivo* z wykorzystaniem larw *Galleria mellonella*,
- określania podobieństwa genetycznego przy zastosowaniu techniki PFGE oraz ERIC-PCR
- oznaczania genotypu ST metodą MLST.

Metodyka została zaplanowana adekwatnie do założonego planu badań. Zastosowano nowoczesne techniki biologii molekularnej, co obrazuje bardzo wysoki poziom badań zrealizowanych przez Doktorantkę. Z drobnych uwag: w podrozdziałach 4.4 i 4.5, w opisie techniki m-PCR brakuje informacji na temat pozytywnych kontroli do określania grup filogenetycznych (A, B1, B2, C, D, E, F) oraz obecności genów wirulencji. Informacja o szczepach referencyjnych użytych w pracy znajduje się na początku rozdziału „Materiały i metody” (str. 59-60), jednak nie wiadomo, które z tych szczepów użyto jako kontrolę w identyfikacji poszczególnych grup filogenetycznych (A-F), a które w detekcji genów wirulencji *E. coli*.

W części eksperymentalnej pracy mgr Marta Książczyk określiła prevalencję pałeczek *E. coli* w kałomoczu gadów na poziomie 29%, wskazując, że ze względu na częste nietypowe cechy morfologiczne i fizjologiczne izolatów *E. coli* pochodzących od tej grupy zwierząt jedynie molekularne techniki badawcze umożliwiają wiarygodną identyfikację gatunkową. W

badaniach dotyczących dystrybucji grup filogenetycznych wykazano, że wśród izolatów pochodzących od gadów dominowała grupa B1, obejmująca głównie szczepy niepatogenne, a wśród izolatów UPEC grupa B2, obejmująca patogenne szczepy pozajelitowe. Z kolei w populacji APEC rozkład izolatów był równomierny z nieznaczną dominacją grup B2 oraz C, zawierających szczepy niepatogenne.

Autorka wykazała, że częstość występowania genów wirulencji w izolatach *E. coli* wyosobnionych od gadów jest niższa w porównaniu z izolatami UPEC i APEC. Wśród *E. coli* pochodzących od gadów stwierdzono również niższą liczbę izolatów opornych na substancje przeciwdrobnoustrojowe, jednak ponad 70% z nich było opornych na sulfametaksazol. Wielolekooporność stwierdzono u 82% izolatów APEC oraz 62% UPEC, a także u jednego izolatu *E. coli* od gadów. Oceniając oporność na działanie surowicy ludzkiej w grupie 14 wybranych izolatów *E. coli*, Doktorantka, wykazała, że izolaty pochodzące od gadów odznaczały się wyższym poziomem oporności na surowicę w porównaniu z izolatami EPEC i APEC. Co ciekawe, nie zaobserwowano związku pomiędzy opornością na surowicę a obecnością genów wirulencji *iss* oraz *traT*, wiązanych dotychczas z przeżywalnością *E. coli* w surowicy.

Badania *in vivo* przeprowadzone na larwach *Galleria mellonella* pozwoliły na ocenę poziomu patogenności izolatów *E. coli*. Autorka stwierdziła, że największą patogennością cechował się jeden z izolatów UPEC, zaś najmniejszą izolat *E. coli* pochodzący od gadów. Analiza podobieństwa genetycznego wskazała na zróżnicowanie badanej populacji *E. coli* oraz większą siłę dyskryminacji techniki PFGE niż ERIC-PCR.

Należy podkreślić, iż wyniki badań zostały przedstawione w sposób czytelny, zilustrowane licznymi, przejrzystymi tabelami oraz rycinami. Do drobnej uwagi dotyczącej tego rozdziału należy kwestia celowości użycia przez Doktorantkę techniki ERIC-PCR, skoro zastosowała metodę PFGE, która uznawana jest za metodę, do której odnosi się pozostałe techniki różnicowania genetycznego bakterii. Ponadto brak informacji o zastosowanej kontroli pozytywnej w opisie rycin obrazujących grupy filogenetyczne (A-F) (ryc. 5.7, 5.8, 5.9).

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w sposób rzeczowy i dojrzały konfrontuje uzyskane wyniki badań własnych z dostępną literaturą. Obszerna polemika zawiera trafne stwierdzenia i komentarze.

Piśmiennictwo zawiera 295 pozycji literaturowych, w zdecydowanej większości anglojęzycznych i opublikowanych po 2000 roku. Wyniki badań własnych Autorka zebrała w

postaci ośmiu zwięźle i precyzyjnie sformułowanych wniosków, odzwierciedlających cele pracy. Na uwagę zasługuje ogrom pracy Autorki poświęconej na realizację i opisanie ocenianej dysertacji.

Ocena potencjału chorobotwórczego populacji komensalnych *E. coli* izolowanych od gadów stanowi pionierski element rozprawy doktorskiej. Najważniejszym osiągnięciem recenzowanej pracy jest wykazanie zróżnicowania potencjału chorobotwórczego izolatów wyosobnionych od gadów. Zgodnie z danymi uzyskanymi przez Doktorantkę populacja ta zawiera jednocześnie izolaty *E. coli* (stanowiące zdecydowanie przeważającą grupę) mniej patogenne od izolatów APEC czy UPEC oraz potencjalnie zoonotyczne izolaty o wysokiej patogenności, porównywalnej do patogennych, pozajelitowych *E. coli*. Ważnym osiągnięciem pracy jest identyfikacja wśród populacji APEC szczepu należącego do klonu ST131, co wskazuje, iż drób, a tym samym produkty żywnościowe z nich otrzymywane mogą stanowić drogę transmisji tego wielolekoopornego, patogennego dla ludzi klonu *E. coli*.

Uwagi zawarte w recenzji w żadnym stopniu nie umniejszają wysokiej merytorycznej wartości wyników uzyskanych przez mgr Martę Książczyk.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marty Książczyk pt. „Określenie czynników wirulencji oraz analiza filogenetyczna pozajelitowych patogennych oraz komensalnych szczepów *Escherichia coli* izolowanych z różnych grup kręgowców” odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

W oparciu o przedstawioną wyżej pozytywną ocenę przedkładam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Marty Książczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość merytoryczną oraz pionierski charakter pracy, przedkładam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marty Książczyk.

Wrocław, 17.04.2018 r.


dr hab. Jarosław Bystroń
prof. nadzw. UP