

Gdańsk, 30.11.2014 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Anny Bogumiły Kubiak pt. „Genetyczna analiza epidemiologiczna patogennych szczepów *Escherichia coli*”

(promotor: dr hab. Paweł Parniewski)

Recenzowana praca doktorska mgr AB. Kubiak związana jest ściśle z tematyką, rozwijaną od lat przez promotora tej rozprawy dr hab. Pawła Parniewskiego, dotyczącą opracowywania nowych metod typowania genetycznego mikroorganizmów dla analiz epidemiologicznych. Tematyka ta jest bardzo aktualna i ważna, gdyż ciągle brakuje idealnej metody do typowania genetycznego organizmów i stąd wiele laboratoriów na świecie zajmuje się poszukiwaniem metody charakteryzującej się wysokim stopniem powtarzalności wyników, dużym potencjałem różnicującym, niskimi kosztami i stopniem skomplikowania.

Zastosowanie i interpretacja wyników badań epidemiologicznych uzyskanych przy pomocy narzędzi molekularnych, wymaga znajomości zarówno zalet jak i ograniczeń wybranych metod typowania oraz zrozumienia celu badań epidemiologicznych, jakie chcemy osiągnąć. Molekularne metody typowania są już dzisiaj szeroko stosowane w badaniach epidemiologicznych. Różnice pomiędzy genomami szczepów należących do tego samego gatunku mogą być wynikiem na przykład rekombinacji genetycznych, czy też mutacji zachodzących podczas replikacji. W terminologii epidemiologicznej organizmy mające wpływ na zakażenia (powodujące epidemie, pandemie) są w klonalnych relacjach, tzn. mają wspólne źródło pochodzenia. Stanowią część tego samego gatunku, mają te same czynniki wirulencji, oraz te same szlaki biochemiczne oraz są identyczne, bądź bardzo blisko spokrewnione pod względem genetycznym. Na poziomie gatunku występuje wystarczająca zmienność, aby można było identyfikować różne klony, czy grupy klonów (szczepy, które występują w ścisłych relacjach genetycznych) zebrane z różnych źródeł i miejsc w różnym czasie. Takie izolaty zwane są subtypami i mogą posłużyć do rozpoznawania infekcji, wykrywania krzyżowych transmisji patogenami

szpitalnymi, do identyfikacji źródła infekcji, rozpoznawania wśród populacji szczepów wirulentnych, oceny czy mają charakter sporadyczny oraz monitoringu programu szczepień. Zmienność genetyczna może być badana za pomocą różnych technik biologii molekularnej. Tworzone są nowe, coraz bardziej dokładne metody analizy materiału genetycznego, ale równocześnie dąży się do uproszczenia istniejących już metod przy jednoczesnym zwiększaniu ich czułości, wiarygodności, powtarzalności i potencjału różnicującego. Oceniana praca mieści się właśnie w tym nurcie badawczym, który przyczynił się do dynamicznego rozwoju epidemiologii molekularnej, dostarczającej narzędzi, które można wykorzystać np. do wyjaśnienia oddziaływania i wzajemnych relacji pomiędzy drobnoustrojami na poziomie populacji, zarówno na zewnątrz, jak i wewnątrz gospodarza oraz do wyjaśnienia, w jaki sposób ta informacja może być wykorzystana do rozwiązania problemu kontroli zakażeń określonymi patotypami określonego mikroorganizmu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa ma typowy układ dla tego typu opracowań. Liczy ona 140 stron maszynopisu łącznie z bibliografią, zawiera 23 tabele i 34 rysunki. Tekst pracy podzielony jest na typowe rozdziały dla rozpraw naukowych z zakresu badań eksperymentalnych. Brak jest streszczenia zarówno w języku polskim jak i angielskim, co jest rozdziałem koniecznym w tego typu pracach.

Omówienie dotychczasowego stanu wiedzy w temacie rozprawy, zatytułowane jako *Wstęp*, jest ciekawe i stosunkowo zwięzłe opracowane. Autorka skoncentrowała się na opisie aktualnej wiedzy dotyczącej filogenetyki gatunku *Escherichia coli*, charakterystyki patogennych szczepów tego gatunku, w tym omówieniu wybranych czynników wirulencji patogennych szczepów jelitowych *E. coli*, charakterystyki patogennych pozajelitowych szczepów *E. coli*, ze szczególnym uwzględnieniem szczepów uropatogennych oraz omówieniu zagadnień związanych z znaczeniem i celami badań epidemiologicznych patogennych szczepów *E. coli*. W oddzielnym rozdziale omówione zostały metody fenotypowe i molekularne stosowane w badaniach epidemiologicznych *E. coli*. Nie mam istotnych uwag do tej części rozprawy, spełniła ona swoje zadanie dostarczając niezbędnych informacji do dalszego swobodnego śledzenia pracy. Jednakże muszę wspomnieć o pewnych mankamentach, które rzucają się w oczy przy czytaniu tekstu tego rozdziału. Przedstawione informacje, nie zawsze poparte są odnośnikami z najbardziej aktualnego i kluczowego piśmiennictwa w omawianej tematyce. Cytowanie czasami jest błędne, podaje się nieistotne prace kosztem tych, które są kluczowe dla danej

metody typowania molekularnego mikroorganizmów. Występują błędy stylistyczne, językowe oraz literówki, co oznacza, że praca była niestarannie edytowana. Nazwy rodzin mikroorganizmów, np. Enterobacteriaceae, piszemy normalną czcionką, a nie kursywą. Niektóre zdania, szczególnie w rozdziale „Metody różnicujące wykorzystujące techniki biologii molekularnej” są wprost „zapożyczone” ze znanych recenzentowi tekstów.

Część metodyczna, opisująca materiały i metody wykorzystane w badaniach liczy 17 stron. Opis jest wystarczająco precyzyjny dla ewentualnego powtórzenia doświadczeń. Dobór metod oceniam jako prawidłowy.

W rozdziale „Wyniki”, liczącym 50 stron, autorka opisała rezultaty własnych doświadczeń, które stanowią logicznie zaplanowany ciąg badań. Pracę Pani Kubiak można podzielić na trzy główne części. W pierwszej doktorantka przedstawiła wyniki badań dotyczące charakterystyki kolekcji uropatogennych szczepów *E. coli* oraz patogennej kolekcji jelitowych szczepów *E. coli*. Charakterystyka dotyczyła struktury filogenetycznej, określenia serotypów oraz analizy obecności czynników wirulencji typowych dla danej grupy szczepów. Druga część wyników dotyczyła pokazania różnicowania badanych szczepów z wykorzystaniem nowatorskiej techniki TRS-PCR. Trzecia część, trochę niespójna z poprzednimi, pokazuje opracowanie nowego testu typowania genetycznego wykorzystującego obecność zidentyfikowanego elementu VNTR-COLI-175 w różnicowaniu patogennych szczepów *E. coli*.

Badania i analizy przeprowadzone przez Doktorantkę jednoznacznie wykazały użyteczność testów TRS-PCR z wykorzystaniem starterów $N_6(CGG)_4$ i $N_6(GTG)_4$ w różnicowaniu badanych szczepów *E. coli*. Przeanalizowano dwa patotypy – jelitowe patogeny *E. coli* (IPEC) należące do różnych subpatotypów oraz pozajelitowe *E. coli* (ExPEC) reprezentowane przez szczepy uropatogenne UPEC. Wszystkie badane szczepy zostały scharakteryzowane także pod kątem ich przynależności do grupy filogenetycznej oraz posiadanych czynników wirulencji zarówno typowych dla subpatotypu UPEC jak i typowych dla patotypu IPEC. Dla wszystkich izolatów wygenerowano swoiste profile prążkowe z wykorzystaniem metody TRS-PCR. Na tej podstawie wykonano analizy podobieństw profili prążkowych zarówno dla szczepów IPEC jak i UPEC i IPEC łącznie. Stwierdzono, że wśród badanych szczepów UPEC dominowały te należące do grupy filogenetycznej B2, natomiast w grupie szczepów IPEC dominowały te reprezentujące grupy filogenetyczne A i B1, co było zgodne z tym, iż w UPEC dominowały izolaty z grupy filogenetycznej typowej na patotypu

ExPEC, zaś wśród szczepów IPEC typowe dla szczepów pochodzenia jelitowego. Analiza wyników badania obecności czynników wirulencji wśród szczepów UPEC wykazała, że aż 76% tej kolekcji szczepów cechuje się obecnością co najmniej czterech czynników wirulencji typowych dla UPEC oraz że 14% posiada jakikolwiek czynnik wirulencji typowy dla szczepów IPEC. Natomiast w przypadku szczepów IPEC wykazano, że 13,86% szczepów posiadało chociaż jeden taki czynnik charakterystyczny dla UPEC, z wyłączeniem obecności czynnika *fimG/fimH*, powszechnie występującego u patogennych szczepów *E. coli*. Otrzymane wyniki potwierdziły istnienie problemu z jednoznacznym klasyfikowaniem i rozróżnieniem izolatów *E. coli* w oparciu o brak lub obecność danego czynnika czy grupy czynników wirulencji. Wygenerowane profile prążkowe za pomocą testów $N_6(CGG)_4$ i $N_6(GTG)_4$ -PCR pozwoliły na oszacowanie ich użyteczności w różnicowaniu subpatotypów *E. coli*. Oba testy TRS-PCR charakteryzowały się prawie identyczną siłą różnicowania badanych izolatów. Stwierdzono, że nie można rozdzielać, definiować lub grupować szczepów IPEC według ich przynależności subpatotypowej oraz że pomimo silnego różnicowania międzyszczepowego testami $N_6(CGG)_4$ i $N_6(GTG)_4$ -PCR pewna liczba izolatów UPEC i IPEC pozostawała niezróżnicowana. Dla szczepów IPEC nie zaobserwowano większych analogii pomiędzy posiadanym profilem wirulencji a wygenerowanymi w reakcjach TRS-PCR profilami prążkowymi. Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie pokazują skuteczność analiz TRS-PCR dla poszczególnych subpatotypów IPEC w różnicowaniu międzyszczepowym. Ponadto, grupowanie się szczepów UPEC i IPEC we wspólnej analizie TRS-PCR pokazało tendencję do odseparowywania się szczepów pozajelitowych od typowych patogenów jelitowych. Słusznie zatem sformułowano wniosek, że zastosowana metoda TRS-PCR jest także użyteczna w różnicowaniu szczepów w zależności od niszy, jaką kolonizują, będąc patogenem jelitowym lub patogenem układu moczowego. Szczepy uważane w analizie TRS-PCR za identyczne zróżnicowano na podstawie obecności i budowy elementu VNTR-COLI-175. Ta obserwacja pozwala na stwierdzenie, że element VNTR-COLI-175 może być użyteczny jako dodatkowy marker różnicujący w testach TRS-PCR. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki wzbogacają naszą wiedzę o patogennych szczepach *E. coli* w aspekcie swoistych dla danych subpatotypów czynników wirulencji oraz różnicowania ich z wykorzystaniem testów TRS-PCR.

Z reguły w pracach doświadczalnych, w tym w pracach doktorskich, jednym z bardzo ważnych rozdziałów jest zwykle Dyskusja. Treści i sposób napisania Dyskusji często decyduje o wartości pracy i jej naukowym przesłaniu. Oceniając tę bardzo ważną część pracy doktorskiej mogę powiedzieć, że akapity zawierające część dyskusyjną, w moim przekonaniu, w większości spełniają wymagania stawiane dobrze napisanej Dyskusji. Dobrze napisana dyskusja w pracy doświadczalnej zawiera podsumowanie własnych wyników, autorską, krytyczną ocenę ich wartości, dokonaną na tle aktualnych i rzetelnych danych literatury przedmiotu oraz znanych osiągnięć innych autorów – co w pełni zostało spełnione w dyskusji wyników przedstawionych przez Doktorantkę.

Chciałbym także w ramach dyskusji podczas publicznej obrony dysertacji poznać zdanie Doktorantki w kilku kwestiach, które przedstawiam poniżej:

- czy nietypowość jednego ze szczepów *E. coli* do określonej grupy filogenetycznej (Tabela 11) nie świadczy może o tym, że nie jest to szczep *E. coli*, jak potwierdzano przynależność gatunkową badanych szczepów?

- to samo co wyżej dotyczy 4 szczepów IPEC (Tabela 16), nietypowane, nie zaliczone do żadnej grupy filogenetycznej;

- czy badany szczep, w którym nie zidentyfikowano żadnego z badanych czynników wirulencji jest szczepem *E. coli* (Tabela 13), a może jest to ten sam szczep bez oznaczonej przynależności do grupy filogenetycznej?

- proszę o wyrażenie opinii nad użytecznością testu TRS-PCR w różnicowaniu międzyszczepowym *E. coli*, na ile metoda ta jest lepsza od dotychczas stosowanych np. MP PCR, MLST, REA-PFGE, czy innych. Czy może TRS-PCR być metodą referencyjną do genotypowania *E. coli*?

Analiza treści przedstawionych powyżej uwag wyraźnie wskazuje, że znakomita większość z nich ma charakter formalny, a nieliczne uwagi merytoryczne mają charakter przedstawienia problemu do dyskusji. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawiona rozprawa zawiera istotne elementy nowości naukowej. Pani Anna Bogumiła Kubiak wykazała się przy tym wiedzą teoretyczną w zakresie tematyki prowadzonych badań, a także umiejętnością interpretacji wyników doświadczeń. Uzyskane przez Doktorantkę rezultaty stanowią cenny wkład w badania nad doskonaleniem molekularnych narzędzi do typowania genetycznego patogennych mikroorganizmów. Doceniam w całej pełni ogrom badań i wysiłku, który musiała Doktorantka włożyć w jej wykonanie. Należy także docenić dorobek

naukowy Doktorantki, z bazy PubMed wynika, że Doktorantka jest współautorem 2 publikacji w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, w której zastosowano opisaną w rozprawie metodę genotypowania.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 11 Ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych (Dz.U. nr 65/90 poz. 386). Na podstawie powyższego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi o dopuszczenie mgr Annę Bogumiłę Kubiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

