

Łódź, 23.11.2014 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Zakład Immunobiologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Bogumiły Kubiak

pt. „Genetyczna analiza epidemiologiczna patogennych szczepów

Escherichia coli.”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Anny Bogumiły Kubiak, wykonana pod kierunkiem dr hab. Pawła Parniewskiego prof. IBM PAN, dotyczy wykorzystania testu opartego na amplifikacji fragmentów DNA, położonych pomiędzy trójnukleotydowymi sekwencjami powtarzającymi się w genomie *E. coli*, do różnicowania patogennych szczepów jelitowych i uropatogennych tych pałeczek. Bakterie te wykazują duże zróżnicowanie, oprócz szczepów komensalnych, obecnych w przewodzie pokarmowym człowieka, znane są szczepy wywołujące groźne zakażenia jelitowe, układu moczowego, zapalenie opon mózgowych czy zakażenia ran. Podział szczepów tych pałeczek w obrębie gatunku opiera się na różnych kryteriach – profilu antybiotykowrażliwości, serotypowaniu oraz molekularnych technikach typowania. Te ostatnie z wymienionych metod, zwłaszcza te oparte na analizach DNA szczepów są w ostatnich latach intensywnie rozwijane, zyskując coraz większe zastosowanie. Praca doktorska A.B. Kubiak wpisuje się w ten nurt badań o znaczeniu nie tylko poznawczym, ale praktycznym.

Doktorantka z Promotorem podjęła się oceny skuteczności genetycznego różnicowania kolekcji patogennych szczepów jelitowych *E. coli* z wykorzystaniem techniki TRS-PCR (trinucleotide repeat sequences)

Metoda ta została opracowana w Pracowni Genetyki Molekularnej IBM PAN w Łodzi i już wcześniej zastosowana do różnicowania bakterii z rodzajów *Mycobacterium* i *Salmonella*. Drugim celem badań było porównanie wyników genotypowania szczepów IPEC (intestinal pathogenic *E. coli*) tj. wywołujących zakażenia przewodu pokarmowego (jelitowe) oraz UPEC (uropathogenic *E. coli*) odpowiedzialnych za infekcje układu moczowego, a trzecim opracowanie testu różnicowania tych pałeczek opartego na analizie elementu VNTR-COLI-175 (variable tandem repeats).

Rozprawa mgr Anny Bogumiły Kubiak ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. W obszernym Wstępie teoretycznym doktorantka charakteryzuje pałeczki *E. coli*, przedstawiając klasyfikację tych bakterii i opisując cechy chorobotwórczości, zarówno patogenów jelitowych, jak i uropatogenów. Druga część Wstępu poświęcona jest epidemiologii zakażeń tymi bakteriami. Mgr Anna Bogumiła Kubiak zebrała dużą liczbę danych obrazujących częstość zakażeń patogennymi szczepami tych pałeczek w Polsce i innych, wybranych krajach. Trzecia część Wstępu teoretycznego poświęcona jest metodom służącym identyfikacji *E. coli* i różnicowaniu szczepów z wykorzystaniem techniki biologii molekularnej. Doktorantka dokonała przeglądu tych technik, wskazując na zalety i trudności w ich praktycznym stosowaniu. Przegląd literatury zaprezentowany przez doktorantkę stanowi dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej. Autorka dobrze przedstawiła problematykę chorobotwórczość pałeczek *E. coli*, zagadnienia związane z ich identyfikacją i różnicowaniem. Wykazała, iż jest dobrze przygotowana teoretycznie do podjętych badań doświadczalnych. Zabrakło mi na końcu Wstępu wskazania na potrzebę poszukiwania nowych metod molekularnej identyfikacji i różnicowania chorobotwórczych szczepów *E. coli* w nawiązaniu do celu pracy.

Cele pracy sformułowano precyzyjnie w trzech punktach W kolejnym rozdziale pracy mgr Anna Bogumiła Kubiak zaprezentowała materiał

wykorzystany w badaniach i zastosowane metody i techniki służące realizacji celów doktoratu. Badaniami objęto 50 szczepów *E. coli* wyizolowanych z moczu od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 w Łodzi im. WAM oraz genomowe DNA wyizolowane ze szczepów biegunkogennych tych pałeczek, otrzymane z Center for Molecular Biology of Inflammation, Institute of Infectiology w Munster w Niemczech. W tym miejscu chciałbym zapytać Doktorantkę, czy nie dysponowała szczepami *E. coli* wywołującymi zakażenia jelitowe, wyizolowanymi od pacjentów z Łodzi czy z Polski ?

Zastosowane metody i techniki badawcze, jak również sposoby walidacji wyników opisano właściwie, szczegółowo i wyczerpująco. Rozdział Materiał i Metody wskazuje na dobre przygotowanie praktyczne Doktorantki do podjęcia badań doświadczalnych.

Wyniki badań zostały starannie opracowane i zestawione w dobrze przygotowanych tabelach oraz zaprezentowane na rycinach w tekście oraz na dołączonej do rozprawy płycie CD. Mgr Anna Bogumiła Kubiak zaklasyfikowała badaną kolekcję szczepów uropatogennych do grup filogenetycznych – większość do grupy B2. Większość szczepów zaliczyła też do serogrup O2 lub O6, ciekawe, iż 12% szczepów (6) to szczepy szorstkie, a 18% szczepów (9) nie została sklasyfikowana serologicznie. Doktorantka określiła je jako nietypowalne. Czy przez to należy rozumieć, iż szczepy te, po dalszych szczegółowych badaniach, mogą być zaliczone do nowoutworzonych serogrup, schematu klasyfikacji *E. coli* ? Mgr Anna Bogumiła Kubiak dokonała też analizy genów kodujących czynniki wirulencji charakterystyczne dla szczepów klinicznych UPEC w badanej kolekcji izolatów z moczu. Sprawdziła częstość występowania 6 genów kodujących wybrane czynniki patogenności i wykazała, iż większość szczepów (76%) ma więcej niż 3 takie geny, a 98% szczepów charakteryzuje się obecnością genów *fimG/fimH*. Wśród 50 szczepów uropatogennych tylko w 7 wykryto geny kodujące jeden czynnik chorobotwórczości typowy dla szczepów jelitowych. Podobne badania

Doktorantka przeprowadziła w odniesieniu szczepów biegunkogennych. Większość tych izolatów zaliczyła do grup filogenetycznych B1 i A (odpowiednio, 48,5% i 19,8%). Ta kolekcja szczepów była wcześniej sklasyfikowana serologicznie i zbadana na obecność genów determinujących czynniki wirulencji typowe dla patogenów jelitowych. Mgr Anna Bogumiła Kubiak wzbogaciła charakterystykę tych szczepów, ustalając obecność w tych bakteriach genów kodujących czynniki wirulencji typowe dla UPEC. Większość szczepów ma geny kodujące fimbrie typu 1, z większą częstością odnotowano też obecność genu *hly1* determinującego wytwarzanie zewnątrzkomórkowej hemolizyny HlyA. Główne zadanie badawcze – określenie skuteczności genetycznego różnicowania kolekcji jelitowych, patogennych szczepów *E. coli* wykonano, analizując wybrane subpatotypy tych pałeczek, z zastosowaniem techniki TRS-PCR. Doktorantka porównała też wyniki genotypowania kolekcji UPEC z IPEC za pomocą tej procedury. Oba zastosowane testy TRS-PCR $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ cechowały się podobną siłą różnicowania izolatów jelitowych. Mgr Anna Bogumiła Kubiak wykazała, że metoda ta może być użyteczna w różnicowaniu szczepów *E. coli* jelitowych i pozajelitowych patogenów układu moczowego. Doktorantka wskazała też na przydatność elementu VNTR-COLI-175 w efektywnym różnicowaniu szczepów tych pałeczek. Szczepy nie dające się różnicować metodą TRS-PCR zostały zróżnicowane na podstawie obecności tego elementu.

Podsumowując stwierdzam, iż mgr Anna Bogumiła Kubiak zrealizowała cele pracy doktorskiej. Doktorantka wykazała, iż testy oparte na amplifikacji fragmentu DNA pomiędzy trójnukleotydowymi sekwencjami powtarzającymi się tj. analizy $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ mogą być skutecznie stosowane do różnicowania szczepów UPEC i IPEC. Dodatkowo, wskazała też na możliwość wykorzystanie w tych analizach markera VNTR-COLI-175.

Wnioski sformułowane na str. 127 rozprawy po Podsumowaniu wyników znajdują potwierdzenie w zgromadzonych danych. Dane te Doktorantka wnikliwie analizuje w rozdziale Dyskusja.

Zestawienie literatury w liczbie 137 pozycji obejmuje najnowsze publikacji, które cytowano właściwie. Potknięcia stylistyczne i sformułowania w moim odczuciu nieprecyzyjne, lub niewłaściwe zaznaczyłem w recenzowanym egzemplarzu pracy. Na str. 126 rozprawy Doktorantka na końcu Podsumowania napisała „Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad testami TRS-PCR, jako narzędziami śledzącymi ewolucyjne zależności wśród patogennych szczepów *E. coli*”. Bardzo proszę Doktorantkę o odniesienie się podczas obrony rozprawy do poruszonej kwestii. Jakie badania należałoby Jej zdaniem podjąć i jakie są szanse praktycznego wykorzystania wyników Jej badań w doktoracie w diagnostyce molekularnej bakterii ?

Podsumowując, pragnę stwierdzić, iż rozprawa doktorska mgr Anna Bogumiła Kubiak została dobrze przygotowana i wykonana, uzyskano cenne, nowe dane dotyczące szczepów chorobotwórczych *E. coli*, metod ich różnicowania i cech ich patogenności. Znalazłem w bazie PubMed dwie publikacje z udziałem mgr Anny Bogumiły Kubiak dotyczące wykorzystania techniki TRS-PCR w odniesieniu do *Mycobacterium* i *Salmonella*. Mam nadzieję, iż wyniki Jej pracy doktorskiej zostaną wkrótce opublikowane.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Anny Bogumiły Kubiak pt. „Genetyczna analiza epidemiologiczna patogennych szczepów *Escherichia coli*” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i zwracam się do Komisji ds. Przyjmowania i Przeprowadzania Obron Rozpraw Doktorskich Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Kubiak