

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek wet. Aleksandry Trościańczyk pt. "Enterococcus spp. izolowane od zwierząt towarzyszących jako potencjalne źródło zagrożenia zdrowia publicznego".

Podstawą do sporządzenia recenzji jest wniosek Dziekana Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie z dnia 04. 05. 2018.

Bakterie z rodzaju *Enterococcus*, zwane dawniej paciorkowcami kałowymi, stanowią dużą (ponad 50 gatunków) grupę Gram-dodatnich ziarniaków występujących jako komensale w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Drobnoustroje te należą do mikroorganizmów oportunistycznych, zdolnych do wywoływania zakażeń w przypadku upośledzenia miejscowych mechanizmów obronnych powierzchni ciała oraz w warunkach immunosupresji. Szczególna rola patogenna tych bakterii wiąże się z powodowaniem przez nie infekcji szpitalnych u ludzi, a problem ten jest dodatkowo komplikowany przez stosunkowo wysoki wskaźnik antybiotykooporności tej grupy mikroorganizmów. Enterokoki wykazują np. naturalną oporność na np. cefalosporyny, sulfametoksazol z trimetoprimem czy tzw. niskie stężenia aminoglikozydów. Oprócz tego, u omawianej grupy drobnoustrojów obserwuje się często oporność nabytą, spowodowaną uzyskaniem przez poszczególne szczepy bakteryjne określonych genów zlokalizowanych na mobilnych elementach genomu (plazmidach i transpozonach). Wykazano, że gatunki enterokoków mogą różnić się od siebie pod względem posiadanych mechanizmów antybiotykooporności, co powoduje konieczność dokładnej identyfikacji gatunkowej izolatów klinicznych.

Od dawna wiadomo, że enterokoki pochodzące u zwierząt gospodarskich (bydła, świń, drobiu) mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów mięsa, mleka czy jaj. Stosowane w przeszłości antybiotykowe dodatki paszowe, a także terapia zwierząt przy użyciu tych samych chemioterapeutyków, które wykorzystuje się w leczeniu zakażeń u człowieka, spowodowały, że produkty spożywcze zwierzęcego pochodzenia mogą być źródłem drobnoustrojów opornych na wiele grup związków przeciwbakteryjnych. Natomiast do tej pory nie zwracano większej uwagi na rolę zwierząt towarzyszących, zwłaszcza psów i kotów, w transmisji wieloopornych szczepów *Enterococcus* na człowieka. Jest to problem

tym poważniejszy, że kontakt tych zwierząt z ludźmi stał się bardziej ścisły, a ponadto, w przeciwieństwie do produktów spożywczych, poddawanych zwykle kontroli mikrobiologicznej, praktycznie niemożliwy jest stały monitoring zagrożenia epidemiologicznego ze strony zwierząt towarzyszących. Dlatego też podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących potencjalnego ryzyka dla zdrowia publicznego, związanego z transmisją bakterii z rodzaju *Enterococcus* od psów i kotów, uważam za trafne i celowe. Należy także podkreślić, że recenzowana praca w sposób logiczny i konsekwentny uzupełnia wcześniejsze badania Zakładu Mikrobiologii Weterynaryjnej UP w Lublinie nad bakteriami z rodzaju *Enterococcus* izolowanymi od zwierząt gospodarskich (świnie, drób) oraz od zwierząt dzikich, przez co uzyskujemy pełny obraz roli epidemiologicznej zwierząt – jako nosicieli enterokoków – na terenie Polski.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje 227 stron tekstu, a jej układ jest zgodny z ogólnie przyjętymi wymogami redakcyjnymi. W rozprawie wyróżniono główne rozdziały: Wstęp, Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz zawierające 314 pozycji Piśmiennictwo. Tekst pracy uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Suplement będący wykazem badanych izolatów *Enterococcus* sp. z podaniem wykazanych u nich genów wirulencji oraz oporności na chemioterapeutyki. Rozprawa, opatrzona licznymi rycinami i tabelami, została napisana z dużym rozmachem i w poprawnym stylu, chociaż zawiera też dość liczne błędy językowe i terminologiczne (p. niżej). We wstępie Autorka przedstawia ogólną charakterystykę rodzaju *Enterococcus*, a także szczegółowo omawia opisane u tej grupy bakterii mechanizmy antybiotykooporności oraz czynniki zjadliwości. Rozdział ten, napisany w sposób przejrzysty i komunikatywny, dowodzi bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę zagadnień dotyczących znaczenia klinicznego, diagnostyki mikrobiologicznej oraz problemu oporności (w tym wielolekooporności) enterokoków. Zawarta w tytule rozprawy teza o potencjalnym zagrożeniu dla zdrowia człowieka ze strony enterokoków izolowanych od zwierząt towarzyszących, znalazła swe odzwierciedlenie w sformułowanych przez Autorkę celach badawczych. Główne z nich to określenie częstości występowania u psów i kotów najważniejszych z epidemiologicznego punktu widzenia gatunków, tj. *Enterococcus faecalis* oraz *E. faecium*, a także fenotypowa i genotypowa ocena ich oporności na chemioterapeutyki. Dodatkowo, izolowane bakterie należące tych 2 gatunków oceniane były pod względem obecności wybranych czynników zjadliwości (np. żelatynazy, cytolizyny czy adhezyn) oraz porównywane pod względem właściwości genotypowych.

Analizując rozdział 3. dysertacji („Materiał i metody”), należy stwierdzić, że badania przeprowadzone zostały na reprezentatywnej grupie izolatów i przy użyciu nowoczesnych metod diagnostycznych. Na szczególne podkreślenie zasługuje wykorzystanie technik genotypowania: ITS-RFLP (do identyfikacji gatunkowej enterokoków) oraz ADSRRS (do różnicowania wewnątrzgatunkowego izolatów *E. faecalis* oraz *E. faecium*). Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy badawczej, gdyż wymienione techniki wymagają nie tylko dużej wiedzy teoretycznej, ale i umiejętności praktycznych dotyczących samej techniki PCR, stosowania enzymów restrykcyjnych, reakcji ligacji oraz wizualizacji i dokumentacji wyników przy użyciu odpowiednich programów komputerowych (tu prośba o zwrócenie uwagi na prawidłową pisownię – powinno być „Gel Doc 2000”, a nie „Gel Dock 2000”, jak to jest w kilku miejscach pracy). Pewne wątpliwości może budzić zasadność użycia pozostałych metod diagnostycznych – ITS-PCR oraz EN-COCCUStest. W pierwszym przypadku, już wcześniejsze badania z udziałem Doktorantki wykazały, że ITS-PCR nie ma dużego potencjału różnicującego. Jeśli zaś chodzi o EN-COCCUStest, to aby w pełni ocenić skuteczność identyfikacyjną tego systemu, powinny być jednak użyte testy dodatkowe (na stronie 44. podano, że producent zaleca kilka takich testów, a na str. 160 małą liczbą badanych substratów tłumaczono brak poprawnej identyfikacji przy użyciu omawianego systemu). Ponadto, w opinii recenzenta, opis zastosowanych procedur badawczych jest dość chaotyczny, co utrudnia odbiór pracy przez czytelnika. Przedstawienie zagadnień dotyczących badanych izolatów bakteryjnych, użytych materiałów i zastosowanych technik badawczych w różnych podrozdziałach sprawia pewien kłopot w sytuacji, gdy zachodzi konieczność ponownego odszukania interesującego nas zagadnienia. Przykładowo, w podrozdziale 3.1.1 Autorka pisze ogólnie, że od 37 psów i 40 kotów wyosobniono 350 izolatów enterokoków. Następnie, 9 stron dalej (podrozdział 3.2.1) przedstawia bardziej szczegółowo samą procedurę izolacji bakterii. Podobnie jest z opisem badania wrażliwości na chemioterapeutyki: w podrozdziale 3.1.3 podano listę substancji użytych do badania metodą mikrorozcieńczeń oraz stosowane zakresy stężeń, a dopiero 16 stron dalej omówiono sposób wykonania testu i kryteria interpretacji wyników. Sprawę komplikuje dodatkowo podrozdział 3.3 („Schemat postępowania”), który jest powtórzeniem opisu wcześniejszych procedur, a z drugiej strony powoduje pewną dezorientację u osoby czytającej. Na przykład, w punkcie 2. tego podrozdziału stwierdzono, że przeprowadzono identyfikację biochemiczną w przypadku „jednego szczepu od każdego gospodarza (n=70)”. Wydaje się to sprzeczne z podaną wcześniej liczbą badanych zwierząt (77); natomiast informacja, że enterokoki izolowano tylko od 70 zwierząt, pojawia się dopiero na następnej stronie (podrozdział 4.1). Tu rodzi się

pytanie, jakie były kryteria doboru izolatów do identyfikacji biochemicznej? (od każdego gospodarza, z którego izolowano enterokoki, wytypowano 5 kolonii różniących się makroskopowo, a badano fenotypowo tylko 1). Wątpliwości budzi ponadto punkt 5. dotyczący eliminacji z dalszych badań izolatów o tym samym profilu oporności (w metodzie dyfuzyjno-krażkowej). Nie można mieć pewności, że izolaty tego samego gatunku i o takim samym profilu oporności należą do tego samego szczepu, gdyż wśród enterokoków zachodzi często i łatwo wymiana genów kodujących antybiotykooporność (co Autorka wielokrotnie podkreśla w różnych miejscach pracy), tak że bakterie zróżnicowane genetycznie (a więc różne klony), wchodzące w skład mikrobioty u danego osobnika, mogą mieć ten sam profil oporności. Z drugiej strony, np. izolaty *E. gallinarum* oznaczone jako 57-2, 57-3, 57-4 i 57-5 miały identyczny profil oporności w metodzie dyfuzyjno-krażkowej (tabela 4.8, s. 84). Dlaczego więc nie zostały potraktowane jako 1 szczep i dlaczego trzy z nich nie zostały wykluczone z dalszych badań, zgodnie z podrozdziałem 3.3 punkt 5? To samo dotyczy izolatów 60-2, 60-3 i 60-5 *E. durans* (od tego samego kota, z identycznym profilem oporności w metodzie dyfuzyjno-krażkowej [tabela 4.10, s. 86]) – wszystkie były potem badane metodą mikrorozcieńczeń.

Rozdział 4 rozprawy poświęcony jest opisowi uzyskanych wyników. W swych badaniach Autorka stwierdziła, że u psów i kotów najliczniej występującym gatunkiem z rodzaju *Enterococcus* był *E. faecalis* (stanowił, odpowiednio, 62,5 i 53% izolatów) oraz *E. faecium* (po ok. 14%), a w dalszej kolejności: *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. durans* i *E. hirae* (te 2 ostatnie tylko u kotów) oraz 3 inne gatunki, reprezentowane przez pojedyncze izolaty. Fakt ten jest istotny z epidemiologicznego punktu widzenia, gdyż dwa najczęściej stwierdzone u zwierząt towarzyszących gatunki enterokoków mają też największe znaczenie jako patogeny człowieka. Większość (powyżej 80%) tych izolatów odznaczało się opornością na powszechnie stosowane w medycynie chemioterapeutyki: tetracyklinę, erytromycynę i fluorochinolony, a dodatkowo, część była oporna na wysokie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych. Zjawisko antybiotykooporności fenotypowej zostało przy tym potwierdzone przez wykrycie odpowiednich genów oporności u badanych izolatów. Poważnym problemem z punktu widzenia zdrowia publicznego może być stosunkowo wysoki odsetek szczepów wielolekoopornych – Autorka wykazała, że ponad 70% izolatów wykazywało niewrażliwość na co najmniej 3 grupy chemioterapeutyków.

Analizując opis wyników antybiotykooporności u badanych enterokoków, nie sposób nie zauważyć faktu niskiej zgodności wyników uzyskanych przez Autorkę przy użyciu metody dyfuzyjno-krażkowej oraz rozcieńczeniowej. Dotyczyło to zwłaszcza takich

chemioterapeutyków, jak ciprofloksacyna, enrofloksacyna, erytromycyna i wankomycyna. O ile w przypadku wankomycyny również inni autorzy zwracali uwagę na słabszą dyfuzję antybiotyku z krążka, a przez to zmniejszenie średnicy strefy zahamowania wzrostu, o tyle dla pozostałych wymienionych substancji zjawisko braku korelacji wyników jest bardziej niepokojące i wymaga większej ostrożności w interpretacji wyników. Można by też w tym miejscu zadać pytanie, czy ocenę wrażliwości (metodą Kirby-Bauer) dla 350 izolatów wykonano jednorazowo, czy w określonych odstępach czasowych (podłoża mogły należeć do różnych partii produkcyjnych)? Czy przeprowadzono powtórne badanie w przypadku izolatów dających sprzeczne wyniki? Czy szczepy kontrolne cechowały się właściwą dla nich wrażliwością lub opornością? Wpływ na wynik badania metodą dyfuzyjno-krążkową mogły mieć nawet drobne szczegóły metodyczne, jak np. grubość i wilgotność podłoża, czas od momentu inokulacji do nałożenia krążków, itp. Czy Autorka spotkała się z przedstawionym tu problemem w analizowanym piśmiennictwie?

W opinii recenzenta, koniecznie należałoby zmienić formę przedstawienia wyników identyfikacji badanych izolatów *Enterococcus* sp. W pierwszej kolejności Autorka opisuje wyniki uzyskane przy użyciu systemu EN-COCUSTest, a dopiero kilka stron dalej – w oparciu o metodę ITS-RFL. Ponieważ wyniki obu metod identyfikacji różnią się od siebie, może to powodować pewną dezorientację u osoby czytającej. Wydaje się więc bardziej właściwe podanie tylko jednej listy stwierdzonych gatunków enterokoków – tych, które były zidentyfikowane przy użyciu metody genotypowej (jako pewniejszej i uznanej za referencyjną) – i do niej odnieść wyniki uzyskane metodami fenotypowymi. Można mieć też zastrzeżenia do układu piśmiennictwa – choć jest ono obszerne i właściwie dobrane, jednak zagadką pozostaje to, według jakiego klucza zostało ono zestawione? (ani alfabetycznie, ani według kolejności cytowania w rozprawie). Chaotyczny układ piśmiennictwa utrudnia poszukiwanie interesującej pozycji. Np. na s. 78 cytowana jest praca Tacconelliego i wsp. z podanym numerem 199, tymczasem w wykazie piśmiennictwa pod tym numerem jest zupełnie inna publikacja (Goh i wsp.). Szukanie tej właściwej wymagało przeglądnięcia 33 stron piśmiennictwa – i skończyło się niepowodzeniem.

Przedstawione powyżej zastrzeżenia dotyczą jednak w większości formy opisu zastosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników, a nie warstwy merytorycznej omawianej pracy. Z pozostałych uwag krytycznych chciałbym wymienić następujące:

1/ W wielu miejscach pracy należałoby zamienić termin „szczep” na „izolat”. Pojęcia te nie są tożsame, gdyż np. od jednego zwierzęcia można wyosobnić kilka izolatów bakteryjnych, które w rzeczywistości należą do tego samego szczepu;

2/ Brak pewnych szczegółów metodycznych dotyczących metody mikrorozcieńczeń, np. jakie były proporcje poszczególnych składników;

3/ Uwagi dotyczące Tabeli 4.16 (s.94): a/ w jaki sposób wyznaczano MIC₅₀ oraz MIC₉₀ dla np. 4 izolatów *E. casseliflavus* lub 3 izolatów *E. mundtii*? Nie było to opisane w sekcji „Materiały i metody”; b/ skąd się wzięły takie wartości stężeń, jak np. 15,6, 31, 62,5 µg/ml? Nie jest to zgodne z Tab. 3.1 oraz informacją, że stężenia były 2-krotnie wzrastające (s. 51); c/ „Z” oznacza chyba zakres uzyskanych wartości MIC, a nie „zakres testowanych stężeń”?

4/ W tabeli 4.2 (s. 67) błędnie podano sumę izolatów *Enterococcus* sp. od psów i kotów (powinno być, odpowiednio, 180 i 170);

5/ Na Ryc. 4.41 (s. 103) wydaje się, że profil E powinien należeć do tej samej gałęzi („cluster”), co A, B i C?

6/ W tabeli 4.21 (s. 106) izolat 17-1 przypisany jest do 2 profili;

7/ Jeśli używano buforu obciążającego 6x, to dlaczego stosowano go w proporcji 1 do 4 (s. 56 i 58)?

Przed oddaniem pracy do druku lub przygotowując autoreferat, konieczne jest ponadto usunięcie z maszynopisu licznych błędów językowych, np. „kontrola czystości podłóż” (s. 51, 52; powinno być kontrola jałowości podłoża); „po 3 [szczepy] od 1 [gospodarza]” oraz „po 1 od 1” (s.79); „szczepy należące do jednego kota” (s. 84); „zwierzęta towarzyszące jako rezerwuuar oporności” itp.

Ocena końcowa.

Powyższe uwagi nie umniejszają w sposób znaczący walorów poznawczych i aplikacyjnych pracy. Oceniana rozprawa doktorska została zaplanowana i zrealizowana w sposób wnikliwy i wszechstronny, a sformułowane przez Autorkę wnioski znajdują pełne odzwierciedlenie w przeprowadzonych badaniach. Jestem przekonany, że Doktorantka dobrze opanowała techniki pracy w laboratorium mikrobiologicznym i jest przygotowana do samodzielnej pracy naukowej. **Dlatego stwierdzam, że rozprawa lek. wet. Aleksandry Trościańczyk pt. „Enterococcus spp. izolowane od zwierząt towarzyszących jako potencjalne źródło zagrożenia zdrowia publicznego” odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

p.o. KIEROWNIKA
Zakładu Mikrobiologii

dr hab. Jarosław Król