

Warszawa, 07.12.2014r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Kożuszko

pt. „ Charakterystyka szczepów *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* opornych na wankomycynę”.

Enterokoki należące do naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt, jeszcze do niedawna uważane były za patogeny o niewielkim potencjale chorobotwórczym. Jednak sytuacja zmieniła się w ciągu ostatnich dekad, ponieważ bakterie te charakteryzuje niezwykła łatwość nabywania oraz przekazywania genów oporności na antybiotyki. Obecnie enterokoki odporne na glikopeptydy (VRE) oraz wysokie stężenia aminoglikozydów (HLAR) sprawiają ogromne problemy terapeutyczne, a ich odporność na czynniki fizyko-chemiczne ułatwia ich rozprzestrzenianie w szpitalach. Enterokoki o fenotypie VRE oraz HLAR uważane są za ważne „patogeny alarmowe”, stanowiące poważną przyczynę zakażeń szpitalnych na świecie. Najważniejszymi pod względem częstości występowania są enterokoki należące do gatunków *E. faecium* i *E. faecalis*.

W związku z powyższym wybór tematu rozprawy doktorskiej jest wysoce zasadny i wpisuje się w wiodącą tematykę w tym zakresie na świecie.

Przedstawiona do oceny Rozprawa ma układ typowy i liczy 112 stron. Bardzo przydatne jest załączenie, na początku Rozprawy, wykazu zastosowanych skrótów. Wstęp zawarty jest na 18 stronach i podzielony na podrozdziały, co znacząco ułatwia czytanie. W pierwszej części wstępu opisano charakterystykę enterokoków, uwzględniając w niej historię ich odkrycia, zmiany nazw najważniejszych gatunków, cechy właściwe dla rodzaju, taksonomię, występowanie oraz warunki hodowli i właściwości wykorzystywane w identyfikacji.

Drugi podrozdział wstępu, bardzo krótki, skupia się na opisie zakażeń wywoływanych przez *Enterococcus*. Podkreślono rolę enterokoków jako ważnego czynnika etiologicznego zakażeń szpitalnych. W ostatnim akapicie podrozdziału (str. 13) znajduje się niedokończone zdanie.

Kolejny fragment wstępu obejmuje omówienie udziału w patogenezie zakażeń wybranych czynników wirulencji gatunków *E. faecium* i *E. faecalis*, do których należą substancja agregująca AS, białko powierzchniowe Esp, żelatynaza, proteinaza serynowa, cytolizyna, hialuronidaza, białko wiążące kolagen, adhezyna EfaA i antygen wydzielniczy SagA.

Ostatnia część wstępu opisuje oporność i wybrane mechanizmy oporności enterokoków na antybiotyki. Wspomniano o naturalnej oporności tych bakterii. Omówiono występujące nabyte oporności, poświęcając osobny podrozdział oporności i mechanizmom oporności na glikopeptydy i aminoglikozydy. Te ostatnie opisy są teoretycznym wprowadzeniem do części eksperymentalnej, ponieważ oporność enterokoków na wankomycynę i wysokiego stopnia na aminoglikozydy stanowi główną część Rozprawy.

Cele pracy są przedstawione przejrzysto w punktach, wraz z metodami, za pomocą których będą realizowane. Obejmują one ocenę skuteczności identyfikacji gatunkowej enterokoków z wykorzystaniem konwencjonalnych metod hodowli i automatycznego systemu VITEK2 COMPACT, ocenę przydatności techniki multipleks PCR do identyfikacji genów specyficznych gatunkowo i genów oporności na wankomycynę, ocenę lekowrażliwości na wybrane antybiotyki oraz ocenę częstości występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji. Nastąpił drobny błąd przy składaniu pracy i cele znajdują się przed ostatnią stroną wstępu.

Materiał i metody zamieszczono na 9 stronach. Opisy metod hodowlanych, identyfikacji gatunkowej i przeprowadzanych reakcji PCR są szczegółowe i możliwe do odtworzenia. Natomiast opis dotyczący materiału tzn. izolatów enterokokowych i sposobu ich zbierania powinien być, w mojej opinii, dokładniejszy. Nie wiadomo w jakim celu były pobierane próbki, z których wyizolowano VRE i czy były to wszystkie izolaty VRE zebrane w Zakładzie Mikrobiologii w badanym okresie? Warto byłoby zamieścić ogólne liczby enterokoków izolowanych w badanym okresie, bo to pozwoliłoby określić częstości występowania VRE, np. w konkretnych oddziałach szpitala, co jest czynione w dalszej części pracy (w wynikach i w dyskusji). Nie jest również jasny podział materiałów klinicznych; dlaczego osobno umieszczono kał, kał w kierunku nosicielstwa VRE i wymazy z odbytu. Czy to znaczy, że kał i wymazy z odbytu pobierano w innym celu niż badanie nosicielstwa VRE? Konsekwentnie z tym podziałem prowadzone są obliczenia w części „Wyniki”. Brakuje podkreślenia, że większość badanych izolatów pochodzi z nosicielstwa, a wszystkie obliczenia są wspólne dla izolatów z nosicielstwa i z zakażeń. Należałoby to wyjaśnić. Stosując skrót DNA Doktorantka używa rodzaju nijakiego.

Wyniki Rozprawy przedstawiono na 22 stronach, w 5 podrozdziałach. Zawierają one opisy, szczegółowe tabele, ryciny i zdjęcia. Obliczenia statystyczne zamieszczono na końcu Rozprawy. Przedstawiono wyniki identyfikacji gatunkowej przeprowadzonej różnymi

metodami: hodowli, biochemicznymi i z wykorzystaniem reakcji PCR. Wykazano występowanie w badanych izolatach genów *vanA* i *vanB*. Jak wspomniano powyżej, obliczenia częstości występowania VRE w konkretnych materiałach klinicznych lub w oddziałach szpitala, włącznie z obliczeniami statystycznymi, nie wydają się do końca uzasadnione (Ryc. 3-6). Na Ryc. 5, zapewne przez przeoczenie, osobno umieszczono dwa wymazy z pochwy.

Następnie przedstawiono wyniki i szczegółową analizę badania lekowrażliwości enterokoków metodą jakościową i ilościową na wybrane antybiotyki. W metodzie jakościowej (dyfuzyjno-krążkowej) stwierdzono niezgodność fenotypu z genotypem u 17 izolatów; były to izolaty *E. faecium* z wykrytym genem *vanB*. W przypadku metody ilościowej, oznaczając MIC teikoplaniny stwierdzono brak zgodności pomiędzy fenotypem a genotypem u 6 izolatów *E. faecium* z genem *vanB*. Wśród badanych izolatów zidentyfikowano trzy fenotypy oporności na aminoglikozydy, HLAR, HLGR i HLSR. Najczęściej (>84% badanych izolatów) występował fenotyp HLAR, oznaczający wysoki stopień oporności na aminoglikozydy i wykluczający stosowanie terapii skojarzonej z penicylinami i glikopeptydami. Na Ryc. 7 brakuje legendy.

W dalszej części opisano wyniki wykrywania metodą multiplex PCR, pięciu genów kodujących czynniki wirulencji enterokoków oraz dokładną analizę zależności pomiędzy występowaniem genów zjadliwości a genotypem oporności na glikopeptydy, materiałem, z którego wyhodowano izolat i oddziałem, w którym przebywał pacjent z VRE. W mojej opinii, Doktorantka powinna ostrożniej pisać o wyjątkach w występowaniu wybranych genów zjadliwości w badanych izolatach, które izolowano zaledwie z jednego lub dwóch materiałów klinicznych. Są pewne nieścisłości na rycinach 12 i 13, na których przedstawiono odpowiednio występowanie genów *esp* i *hyl*. Tytuły rycin odnoszą się tylko do *E. faecium*, a na rycinie pokazano wyniki również dla *E. faecalis* (w sumie dla 104 izolatów). Bardziej czytelne byłoby również zastosowanie tej samej skali na obu rycinach.

Dyskusję Rozprawy zamieszczono na 14 stronach. Rozpoczyna się ona ciekawym opisem hipotez, mówiących o pojawieniu się opornych na glikopeptydy enterokoków. Następnie Doktorantka przedstawia częstość występowania izolatów VRE w różnych regionach świata, uwzględniając wcześniejsze polskie dane i odnosi je do wyników swojej Rozprawy. Podkreśla wagę właściwej i szybkiej identyfikacji gatunkowej oraz oznaczania wrażliwości na leki u enterokoków, będącego podstawą podjęcia celowanej

antybiotykoterapii. W dyskusji na str 63 zamieszczono zdanie: „W niniejszej pracy wśród szczepów *E. faecalis* u czterech wykryto gen *vanA*, u jednego gen *vanB*, podczas gdy wśród 100 szczepów *E. faecium* u 17 (17%) wykazano obecność genu *vanA*, a u 20 (20%) genu *vanB*”. Zdanie to jest niejasne ponieważ sugeruje omawianie wyników Rozprawy Doktorantki, które są inne.

Jak wspomniano przy okazji materiału i metod, nie do końca upoważnione wydaje się wykazywanie tendencji występowania szczepów VRE w określonych oddziałach, na podstawie wyników Rozprawy. Można tylko mówić, że w badanej grupie najwięcej izolatów VRE pochodziło z danego oddziału. Należy również podkreślić, że mówiąc o częstości występowania w oddziale szpitalnym/szpitalu enterokoków, które często odpowiadają za ogniska zakażeń szpitalnych, należałoby ocenić pokrewieństwo badanych izolatów. W przypadku braku takiej oceny, należałoby to skomentować.

Następnie Doktorantka szeroko i ciekawie dyskutuje wyniki oporności badanych izolatów na antybiotyki stosowane w terapii zakażeń enterokokowych i czynniki wirulencji, które zestawia z wynikami badań opublikowanymi w literaturze światowej. Niepotrzebne wydaje się powtórzenie wyników lekowrażliwości na str 67-68.

Rozprawa kończy się siedmioma trafnymi i dobrze sformułowanymi wnioskami. Jeden z nich wydaje się zbyt ogólny: „Występowanie oporności na wysokie stężenia aminoglikozydów wśród badanych szczepów (99,0%) wyklucza te antybiotyki z możliwości ich stosowania w leczeniu skojarzonym zakażeń o etiologii VRE”. Jednak wśród badanych izolatów były takie o fenotypie HLGR i HLSR, odporne na wybrane antybiotyki aminoglikozydowe, co nie wyklucza automatycznie innych aminoglikozydów z terapii skojarzonej. Przedstawione wnioski wskazują, że postawione cele Rozprawy zostały zrealizowane. Na zakończenie przedstawiono streszczenia w języku polskim i angielskim oraz bogaty spis piśmiennictwa, obejmujący 246 pozycji, uwzględniający również najnowsze publikacje.

Niektóre sformułowania Rozprawy są nieprecyzyjne i wynikają zapewne z przejęzyczenia lub chęci uogólnienia:

- Na str. 19 zamieszczono zdanie, że „Bakterie z rodzaju *Enterococcus* wykazują naturalną oporność na beta-laktamy (penicyliny, cefalosporyny)...”. Stwierdzenie to jest właściwe dla cefalosporyn, ale nie można go uogólniać dla penicylin i wszystkich enterokoków.

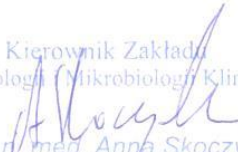
Wprawdzie izolaty *E. faecium* mają naturalnie obniżoną wrażliwość na penicyliny, ale *E. faecalis* poza nielicznymi izolatami, które nabyły oporność, są na nie wrażliwe.

- Na str. 21 napisano, że „Podstawą mechanizmu VRE u enterokoków jest modyfikacja punktu uchwytu w peptydoglikanie, która obniża powinowactwo do glikopeptydów i zmniejsza zdolność wiązania leku, co wpływa na hamowanie syntezy ściany komórkowej”. To glikopeptydy wpływają na hamowanie syntezy ściany komórkowej, ale po modyfikacji punktu uchwytu, nie ma to już miejsca.
- Na str. 68 zamieszczono niezrozumiałe zdanie: „Szczególnie zastanawiający jest fakt niezgodności genotypu *vanB* z fenotypem *vanA*.”
- Na str. 69 „Wcześniejsze badania dowiodły, że szczepy wytwarzające cytolizynę wywoływały zakażenia o cięższym i dłuższym przebiegu, o mniejszych sukcesach terapeutycznych...”

W podsumowaniu pragnę podkreślić aktualność i wagę podjętego w Rozprawie tematu, który posiada ogromne znaczenie kliniczne oraz jasne przedstawienie celów badawczych. Doktorantka wykazała się znajomością tematu i metod, które pozwoliły Jej na realizację postawionych celów. Uzyskane wyniki zostały czytelnie przedstawione i przedyskutowane. Uchybienia językowe, literówki, skróty myślowe i zbyt odważne uogólnienia wymagają poprawy, ale nie umniejszają jakości merytorycznej Rozprawy.

Rozprawa doktorska Mgr Sylwii Kozusko pt. „Charakterystyka szczepów *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* opornych na wankomycynę”, spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, o dopuszczenie Mgr Sylwii Kozusko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Anna Skoczyńska

Kierownik Zakładu
Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej

Dr hab. n. med. Anna Skoczyńska
profesor nadzwyczajny