UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej
20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1
tel./fax 81 448-71-00

Lublin, 7.06.2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Piotra Majewskiego pt. „ Molekularne podstawy oporności na karbapenemy wśród klinicznych szczepów *Enterobacter cloaceae*" wykonanej w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Elżbiety Anny Tryniszewskiej oraz promotora pomocniczego Pana dr n med. Piotra Wieczorka

Enterobacter cloacae jest ważnym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych ze względu na jego szerokie rozpowszechnienie w środowisku, możliwość kolonizacji przewodu pokarmowego oraz wielolekooporność. Ten oportunistyczny drobnoustrój stanowi szczególne zagrożenie dla pacjentów oddziałów intensywnej opieki medycznej. Ważna grupą antybiotyków zachowujących aktywność wobec wieloopornych patogenów są karbapenemy, zwane „lekami ostatniej szansy". Niestety coraz częściej wśród pałeczek Gram-ujemnych, zwłaszcza należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, izolowane są szczepy kliniczne oporne na karbapenemy. Rozprzestrzenianie się bakterii opornych na karbapenemy, w szczególności wytwarzających karbapenemazy, jest ważnym problemem epidemiologicznym i klinicznym.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Majewskiego jest kolejną praca zrealizowaną w zespole badawczym kierowanym przez Panią prof. dr hab. Elżbietę A. Tryniszewską, dotyczącą molekularnych podstaw lekooporności bakteryjnych patogenów występujących w Polsce północno-wschodniej jako ważne czynniki etiologiczne zakażeń szpitalnych.

Celem pracy doktorskiej Pana mgr Piotra Majewskiego była analiza feno- i genotypowa oporności na karbapenemy wśród klinicznych szczepów *E. cloacae*, izolowanych od pacjentów hospitalizowanych w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym oraz Uniwersyteckim Dziecięcym Szpitalu Klinicznym w Białymstoku.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 186 stron oraz zawiera 31 tabel i 66 rycin. Główne rozdziały pracy są typowe dla dysertacji doktorskich o charakterze doświadczalnym, tj. Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Piśmiennictwo. Piśmiennictwo liczy aż 390 pozycji. Moim zdaniem należało dokonać selekcji pozycji literaturowych, pozostawiając tylko te opublikowane w ciągu ostatnich 5-10 lat. Ponadto, w pracy zamieszczono Wykazy tabel i rycin oraz Wykaz skrótów. W Wykazie skrótów niepotrzebnie uwzględniono nawet powszechnie używane skróty, nie wymagające wyjaśnienia. Ponadto, w pracy zamieszczono również rozdział Finansowanie badań, w którym zaznaczono, że badania będące przedmiotem recenzowanej dysertacji były finansowane z dotacji projakościowej Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego w ramach projektu 52-KNOW-2013 „Molekularne mechanizmy oporności na karbapenemy wśród klinicznych szczepów *Enterobacter cloacae*" prowadzonego przez Doktoranta w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej.

We Wstępie, liczącym 34 strony, Doktorant omawia szczegółowo karbapenemy i ich znaczenie we współczesnej antybiotykoterapii, z uwzględnieniem mechanizmów oporności na tę grupę antybiotyków. Podrozdział dotyczący mechanizmów oporności na karbapenemy zasługuje na szczególne wyróżnienie, ponieważ zawiera wyczerpujące i wieloaspektowe przedstawienie problemu, zwracając uwagę na feno- i genotypowe podstawy tych mechanizmów oraz ich różnorodność, współwystępowanie i możliwe interakcje. Doktorant przedstawia również znaczenie bakterii z rodzaju *Enterobacter*, w tym *E. cloacae*, jako czynników etiologicznych zakażeń, zwłaszcza zakażeń szpitalnych. Jednak omawiając lekooporność *Enterobacter* spp. koncentruje się tylko na naturalnych mechanizmach warunkujących to zjawisko.

W rozdziale Materiały i metody (26 stron) Doktorant opisał materiał badawczy, który stanowiło 65 klinicznych izolatów *E. cloacae* podzielonych na 2 grupy: (i) 44 szczepy oporne na co najmniej jeden z karbapenemów (grupa „R"), (ii) 21 szczepów losowo wybranych wrażliwych na karbapenemy (grupa „S"). Ponadto, Doktorant szczegółowo opisał metodykę prowadzonych badań. Badania fenotypowe obejmowały: (i) biochemiczną identyfikację izolatów, (ii) oznaczanie najmniejszego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC) dla badanych karbapenemów, tj. ertapenemu, imipenemu, meropenemu, doripenemu i biapenemu oraz innych, wybranych antybiotyków beta-laktamowych z grupy cefalosporyn: cefepimu, ceftriaksonu, cefotaksymu i ceftazydymu, (iii) wykrywanie zdolności do produkcji beta-

laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) oraz chromosomalnej cefalosporynazy AmpC przy użyciu klasycznego oraz zmodyfikowanego testu dwóch krążków opartego o metodę krążkowo-dyfuzyjną, (iv) wykrywanie zdolności do produkcji karbapenemaz przy użyciu testu kombinacji opartego o metodę krążkowo-dyfuzyjną oraz testu biochemicznego Carba-NP. Badania molekularne obejmowały: (i) izolację genomowego DNA, (ii) izolację i oczyszczanie całkowitego RNA, (iii) projektowanie starterów oligonukleotydowych do reakcji PCR przy użyciu sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) oraz sprawdzanie ich specyficzności przy użyciu bazy BLAST, (iv) amplifikację genów kodujących białka porynowe *ompC* i *ompF*, chromosomalną cefalosporynazę AmpC – *ampC* oraz karbapenemazy z grupy OXA-48, OXA-51, OXA-48, NmcA/IMI i GES w reakcji PCR, (v) ocenę ekspresji genów kodujących chromosomalną cefalosporynazę AmpC – *ampC* oraz białka porynowe *ompC* i *ompF* w reakcji qPCR, (vi) oceną pokrewieństwa genetycznego badanych szczepów metodą MLST (multi-locus sequence typing). Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej przy użyciu odpowiednio dobranych testów, stosując oprogramowania Statistica 12. W tym Rozdziale należałoby dokonać korekty numeracji tabel i rycin w tekście, np. na str. 63. Należy podkreślić, że nowoczesny warsztat badawczy zastosowany przez Doktoranta do rozwiązania problemu naukowego postawionego w recenzowanej pracy jest adekwatny do zakresu planowanych badań.

Rozdział Wyniki, liczący 57 stron, obejmuje omówienie uzyskanych wyników wraz z obszerną dokumentacją w postaci tabel i rycin. W toku badań wykazano, że największy odsetek badanych szczepów *E. cloacae* (ponad 40%), w tym szczepów opornych na karbapenemy (ponad 50%) pochodził od pacjentów hospitalizowanych na Oddziałach Intensywnej Terapii. Wysoki odsetek badanych szczepów (16,9%), w tym szczepów opornych na karbapenemy (15,9%) pochodził od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Hematologii. Największy odsetek badanych szczepów, w tym szczepów opornych na karbapenemy izolowano z materiałów klinicznych pobranych z układu moczowego i oddechowego (ponad 50%). Wszystkie szczepy oporne na karbapenemy (z grupy „R") były oporne na ertapenem oraz na badane cefalosporyny, natomiast w przypadku pozostałych karbapenemów odsetek szczepów opornych i średniowrażliwych wynosił odpowiednio 0-11% i 5-16%. Ponadto, u 41% szczepów z grupy „R" wykazano występowanie ESBL. Zdolność do wytwarzania karbapenemaz wykazano tylko u 2 szczepów z tej grupy; u tych szczepów wykryto gen bla_{OXA-48}. Należy zaznaczyć, że karbapenemazy z grupy OXA-48 są rzadko

izolowane w Polsce. Poszukując mechanizmu oporności na karbapenemy w badanej grupie szczepów w dalszym etapie pracy przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących białka porynowe *ompC* i *ompF* oraz chromosomalną cefalosporynazę AmpC – *ampC*, oceniając relatywne zmiany poziomu ekspresji tych genów. Zdecydowana większość (97,7%) szczepów z grupy „R" wykazywała hiperprodukcję cefalosporynazy AmpC. Najciekawszą część wyników stanowi analiza zmian ekspresji genów kodujących białka porynowe *ompC* i *ompF* w obydwu grupach badanych szczepów, tj. w grupie „R" i grupie „S". W oparciu o uzyskane wyniki wyróżniono dziewięć wariantów genotypowych obrazujących zależności pomiędzy poziomem transkryptów dwóch białek porynowych OmpC i OmpF, tzw. genotypy balansu porynowego. Wykazano, że genotypy balansu porynowego wykazujące polaryzację w kierunku produkcji białka OmpC (wąski kanał porynowy) były charakterystyczne dla szczepów z grupy „R", podczas gdy genotypy balansu porynowego wykazujące polaryzację w kierunku produkcji białka OmpF (szeroki kanał porynowy) były charakterystyczne dla szczepów z grupy „S". Uzyskane wyniki wskazywały, że wśród szczepów grupy „R" polaryzacja balansu porynowego w kierunku produkcji białka OmpC może mieć potencjalny związek z rozwojem oporności na karbapenemy. Kolejny etap pracy dotyczył poszukiwania korelacji pomiędzy obserwowanymi zmianami w ekspresji ww. genów a wartościami MIC dla karbapenenów i cefalosporyn. Wprowadzono również sumaryczny wskaźnik derepresja-polaryzacja, obrazujący hiperprodukcję cefalosporynazy AmpC wraz z wartością polaryzacji balansu porynowego w kierunku białka OmpC. W zależności od badanego antybiotyki współczynniki korelacji wahały się od wartości bardzo wysokiej do umiarkowanej. W ostatnim etapie pracy określono pokrewieństwo genetyczne badanych szczepów metodą MLST. W grupie „R" dominował jeden typ sekwencyjny (ST-89), obejmujący prawie 90% szczepów, co świadczy o klonalnym rozprzestrzenianiu się szczepów opornych na karbapenemy.

W rozdziale Dyskusja (11 stron) Autor dokonał analizy uzyskanych wyników na tle danych dotyczących znaczenia zaburzeń przepuszczalności błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych w rozwoju oporności na antybiotyki beta-laktamowe, w tym na karbapenemy. Rozdział ten świadczy o dużej i ugruntowanej wiedzy Autora w zakresie tematyki związanej z pracą, w tym molekularnych podstaw lekooporności bakterii. Czy mogą prosić o wyjaśnienie znaczenia nadprodukcji chromosomalnej cefalosporynazy AmpC w rozwoju oporności na karbapenemy?

We Wnioskach kończących pracę Autor zwraca uwagę na najważniejsze wyniki uzyskane w pracy. Podkreśla wysoki stopień oporności badanych szczepów *E. cloacae* na etrapenem, postuluje występowanie trzech mechanizmów uczestniczących w rozwoju oporności na karbapenemy (karbapenemazy, nadprodukcja AmpC, polaryzacja balansu porynowego OmpF/OmpC w kierunku białka OmpC) oraz wskazuje na możliwość klonalnego rozprzestrzeniania się szczepów opornych na karbapenemy.

Podsumowując, recenzowana dysertacja doktorska stanowi oryginalne opracowanie, bardzo wartościowe zarówno pod względem poznawczym jak i praktycznym, wpisujące się w ogólnoświatowy trend badań nad lekoopornością bakterii na poziomie molekularnym. Jest to szczególnie ważne w dobie narastającej oporności bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki, zwłaszcza wśród patogenów szpitalnych należących do grupy tzw. patogenów alarmowych. Praca ta posiada wysoką wartość merytoryczną, pomimo pewnych niedociągnięć o charakterze redakcyjnym i błędów edytorskich. Recenzowana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Piotra Majewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej i jej znaczenie w aspekcie ogólnoświatowego problemu oporności bakterii Gram-ujemnych, w tym *Enterobacteriaceae*, na karbapenemy, stawiam wniosek o wyróżnienie tej pracy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej
prof. dr hab. Anna Malm