

dr hab. Tomasz Hauschild, prof. UwB

Zakład Mikrobiologii
Instytut Biologii
Uniwersytet w Białymstoku

OCENA

rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Anny Diany Michalskiej
pt.: „*Molekularne podstawy lekooporności szczepów klinicznych *Proteus mirabilis* na
antybiotyki beta-laktamowe, aminoglikozydy oraz fluorochinolony*”

Gram-ujemne pałeczki należące do rodzaju *Proteus* to drobnoustroje szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, jednak z uwagi na swój oportunistyczny charakter mogą powodować infekcje różnych narządów oraz tkanek miękkich u człowieka. Spośród pięciu gatunków należących do tego rodzaju najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń stanowi *Proteus mirabilis*. Chociaż pod względem częstości infekcji dróg moczowych ustępuje miejsca na rzecz *Escherichia coli* to zakażenia z jego udziałem charakteryzują się dłuższym czasem leczenia oraz występowaniem poważniejszych powikłań zagrażających zdrowiu pacjenta. Nabywając oporność na szeroką gamę antybiotyków β -laktamowych, które w wielu przypadkach stanowią leki pierwszego rzutu, zyskuje miano kluczowego patogenu związanego ze skomplikowanymi zakażeniami dróg moczowych, zwłaszcza w środowisku szpitalnym.

Oporność na szeroką gamę antybiotyków β -laktamowych umożliwiają pałeczkom *Proteus mirabilis*, kodowane plazmidowo, β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) oraz cefalosporynazy AmpC. Geny odpowiedzialne za produkcję enzymów ESBL i AmpC dzięki lokalizacji na ruchomych elementach genomu bakteryjnego ulegają szybkiemu rozprzestrzenianiu się, nawet pomiędzy szczepami należącymi do różnych gatunków. Stale rosnący w ostatnich latach odsetek antybiotykoopornych szczepów *Proteus mirabilis* stwarza poważny problem terapeutyczny i kliniczny, który nabiera jeszcze większego znaczenia, gdy drobnoustrój dodatkowo zyskuje oporność na inne klasy antybiotyków, czy chemioterapeutyki. Szereg badań wskazuje na częstsze występowanie oporności na aminoglikozydy oraz fluorochinolony w populacji ESBL-dodatnich szczepów w porównaniu do populacji szczepów ESBL-ujemnych, dowodząc tym samym współwystępowania, na jednym plazmidzie, genów warunkujących oporność na trzy grupy leków przeciwbakteryjnych.

Rosnący udział wielolekoopornych pałeczek *Proteus mirabilis* w zakażeniach szpitalnych w krajach europejskich i pozaeuropejskich stał się inspiracją dla Pani mgr Anny Diany Michalskiej do podjęcia badań opisujących występowanie, lekowrażliwość i identyfikację genów kodujących najczęściej występujące mechanizmy oporności na β -laktamy, aminoglikozydy oraz fluorochinolony u tego gatunku bakterii. Jasno sformułowane cele pracy zostały w pełni zrealizowane, poza piątym ostatnim, który zakładał ustalenie częstości występowania badanych mechanizmów oporności na β -laktamy, aminoglikozydy i fluorochinolony wśród całej populacji *Proteus mirabilis* objętej czasem badania. Zapewne formułując treść tego celu Doktorantka miała na myśli całą populację, ale ESBL-dodatnich szczepów, a w takim brzmieniu można uznać go bez cienia wątpliwości, podobnie jak cztery pozostałe, w całości zrealizowanym.

Godnym podkreślenia jest fakt, iż założenia podane w celach pracy realizowano na obszernym materiale wyjściowym liczącym prawie pół tysiąca szczepów *Proteus mirabilis*, z których do dalszych szczegółowych analiz wybrano 75 ESBL-dodatnich i 75 ESBL-ujemnych szczepów. O ile wyodrębnienie grupy badawczej dokonano na podstawie jasno sprecyzowanego kryterium tj. produkcja β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym, o tyle nie podano kryterium wyodrębnienia grupy kontrolnej. W tego typu badaniach grupę kontrolną tworzy się zazwyczaj z losowo wybranych szczepów i jak się domyślam tak też zapewne uczyniła Doktorantka, wybierając 75 z puli 423 ESBL-ujemnych szczepów. W następnym podrozdziale Doktorantka omówiła bardzo szczegółowo zastosowane metody badawcze i przedstawiła metody statystyczne, którymi posłużyła się opracowując część wyników badań własnych. Docenić należy pełny opis procedur związanych z wykrywaniem mechanizmu oporności typu ESBL metodą fenotypową, izolacją plazmidowego DNA oraz wszystkich etapów amplifikacji genów oporności wraz z podaniem składu mieszanin reakcyjnych, sekwencją nukleotydową starterów oraz warunkami reakcji PCR, tworząc swego rodzaju mini przewodnik metodyczny ułatwiający innym badaczom wykonanie podobnych doświadczeń bez konieczności sięgania do wielu źródeł literaturowych, z których te dane pochodzą.

Rozdziały Cele pracy oraz Materiał i metody poprzedza bardzo obszerny Wstęp o charakterze monograficznym, w którym Autorka dokonała przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat morfologii, właściwości fizjologicznych i biochemicznych, środowisk występowania, chorobotwórczości, a także szczegółowo opisała szereg czynników wirulencji oraz ich udział w patogenności *Proteus mirabilis*. Połowę wstępu zajmuje opis mechanizmów oporności tej bakterii na antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy i fluorochinolony co jest

jak najbardziej zasadne zważywszy na temat rozprawy doktorskiej. Wstęp jest napisany ciekawie oraz w sposób znakomicie przybliżający temat rozprawy, i pomimo 47 stron tekstu w zwięzły i jasny sposób omawia różnorodne zagadnienia związane z biologią bakterii będącej czynnikiem etiologicznym szpitalnych zakażeń. Jako recenzent nie czułem się znużony czytając, aż tyle stron wstępu, i jestem pewien podobnych odczuć do moich u innych czytelników rozprawy doktorskiej. Myślę, że w obecnym kształcie bez konieczności uzupełnienia o dodatkowe treści, wstęp w formie artykułu przeglądowego powinien być wysłany do czasopisma naukowego o międzynarodowym zasięgu.

Otrzymane wyniki badań, jak pisze sama Autorka rozprawy doktorskiej, utworzyły obszerny raport dotyczący plazmidowych mechanizmów oporności wśród szczepów *Proteus mirabilis* wyizolowanych z materiałów klinicznych pobranych od pacjentów hospitalizowanych w dwóch uniwersyteckich szpitalach województwa podlaskiego. Równie ważnym elementem niniejszego raportu jest jego pierwsza część, w której opisano częstość izolacji ESBL-dodatnich i -ujemnych szczepów w poszczególnych oddziałach obu szpitali i z różnych materiałów klinicznych oraz porównano profile lekowrażliwości w obu grupach szczepów. Wyniki badań własnych, których opis zajmuje 36 stron rozprawy doktorskiej wraz z 4 tabelami i 34 rycinami, przedstawiono w sposób nie budzący jakichkolwiek zastrzeżeń i są bardzo wartościowe wzbogacając naszą wiedzę na temat populacji *Proteus mirabilis* występujących na terenie zamkniętych placówek służby zdrowia.

Oceniając 9-stronicowy tekst opisujący wyniki badań muszę wyrazić swoje uznanie dokonaniom Doktorantki, która nie popełniła żadnego błędu czy to merytorycznego czy stylistycznego, co przy wielopłaszczyznowej interpretacji wielu cząstkowych danych jest rzeczą nader trudną. Obfita dokumentacja wyników badań w postaci przejrzystych rycin i tabel jest dodatkowym walorem recenzowanej rozprawy.

Syntetyczna dyskusja, podobnie jak i wstęp, świadczą o biegłej znajomości zagadnień dotyczących udziału bakterii z gatunku *Proteus mirabilis* w zakażeniach na terenie polskich, europejskich i poza europejskich szpitali oraz zmian we wrażliwości na antybiotyki oraz rozmieszczeniu genów kodujących różnorodne mechanizmy oporności, zmian dynamicznie dokonujących się w okresie ostatnich dziesięcioleci w populacjach pleomorficznej Gram-ujemnej pałeczki. Doktorantka skonfrontowała wyniki własnych badań w sposób jasny i rzeczowy z podobnego typu badaniami prowadzonymi na świecie i opisanymi w niezwykle bogatym ilościowo piśmiennictwie, w tym w przeważającej większości z ostatnich lat. Główną część rozprawy kończą logicznie sformułowane wnioski wynikające z otrzymanych

wyników. Chciałbym w tym miejscu podkreślić niezwykłą drobiazgowość i staranność w prezentacji wyników, świetną dyskusję oraz bardzo wysoki poziom edytorski rozprawy.

Po lekturze rozdziałów Wyniki oraz Dyskusja dowiadujemy się, iż częstość występowania ESBL-dodatnich szczepów w białostockich szpitalach jest stosunkowo niska i porównywalna do notowanej w 13 szpitalach w całej Polsce. Zatem nie jesteśmy wysokowydajnym „producentem” lekoopornych szczepów, w przeciwieństwie do Japonii, gdzie blisko połowa szczepów *Proteus mirabilis* wytwarza β -laktamazy ESBL i z takiego stanu rzeczy powinniśmy być bardzo dumni. Ponadto, północno-wschodnia populacja *Proteus mirabilis* nie jest też źródłem nowych wariantów genów kodujących enzymy ESBL, cefalosporynazy AmpC, metalotransferazy 16S rRNA, enzymy modyfikujące aminoglikozydy, czy białka Qnr, a jedynie różni się od innych populacji tego gatunku bakterii rozpowszecznieniem poszczególnych, znanych nauce, genów.

Streszczenia rozprawy doktorskiej, zarówno w języku polskim, jak i angielskim, w całości odzwierciedlają założenia i cele pracy, metodykę badań oraz uzyskane wyniki. Oba streszczenia poprzedza ostatni rozdział rozprawy - Piśmiennictwo, liczące aż 329 pozycji literaturowych opublikowanych głównie w prestiżowych czasopismach naukowych. Pozycje literaturowe, które posłużyły napisaniu głównych rozdziałów rozprawy zostały doskonale wyselekcjonowane z niezwykle bogatego piśmiennictwa oferowanego ludziom nauki przez różnorodne bazy naukowe. W samej tylko bazie PubMed, po wpisaniu frazy „*proteus mirabilis drug resistance*”, dostępnych jest około 1300 pozycji piśmiennictwa.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr farm. Anny Diany Michalskiej cechuje się, poza nienagannym stylem językowym, wysokim poziomem merytorycznym świadczącym o dużej wiedzy Autorki i umiejętności jej wykorzystania przy opracowaniu wstępu oraz przy formułowaniu założeń pracy i dyskusji wyników. Wymienione przeze mnie nieliczne błędy należy traktować marginalnie oceniając wartość naukową recenzowanej pracy, wartość która w opracowaniach naukowych ma decydujące znaczenie. Dlatego uważam, że rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi prawa wynikające z ustawy o stopniach i tytułach naukowych i wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, 4.05.2015

