

Kraków, 16 listopad 2020



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Prof. dr hab. med. Małgorzata Bulanda
Katedra Mikrobiologii
Collegium Medicum UJ

Recenzja

Pracy doktorskiej Pana mgr farm. Piotra Celejewskiego-Marciniaka o tytule: „Genotypowanie oraz charakterystyka wybranych plazmidów i integronów klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych z rodzaju *Serratia*”.

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

Pracę wykonano w Zakładzie Mikrobiologii Stomatologicznej Wydziału Lekarsko- Stomatologicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska

Promotor pomocniczy: dr n. biol. Renata Wolinowska

Przedstawiona do recenzji praca poświęcona jest charakterystyce (analiza cech fenotypowych i genotypowych) szczepów z rodzaju *Serratia* izolowanych z oddziałów szpitalnym, a w szczególności charakterystyce ruchomych elementów genetycznych tej grupy bakterii, odpowiedzialnych za ich oporność na leki przeciwdrobnoustrojowe.

Niewątpliwie odkrycie i zastosowanie do leczenia leków przeciwdrobnoustrojowych to jedno z najważniejszych odkryć w medycynie XX wieku. Niestety, około 80 lat stosowania (niejednokrotnie nieracjonalne) oraz nadużywania tej grupy leków, doprowadziło do indukcji oporności wśród poszczególnych przedstawicieli drobnoustrojów, co przełożyło się negatywnie na efektywność, skuteczność działania tych leków.

To zjawisko (narastanie oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe) występuje szczególnie w środowisku szpitalnym, ze względu na jego specyfikę, duże zużycie antybiotyków indukujących utratę wrażliwości,

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl

co w efekcie sprzyja nagromadzeniu się drobnoustrojów charakteryzujących się wysoką opornością. Z drugiej strony poprzez nowoczesną medycynę, wykorzystującą szereg inwazyjnych metod diagnostycznych i leczniczych, niejednokrotnie ratujących życie ludzkie, doszło do obniżenia naturalnej odporności u ludzi, co niewątpliwie jest jednym z podstawowych powodów zwiększonej zapadalności na zakażenia, w tym zwłaszcza na zakażenia szpitalne. Obecnie, obok najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń związanych z opieką medyczną jakimi są pałeczki Gram-ujemne, pojawiają się szczepy z rodzaju *Serratia*. Szczepy te, do niedawna były uważane za niegroźne drobnoustroje środowiskowe, jednakże obecnie rozprzestrzeniły się w środowisku szpitalnym, głównie poprzez swą umiejętność przetrwania w środowisku nieożywionym. Jako czynniki etiologiczne różnych form klinicznych zakażeń u hospitalizowanych pacjentów, sprawiają duże trudności terapeutyczne ze względu na występowanie oporności na powszechnie stosowane antybiotyki.

Tym problemom (charakterystyką szczepów z rodzaju *Serratia* w środowisku szpitalnym) jest poświęcona oceniana praca, a więc sam wybór tematu jest bardzo aktualny i mający duże wartości praktyczne, zwłaszcza, że te pałeczki są nadal niewystarczająco poznanym przedstawicielem rzędu *Enterobacteriales*.

Przedstawiona praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich (Wstęp, Metody, Materiały, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis tabel i rycin i Bibliografia.), zawarta jest na 158 stronach maszynopisu. Wstęp poprzedza bardzo dokładny **Wykaz skrótów** stosownie używany w całości dysertacji.

We **wstępie** (dane z piśmiennictwa) zawartym na 30 stronach, Doktorant zapoznaje czytającego, z ogólną charakterystyką, w tym klasyfikacją, systematyką bakterii z rodzaju *Serratia*, metodami fenotypowymi opartymi na unikatowych cechach tych bakterii oraz omawia metody genotypowania szczepów mających zastosowanie w dochodzeniu epidemiologicznym i w poszerzonej charakterystyce badanych szczepów. W następnych podrozdziałach wstępu Autor omawia różne czynniki wirulencji oraz ich zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym oraz wybrane aspekty chorobotwórczości badanych bakterii.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

W ostatnim podrozdziale wstępu szczegółowo omawia zagadnienie oporności (ich mechanizmów) gatunku *S. marcescens* na antybiotyki i inne leki przeciwdrobnoustrojowe, z podziałem na oporność na poszczególne grupy tych leków (antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy i chinolony).

Rozdział napisany jest bardzo przejrzysto, zawiera wiele cennych informacji dotyczących gatunku *Serratia marcescens* i jej szczegółową charakterystykę.

Cel pracy jakim jest stworzenie kolekcji i charakterystyka szczepów *Serratia spp.* pochodzących od chorych hospitalizowanych na terenie Warszawy i okolic, został jasno sformułowany i konsekwentnie realizowany w czasie prowadzonych badań. Na szczególne wyróżnienie zasługuje badanie dotyczące poszukiwania i analiza ruchomych elementów genetycznych (plazmidy, integrony), oraz określenie ich roli w przenoszeniu genów oporności na antybiotyki badanych szczepów.

Rozdział „Materiały” nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Badaniami (początkowo) objęto wybrane (120) szczepy *Serratia spp.* wyizolowane z materiałów klinicznych w siedmiu laboratoriach szpitalnych Warszawy i Otwocka. Szczepy były izolowane w ramach rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej. Szczegółowo opisano użyte szczepy laboratoryjne, stosowane podłoża, zastosowane enzymy, inne odczynniki oraz wykaz testów biochemicznych stosowanych podczas identyfikacji bakterii z wykorzystaniem karty Vitek 2 GN-ID i wykaz leków przeciwdrobnoustrojowych używanych podczas oznaczania lekowrażliwości izolatów. Dodatkowo wymieniono wszystkie stosowane programy komputerowe wykorzystanie do analizy poszczególnych badań.

Z uwag recenzenta, domyślam się, że w tabeli 8, Autor w legendzie pod tabelą użył skrótu PEG i ŻP, a w tabeli (materiał pochodzenia izolatu) chodziło mu o Stomię i Gastrostomię. Zdaniem oceniającej, szkoda, że w kolekcji szczepów nie było szczepów izolowanych z krwi.

Rozdział „Metody” to 18 stronicowe bardzo szczegółowe omówienie wszystkich metod stosowanych w ocenianej pracy. Omówienie jest tak dokładne, że może służyć jako przewodnik przy wykonywaniu badań stosujących poszczególne metody.

ul. Czysza 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl

Wyniki opracowano wyjątkowo starannie, są zawarte w 31 tabelach i zilustrowane w 35 rycinach, co szczególnie ułatwia zapoznanie się z ich treścią. Całość wyników, Autor podzieliła na kilka części.

Doktorant w ramach charakterystyki fenotypowej zweryfikował identyfikację gatunku zaraportowanego w porównaniu do uzyskanych, przy użyciu trzech metod (MALDI-TOF MS, Vitek 2 Compact, API 20E). Ostatecznie po odrzuceniu kilku szczepów do dalszych badań, uwzględniono kolekcję 112 szczepów: 103 izolatów z gatunku *S. marcescens*, 7 z gatunku *S. liquefaciens* i po jednym należących do gatunku *S. fonticola* i *S. ureilytica*.

Poza weryfikacją identyfikacji gatunków, Doktorant wykonał oznaczenie lekowrażliwości na wybrane leki przeciwdrobnoustrojowe oraz oznaczył najważniejsze ich mechanizmy oporności. Zaprezentowane w sposób czytelny wyniki w tabeli 22 (str. 70) określające wartości MIC wybranych leków są bardzo wartościowe dla praktyków. Fenotyp ESBL występował u 18 szczepów, a u dwóch stwierdzono wytwarzanie karbapenemaz typu MBL.

Szczegółowa charakterystyka sekwencji nukleotydowych kodujących β – laktamazy CTX-M wykazała dominację typu CTX-M-15 (ponad 75% szczepów ESBL-dodatnich). Niewątpliwym osiągnięciem jest opisanie przez Autora nowego wariantu β -laktamazy CTX-M-221 będącego hybrydą CTX-M-19 i CTX-M-3 i zdeponowanie w GenBank NCBI unikatowej sekwencji nukleotydowej bla_{CTX-M-221}.

Charakterystyka genotypowa (stosowane metody RAPD, PFGE i analiza plazmidowa DNA) wykazała wysokie zróżnicowanie badanych szczepów. Analiza dendogramów (106 szczepów) wyodrębniła aż 83 różne profile, a ich analiza potwierdziła obecność plazmidów o różnej wielkości. Najliczniejsze to plazmidy zaliczane do grupy niezgodności IncL/M.

W dalszej części badań w ramach poszukiwania i analizy integronów, potwierdzono obecność sekwencji DNA kodującej geny integrazy klasy pierwszej, drugiej i trzeciej, a szczegółowa analiza DNA integronów wykazała dominację udziału genów warunkujących oporność na aminoglikozydy.

Na wyróżnienie zasługuje wykrycie oraz zdeponowanie w GenBank NCBI sekwencji nukleotydowej integronu klasy trzeciej zlokalizowanego na plazmidzie pPCMI3 oraz na plazmidzie pPM120-2.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl

Kolejny rozdział pracy „Dyskusja” zawarty na 18 stronach maszynopisu napisany jest bardzo dobrze. Ten rozdział uważam za bardzo wartościowy. Autor pracy jeszcze raz charakteryzuje kliniczne szczepy *Serratia spp.* Po kolei omawia swoje wyniki badań dotyczące poszczególnych etapów swojej pracy, wnikliwie i krytycznie je analizując, porównując je z wynikami innych autorów zajmujących się tym problemem, przywołuje dobrze wyselekcjonowane piśmiennictwo.

Wnioski (w liczbie 13) wyciągnięte przez Pana mgr farm. Piotra Celejewskiego-Marciniaka są jasno sformułowane, prawdziwe i bezpośrednio wynikające z uzyskanych wyników, w pełni realizujące założony cel pracy. Jedynie uważam, że liczba szczepów, które stworzyły kolekcję poddaną szczegółowym badaniom wynosiła 112 szczepów a nie 120.

Wykorzystane **piśmiennictwo** w całej dysertacji jest imponujące. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt cytowania wielu znaczących pozycji prac pochodzących z ostatnich pięciu lat, zarówno zagranicznych jak i polskich.

Z obowiązku recenzenta, stwierdzam, że Autor w spisie piśmiennictwa zamieścił kilkanaście (14) pozycji, których nie cytuje w tekście pracy i odwrotnie są cytowane w tekście a brak ich w spisie: Rohit, Tien, Naumiuk, Engel, Gautier, Sakanashi,, Bouheraoua , czy zamieszcza różne lata wydania w spisie i tekście np. Barrakuda, Sander- Miranda

W podsumowaniu

stwierdzam, że te nieliczne w/w niedociągnięcia, nie zmniejszają wartości pracy i przedstawiona mi do oceny praca stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego, a jej zawartość wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w danej dziedzinie naukowej.

Pracę oceniam jako bardzo dobrą. W znaczącym zakresie poszerza wiedzę nt. ruchomych elementów genetycznych i ich udziału w procesie nabywania oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe przez bakterie z rodzaju *Serratia*.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

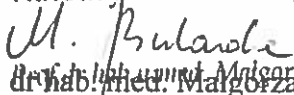
www.km.cm-uj.krakow.pl

Rozprawa doktorska w pełni pełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) w związku z art.179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm).

Zatem pozwalam sobie przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczeniu Pana mgr farm. Piotra Celejewskiego-Marciniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK

Katedry Mikrobiologii UJ CM


Prof. dr hab. med. Małgorzata Bulanda



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

ul. Czysła 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24