

Dr n. med. Tomasz Gosiewski
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Lekarski
Katedra Mikrobiologii
Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Małgorzata Bulanda

Autoreferat

/do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego -załącznik 2/

Opis dorobku i osiągnięć naukowych, zawodowych i dydaktycznych



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Kraków, 2015

SPIS TREŚCI:

1. ŻYCIORYS NAUKOWY I PRZEBIEG KARIERY ZAWODOWEJ. -----	3
1.1. DANE OSOBOWE: -----	3
1.2. ŻYCIORYS -----	3
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE: -----	9
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:-----	10
4. PRZEDSTAWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO: -----	10
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO: -----	10
4.2. CYKL PIĘCIU PUBLIKACJI ORAZ JEDEN PATENT WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO: --	10
4.2.1. <i>Publikacje:</i> -----	10
4.2.2. <i>Patent:</i> -----	11
4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH WYKORZYSTANIA. -----	12
4.3.1. <i>Wstęp:</i> -----	12
4.3.2. <i>Cel przeprowadzonych badań:</i> -----	14
4.3.3. <i>Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego:</i> -----	15
4.3.4. <i>Podsumowanie</i> -----	26
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH. -----	27
5.1. BADANIA NAD SKŁADEM I ROLĄ KOMENSALNEJ FLORY BAKTERYJNEJ I GRZYBICZEJ CZŁOWIEKA W ZDROWIU I W CHOROBIĘ. -----	27
5.2. MOLEKULARNA STRUKTURA POPULACJI, CZYNNIKI WIRULENCJI, DETERMINANTY OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI PACIORKOWCÓW Z GRUPY B (GBS) U KOBIET W CIĄŻY I NOWORODKÓW. -----	31
5.3. OPRACOWANIE I STANDARYZACJA METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ W DIAGNOSTYCE MIKROBIOLOGICZNEJ INNEJ NIŻ DIAGNOSTYKA SEPSY. -----	35
5.4. PRACE WYKRACZAJĄCE POZA OBSZAR GŁÓWNYCH TEMATYK BADAWCZYCH. -----	38

1. Życiorys naukowy i przebieg kariery zawodowej.

1.1. Dane osobowe:

Imię i nazwisko: Tomasz Gosiewski
Data i miejsce urodzenia: 17.09.1978 Kraków
Email: tomasz.gosiewski@uj.edu.pl

1.2. Życiorys

Urodziłem się i wychowałem w Krakowie. W tym mieście przebiegała cała moja edukacja. Egzamin dojrzałości zdałem w czerwcu 1998 roku w Technikum Inżynierii Środowiska i Melioracji w Krakowie. Następnie, w październiku 1998 roku rozpocząłem studia magisterskie na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego. Studia zakończyłem w czerwcu 2003 roku uzyskując tytuł zawodowy magistra biologii w zakresie biologii molekularnej. W trakcie studiów odbyłem czterosemestralne szkolenie w Studium Pedagogicznym UJ, zakończone uzyskaniem certyfikatu kwalifikacji do pracy nauczycielskiej.

Jeszcze w czasie studiów wykazywałem zainteresowanie medycznym aspektem biologii, czego wyrazem była współpraca z Katedrą Mikrobiologii na Wydziale Lekarskim UJ CM, gdzie podczas dwóch ostatnich lat studiów prowadziłem wstępne badania nad możliwością zastosowania klasycznej metody PCR w detekcji komórek bakteryjnych we krwi. Stały się one podstawą do napisania pracy magisterskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra B. Heczko, zatytułowanej „Zastosowanie metody PCR w diagnozowaniu bakteryjnych zakażeń krwi”.

W listopadzie 2003 roku rozpocząłem pracę zawodową na etacie naukowo-technicznym w Katedrze Mikrobiologii UJ CM. Od tego momentu brałem udział w pracach naukowych prowadzonych przez zespół kierowany przez dr hab. Magdalenę Strus, dotyczących głównie badania flory przewodu pokarmowego w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit oraz flory dróg rodnych w przebiegu bakteryjnej waginozy. Równolegle brałem udział w dyżurach wakacyjnych w Pracowni Diagnostyki Mikrobiologicznej działającej przy Katedrze Mikrobiologii, gdzie zdobyłem wiedzę praktyczną i teoretyczną z zakresu medycznej diagnostyki mikrobiologicznej.

W listopadzie 2008 roku uzyskałem stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej na Wydziale Lekarskim UJ CM, na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Ocena flory bakteryjnej jelita grubego dzieci z przewlekłym zapaleniem jelit”, przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra B. Heczko.

W październiku 2010 roku rozpocząłem pracę na stanowisku adiunkta, co pozwoliło mi rozwijać się także w sferze dydaktycznej.

W lutym 2013 roku ukończyłem dwusemestralne studia podyplomowe na Uniwersytecie Ekonomicznym w Krakowie, zatytułowane „Zarządzanie projektem Badawczym i Komercjalizacja Wyników Badań”. Studia te dały mi profesjonalne przygotowanie do zarządzania projektami oraz aplikowania o finansowanie projektów naukowych.

Od maja 2013 roku realizuję czteroletni program specjalizacji z Mikrobiologii w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Pomyślne zdanie Państwowego Egzaminu Specjalizacyjnego umożliwi mi uzyskanie tytułu specjalisty oraz prawa do wpisu na listę Diagnostów Laboratoryjnych.

W trakcie mojej pracy brałem udział w dwóch stażach zagranicznych w German Institute of Human Nutrition (DIfE) w maju 2005 oraz w Crop&Food Research (program FOOD-FRENZ EU-NZ), Palmerston North, Nowa Zelandia w marcu 2008. Miałem okazję poznać warunki pracy oraz nowe techniki badawcze stosowane w badaniach flory przewodu pokarmowego i żywności. Oprócz tego szkoliłem się również w kraju w zakresie technik i metod laboratoryjnych i naukowych, w ramach czego w 2003 roku odbyłem kurs z Bioinformatyki na ówczesnym Wydziale Biotechnologii UJ; w maju 2006 brałem udział w V Szkole Cytometrii Przepływowej organizowanej przez firmę BectonDickinson. Nie zaniebyszałem również warsztatu dydaktycznego i w grudniu 2012 roku odbyłem kurs zaawansowanych technik edukacyjnych w naukach medycznych: „Zaawansowane metody oceny” Projekt Pro bono UJ CM.

Analiza bibliometryczną sporządzoną przez Bibliotekę Medyczną UJ CM (stan na dzień 12.03.2015) wskazuje że łączna punktacja wynosi odpowiednio: IF = 40,227 (łącznie z publikacją poglądową); MNiSW = 482; IC = 127,96). Współczynnik Hirscha jest równy 7, natomiast liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection wyniosła 150. Jestem autorem 31 artykułów, z czego 10 z pierwszym autorstwem. Ponadto, jestem autorem 18 prac popularno-naukowych i współautorem 3 rozdziałów podręcznika w języku polskim. Jestem także pierwszym autorem rozdziału w podręczniku zagranicznym zatytułowanym „Pulse

Field Gel Electrophoresis: Methods and Protocols” pod redakcją Kieran Jordan i Marion Dalmasso wydawanym przez wydawnictwo Springer. Tytuł rozdziału to: „The use of PFGE method in genotyping of selected bacteria species of the *Lactobacillus* genus.” Podręcznik ukaze się w drugiej połowie 2015 roku.

Jestem współautorem 57 doniesień konferencyjnych na zjazdach krajowych (26 doniesień) oraz zagranicznych (31 doniesień).

Przytoczone wyżej wskaźniki bibliometryczne są odzwierciedleniem mojej pracy naukowej zawierające się w czterech szerszych tematach badawczych, którymi się zajmuję. Pierwszy z nich dotyczy diagnostyki molekularnej sepsy, jako alternatywy dla klasycznej diagnostyki opartej na posiewie i hodowli. Pierwsze kroki w ramach tego zagadnienia stawiałem jeszcze podczas przygotowywania mojej pracy magisterskiej w 2003 roku. Udało się wykazać że możliwe jest wykrycie bakterii (bez ich różnicowania) przy pomocy klasycznego PCR w próbkach krwi. W latach 2010-2014 wróciłem do tego tematu i udało mi się znacznie rozwinąć metodykę diagnostyczną patentując nowatorską metodę izolacji DNA drobnoustrojów z krwi (nr prawa wyłącznego 219490). Co więcej, opracowałem również metodę detekcji bakterii i grzybów przy wykorzystaniu techniki nested-multipleks-PCR w czasie rzeczywistym (nmPCR), która została zgłoszona do ochrony patentowej w trybie krajowym i międzynarodowym (procedury w toku). Owocem prac było także pięć artykułów naukowych z listy JCR, które wraz z patentem stanowią podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego.

Kolejnym tematem badawczym którym się zajmuję, jest badanie flory przewodu pokarmowego człowieka w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit (te badania prowadziłem pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Strus) oraz cukrzycy i otyłości (jestem kierownikiem projektu finansowanego przez NCN). Rezultatem tych badań jest do tej pory sześć artykułów w czasopismach z listy JCR posiadających wskaźnik IF.

Równocześnie prowadzę prace badawcze dotyczące nowych technik diagnostyki molekularnej stosowanych w bakteriologii. Do tej pory zajmowałem się opracowaniem metodyki PFGE (Pulsed-field Gradient Gel Electrophoresis) oraz techniki FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) dla kilku gatunków bakterii probiotycznych. Poza tym, opracowałem technikę multipleks-PCR służącą wykrywaniu siedmiu różnych markerów genetycznych bakterii *Streptococcus agalactiae*, która jest użyteczna w diagnostyce zakażeń wywołanych przez tę bakterię. Wynikiem tych prac są dwie publikacje w czasopismach w IF.

Kolejnym tematem badawczym, w którego realizacji brałem udział, są badania nad nosicielstwem oraz czynnikami patogenności *S. agalactiae* (GBS). Badaniami tymi kieruje Pani dr hab. Monika Brzychczy-Włoch z Katedry Mikrobiologii UJ CM. Rezultatem są liczne publikacje w czasopismach z IF, w których 7 jestem współautorem.

Oprócz dorobku czysto publikacyjnego, mam na koncie także osiągnięcia z dziedziny ochrony praw własności intelektualnej. W jego skład wchodzi jeden patent dotyczący metodyki izolowania DNA drobnoustrojów z krwi [Tomasz Gosiewski, Monika Brzychczy-Włoch „**Sposób izolowania DNA drobnoustrojów z krwi**” (nr prawa wyłącznego 219490) Urząd Patentowy RP – decyzja o przyznaniu patentu z dn. 24.09.2014]. Ponadto, dokonałem trzech zgłoszeń patentowych: dwa zgłoszenia w trybie międzynarodowym - metoda izolacji DNA drobnoustrojów z krwi [Tomasz Gosiewski, Monika Brzychczy-Włoch „**Method for efficient isolation of microbial DNA from blood**” World Intellectual Property Organization (WIPO) WO/2014/031018; PCT/PL2013/000109; 27.02.2014] oraz metody nmPCR [Tomasz Gosiewski, Monika Brzychczy-Włoch, Agata Pietrzyk, Małgorzata Bulanda „**Method for simultaneous detection of bacteria and fungi in a biological preparation by PCR primers and a set for the detection of bacteria and fungi**” WO/2014/189398; PCT/PL2014/050029; 27.11.2014] i w trybie krajowym [Tomasz Gosiewski, Monika Brzychczy-Włoch, Agata Pietrzyk, Małgorzata Bulanda “**Sposób jednoczesnej detekcji bakterii i grzybów w preparacie biologicznym metodą PCR, startery oraz zestaw do detekcji bakterii i grzybów**” (P.403996) Urząd Patentowy RP; 21.05.2013].

Dotychczasowy dorobek naukowy jest rezultatem zrealizowanych projektów naukowych, którymi kierowałem lub byłem członkiem zespołu projektowego. W latach 2010-2013 kierowałem projektem własnym finansowanym przez MNiSW - N N401 006739 “**Opracowanie skutecznych metod wykrywania bakterii i grzybów we krwi opartych o detekcję kwasów nukleinowych u chorych z sepsą**”. W latach 2012-2015 kieruję projektem typu SONATA finansowanym przez NCN - 2011/03/D/NZ5/00551 „**Badanie flory bakteryjnej przewodu pokarmowego u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 oraz z otyłością olbrzymią lub patologiczną poddawanych zabiegowi rękawowej resekcji żołądka**”. Oprócz tego, kierowałem mniejszymi projektami, finansowanymi przez UJ CM: K/ZBW/000141 (typ projektu: dotacja dla młodych naukowców) „**Opracowanie metody molekularnego typowania szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus***” (2008-2009); K/ZDS/003832 UJCM (typ projektu: statutowy) „**Ilościowa ocena oporności na makrolidy na przykładzie bakterii *Streptococcus agalactiae* za pomocą metody PCR w czasie**

rzeczywistym w porównaniu do klasycznej metody E – test” (2013); K/ZDS/004624 UJCM (typ projektu: statutowy) „**Opracowanie molekularnej metodyki diagnostyki zakażeń wywołanych przez *Borrelia burgdorferi* – izolacja DNA oraz real time PCR**” (2014-2015). W latach (2009-2012) byłem także współwykonawcą projektu finansowanego przez MNiSW, którego kierownikiem była Pani dr hab. Monika Brzychczy-Włoch: N N401 042337 (typ projektu: własny) „**Charakterystyka izolatów *Streptococcus agalactiae* pochodzących z inwazyjnych zakażeń i od nosicieli oraz analiza immunoreaktywnych antygenów białkowych obecnych na ich powierzchni**”. Ponadto, brałem udział jako wykonawca, w realizacji projektu własnego MNiSW 2P05A 094 29 zatytułowanego „**Rola oksydacyjnych i antyoksydacyjnych właściwości bakterii kwasu mlekowego w patomechanizmach raka jelita grubego**” (2005-2008), którego kierownikiem był prof. dr hab. Piotr B. Heczko. Z sukcesem aplikowałem o grant promotorski N406 029 31/0892 „**Rola jelitowej flory bakteryjnej w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit u dzieci**” realizowany w latach 2007-2008, który stał się podstawą przygotowania mojej rozprawy doktorskiej.

Moja praca naukowa została kilkakrotnie doceniana zarówno przez organizacje międzynarodowe jak i przez władze uczelni. W 2007 roku zostałem laureatem Student Prize Winner podczas International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Open Forum w Royal College of Physician w Londynie. Trzykrotnie przyznawano mi stypendia konferencyjne: marzec 2006 – 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases w Nicei, Francja; maj 2008 – 8th International Meeting of Microbial Epidemiological Markers w Zakopanem; październik 2013 – 10th International Meeting of Microbial Epidemiological Markers w Paryżu. W sierpniu 2013 została mi przyznana nagroda FEMS (Federation of European Microbiological Societies) dla młodego naukowca - Young Scientist Meeting Grant (YSMG) of FEMS. Również Dziekan Wydziału Lekarskiego UJ CM dwukrotnie przyznał mi nagrodę za działalność naukową za roczny impact factor w latach 2010 i 2014.

Jako naukowiec, jestem członkiem towarzystw naukowych takich jak: Europejskie Towarzystwo Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases); Polskie Towarzystwo Mikrobiologów PTM; Polskie Towarzystwo Zakażeń Szpitalnych PTZS oraz Polskie Towarzystwo Probiotyczne i Prebiotyczne PTPP, którego byłem członkiem Zarządu w latach 2013-2014.

Staram się także pracować na rzecz środowiska naukowego, co przejawia się w postaci licznych inicjatyw w których brałem i biorę aktywny udział. Byłem członkiem

komitetów organizacyjnych trzech konferencji: międzynarodowej konferencji probiotycznej EUPROBIO 2005 i EUPROBIO 2008 w Krakowie oraz krajowej, XVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Zakażeń Szpitalnych, Solina 2011. Reprezentuję tzw. niesamodzielných pracowników naukowych na forum Rady Wydziału Lekarskiego UJ CM od roku akademickiego 2012/2013 do chwili obecnej. Jestem członkiem zespołu redakcyjnego *International Journal of Gastroenterology Disorders & Therapy*. Poza tym, posiadam doświadczenie w roli recenzenta artykułów naukowych skierowanych do redakcji następujących czasopism: *Plos One*; *BMC Clinical Pathology*; *BMC Infectious Diseases*; *African Journal of Microbiology Research*; *Folia Microbiologica*; *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*; *Journal of Medical Mycology*, *Medical Mycology* oraz *Zakazenia*. Od kilku lat jest wykonuję recenzje wniosków grantowych dla Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) w ramach Programu Badań Stosownych PBS – 26 recenzji i jedna recenzja w ramach programu INNOTECH.

Oprócz pracy naukowej, zajmuję się także nauczaniem. Od 2010 roku pracuję na stanowisku adiunkta, co wiąże się z prowadzeniem zajęć dydaktycznych dla studentów kierunku lekarskiego (mikrobiologia lekarska oraz mikrobiologia kliniczna), stomatologii (mikrobiologia jamy ustnej), dietetyki (mikrobiologia ogólna i żywności), pielęgniarstwa oraz weterynarii (mikrobiologia weterynaryjna). Biorę także udział w prowadzeniu kursów dla lekarzy specjalizujących się w mikrobiologii lekarskiej oraz dla diagnostów laboratoryjnych specjalizujących się w mikrobiologii medycznej. Moja działalność dydaktyczna wykraczała poza standardowe obowiązki nauczyciela akademickiego niebędącego samodzielnym pracownikiem naukowym, ponieważ byłem promotorem jednej pracy magisterskiej (2013r) oraz trzech prac licencjackich (2014r) studentów kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ. W roku 2015 podjąłem się funkcji promotora jednej pracy licencjackiej i jednej pracy magisterskiej na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie. Jestem także opiekunem naukowym dwóch doktoratów prowadzonych w Katedrze Mikrobiologii UJ CM – mgr Agnieszki Sroki oraz lek. Dominiki Salamon.

Byłem również opiekunem praktyk wakacyjnych dwóch studentów biologii WBiNoZ UJ.

Z pracą dydaktyczną ściśle łączy się także działalność na polu popularyzacji nauki. Od 2011 roku jestem współpracownikiem Uniwersytetu Dzieci (UD) czyli ogólnopolskiego programu edukacyjnego skierowanego do dzieci w wieku 6-14 lat. UD działa pod patronatem rektorów większości uczelni wyższych w Krakowie, m.in. pod auspicjami JM Rektora UJ,

prof. dr hab. med. Wojciecha Nowaka. Uniwersytet Dzieci posiada oddziały w Krakowie, Warszawie, Wrocławiu i Olsztynie. W ramach pracy w UD w sposób zabawny, przystępny oraz praktyczny przybliżam młodym ludziom problematykę mikrobiologii, zakażeń oraz higieny. Do tej pory przeprowadziłem zajęcia dla ok 1900 dzieci w ramach cykli zajęć: „Dlaczego zarazki lubią brud na rękach?”; „Jak zobaczyć niewidzialne?”; „Jak pozbyć się zarazków?”; „Czy bakterie zawsze są złe?”; Mikrobiologia, czyli jak wygrać z niewidzialnym wrogiem?”. W marcu 2012 roku byłem gościem Dziecięcego Uniwersytetu w Krzeszowicach, gdzie wygłosiłem wykład zatytułowany „Bakterie – nasi wrogowie czy przyjaciele?”.

Do tej pory napisałem 17 artykułów popularno-naukowych opublikowanych w serwisie internetowym www.medonet.pl oraz 1 artykuł dotyczący diagnostyki mikrobiologicznej, opublikowany w serwisie internetowym www.dolinabiotechnologiczna.pl. Tematyka tych artykułów dotyczyła szeroko rozumianej problematyki mikrobiologii medycznej i chorób zakaźnych, a były one kierowane do osób zainteresowanych ochroną zdrowia lecz nie posiadających wykształcenia medycznego.

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- czerwiec 2003 - dyplom magistra biologii w zakresie biologii molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Jagielloński w Krakowie; praca magisterska pt. „Zastosowanie metody PCR w diagnozowaniu bakteryjnych zakażeń krwi” – promotor pracy, prof. dr. hab. Piotr B. Heczko
- czerwiec 2003 – dyplom ukończenia Studium Pedagogicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; nabyte kwalifikacje do pracy nauczycielskiej
- listopad 2008 – dyplom doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie; tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena flory bakteryjnej jelita grubego dzieci z przewlekłym zapaleniem jelit” - promotor pracy, prof. dr. hab. Piotr B. Heczko
- luty 2013 – dyplom ukończenia studiów podyplomowych „Zarządzanie projektem Badawczym i Komerccjalizacja Wyników Badań” na Uniwersytecie Ekonomicznym w Krakowie
- w trakcie odbywania specjalizacji zawodowej z Mikrobiologii w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym – planowany czas zakończenia, maj 2017 roku

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 2003 – 2010 Katedra Mikrobiologii UJ CM: etat naukowo – techniczny
- 2010 – nadal: Katedra Mikrobiologii UJ CM: adiunkt

4. Przedstawienie osiągnięcia naukowego:

Na podstawie art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Opracowanie metod izolacji DNA drobnoustrojów z krwi oraz nested-multipleks-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania mikroorganizmów we krwi u pacjentów z sepsą, a także badanie ich skuteczności w porównaniu do metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oraz testu Septifast i metody hodowli”

Badania były prowadzone w ramach projektu N N401 006739 finansowanego przez MNiSW w latach 2010-2013.

4.2. Cykl pięciu publikacji oraz jeden patent wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

4.2.1. Publikacje:

1. Zastosowanie metod PCR i FISH w szybkiej diagnostyce bakteryjnych zakażeń krwi.
Tomasz Gosiewski, Agata Pietrzyk, Monika Brzychczy-Włoch, Piotr B. Heczko.
Ann. Acad. Med. Siles. 2011, 65, 5-6, 14-22
(MNiSW = 4)

2. Evaluation of the activity of thermostable DNA polymerases in the presence of heme, as a key inhibitor in the real time PCR method in diagnostics of sepsis.
Tomasz Gosiewski, Monika Brzychczy-Włoch, Agata Pietrzyk, Agnieszka Sroka, Małgorzata Bulanda; Acta Biochim Pol. 2013; 60: 603-606
(IF = 1,389; MNiSW = 15)

3. Comparison of Methods for Isolation of Bacterial and Fungal DNA from Human Blood.
Tomasz Gosiewski, Leszek Szała, Agata Pietrzyk, Monika Brzychczy-Włoch, Piotr B. Heczko, Małgorzata Bulanda; Curr Microbiol. 2014; 68: 149-155
(IF = 1,359; MNiSW = 20)

4. A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood.
Tomasz Gosiewski, Danuta Jurkiewicz-Badacz, Agnieszka Sroka, Monika Brzychczy-Włoch, Małgorzata Bulanda; BMC Microbiol 2014; 14: 144
(IF = 2,976; MNiSW = 30)

5. Comparison of nested, multiplex, qPCR; FISH; SeptiFast and blood culture methods in detection and identification of bacteria and fungi in blood of patients with sepsis.
Tomasz Gosiewski, Agnieszka Flis, Agnieszka Sroka, Anna Kędzierska, Agata Pietrzyk, Jolanta Kędzierska, Rafał Drwiła, Małgorzata Bulanda; BMC Microbiol 2014; 14: 2323
(IF = 2,976; MNiSW = 30)

4.2.2. Patent:

Tomasz Gosiewski, Monika Brzychczy-Włoch „Sposób izolowania DNA drobnoustrojów z krwi” (nr prawa wyłącznego 219490) Urząd Patentowy RP – decyzja o przyznaniu patentu z dn. 24.09.2014

Łączna wartość bibliometryczna publikacji wynosi: **IF = 8,7; MNiSW = 99**

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania.

4.3.1. Wstęp:

Zakażenia wywoływane przez bakterie i grzyby od zawsze stanowiły poważny problem medyczny. Najgroźniejszym z nich są ogólnoustrojowe zakażenia czyli sepsy określane czasem mianem posocznic. Mimo postępów w ich leczeniu osiągniętych głównie dzięki zastosowaniu antybiotykoterapii oraz wprowadzenia do praktyki medycznej technologii pozwalających na długotrwałe podtrzymywanie czynności życiowych u pacjentów znajdujących się w stanie krytycznym, nadal nie udaje się utrzymać przy życiu wielu chorych. Paradoksalnie, w miarę rozwoju wiedzy medycznej i wprowadzaniu do leczenia coraz to nowszych procedur terapeutycznych, zapadalność na sepsę się zwiększa. Jest to związane z coraz częstszym stosowaniem procedur inwazyjnego leczenia oraz sukcesywnym wydłużaniem się wieku pacjentów, którzy z tego powodu coraz częściej wymagają hospitalizacji. Sepsa jest największym zagrożeniem dla osób z obniżoną odpornością, zwłaszcza kiedy są one długotrwałe hospitalizowane, głównie na oddziałach intensywnej opieki medycznej. Dotyka ona przede wszystkim pacjentów ze schorzeniami nowotworowymi, w immunosupresji, chorych oparzonych, osób w podeszłym wieku oraz dzieci. Sepsa stanowi wyzwanie nie tylko medyczne ale również olbrzymie obciążenie finansowe dla szpitali. Pacjenci z jej objawami, a zwłaszcza z jej ciężką odmianą, powodującą wystąpienie dysfunkcji narządów, wymagają bezwzględnej hospitalizacji na oddziałach intensywnej terapii (OIT), co przyczynia się do generowania dużych kosztów.

W leczeniu zakażeń krwi niezwykle istotnym problemem decydującym o skuteczności terapii i w konsekwencji o kosztach i czasie hospitalizacji jest skuteczna diagnostyka czynników etiologicznych wywołujących ogólnoustrojową odpowiedź zapalną w przebiegu sepsy. Oznaczenie czynnika etiologicznego pozwala na zastosowanie efektywnej antybiotykoterapii.

Do tej pory tzw. „złotym standardem” diagnostycznym są hodowle krwi prowadzone na specjalnych podłożach, najlepiej w systemach hodowli automatycznej. Do zalet tych metody należy ich prostota oraz względnie niski koszt wykonania badania. Słabą stroną metody opartej na hodowli krwi jest jej czasochłonność, sięgająca nawet 7 dni (do czasu wydania wyniku badania) oraz niska czułość, która powoduje że jedynie w ok. 15-30% hodowli udaje się uzyskać wzrost mikroorganizmów. Sytuację dodatkowo pogarsza fakt

poddawania pacjentów antybiotykoterapii zanim dojdzie do pobrania próbek krwi na posiew - chorzy są często leczeni antybiotykami zanim dochodzi do manifestacji objawów sepsy. Hodowle krwi w takim wypadku są bardzo utrudnione z uwagi na to iż znajdują się w niej antybiotyki hamują namnażanie się drobnoustrojów.

Poszukiwane są inne, alternatywne metody detekcji drobnoustrojów we krwi, które mogłyby skrócić czas diagnostyki w laboratorium, a także cechujące się większą czułością. Alternatywę daje biologia molekularna, która umożliwia precyzyjną oraz szybką detekcję markerów genetycznych drobnoustrojów. Na czoło wysuwają się techniki oparte o metodę amplifikacji kwasów nukleinowych PCR. Niestety, wykrywanie mikroorganizmów bezpośrednio we krwi napotyka szereg trudności związanych z bardzo małą ich liczbą w próbce, obecnością inhibitorów (z których najbardziej istotnym jest hem) zaburzających proces amplifikacji DNA oraz koniecznością uzyskania bardzo dobrej jakości izolatów kwasów nukleinowych. Wymienione trudności sprawiły, że do tej pory na rynku dostępne są bardzo nieliczne zestawy diagnostyczne stosowane w molekularnej diagnostyce sepsy, takie jak np. SeptiFast (Roche), SeptiTest (Molzym) czy VYOO (SIRS-Lab). Alternatywą dla metod amplifikacji kwasów nukleinowych może być metoda FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) stosowana jednak do tej pory tylko w wypadku próbek krwi po hodowli, co wymusza konieczność oczekiwania na namnożenie się drobnoustrojów. W literaturze pojawiają się także doniesienia na temat wykorzystania metody opartej o detekcję białek, która daje możliwość detekcji gatunku – jest to metoda MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spektrometry) oraz jej komercyjny odpowiednik Sepsityper (Bruker Daltonics), która wymaga jednak wcześniejszego wyhodowania drobnoustroju.

Szybka i nowoczesna diagnostyka sepsy wymaga zatem zastosowania metod które będą umożliwiały wykrywanie drobnoustrojów bezpośrednio w próbce krwi pacjenta w czasie do kilku godzin, co zwiększy szanse na wdrożenie skutecznej terapii.

Pierwsze próby zastosowania metody PCR do wykrywania śladów obecności bakterii we krwi pacjentów z sepsą przeprowadziłem jeszcze w trakcie moich studiów magisterskich. Stały się one podstawą do napisania pracy magisterskiej zatytułowanej „Zastosowanie metody PCR w diagnozowaniu bakteryjnych zakażeń krwi” i obronionej na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ w czerwcu 2003 roku. Badania polegały na zastosowaniu klasycznego PCR i uwidocznieniu prążków na żelu elektroforetycznym, których obecność wskazywała na

ogólną obecność bakterii w badanych próbkach krwi. Te bardzo wstępne wyniki stały się podstawą do przygotowania wniosku grantowego skierowanego do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, które w 2010 roku przyznało finansowanie na realizację projektu N N401 006739 zatytułowanego “Opracowanie skutecznych metod wykrywania bakterii i grzybów we krwi opartych o detekcję kwasów nukleinowych u chorych z sepsą”. W ramach projektu zaprojektowano wydajną metodę izolacji DNA drobnoustrojów z krwi; oceniono przydatność enzymów polimeraz DNA do amplifikacji PCR; zaprojektowano metodę nested-multipleks PCR w czasie rzeczywistym (wykrywanie wszystkich gatunków bakterii i grzybów); opracowano metodę FISH do wykrywania bakterii bezpośrednio (in situ) w próbkach krwi oraz sprawdzono działanie komercyjnego testu diagnostycznego SeptiFast (Roche).

4.3.2. Cel przeprowadzonych badań:

Celem badań których wyniki są podstawą osiągnięcia naukowego, było opracowanie metodyki izolowania DNA drobnoustrojów bakteryjnych i grzybiczych z krwi oraz nowej metody nested-multipleks-PCR w czasie rzeczywistym (nmPCR) do wykrywania bakterii oraz grzybów bezpośrednio we krwi pacjentów z klinicznymi objawami sepsy, a także porównanie jej skuteczności z metodą FISH w materiale bezpośrednim (próbka krwi), i z komercyjnym zestawem SeptiFast (Roche) i klasycznym posiewem krwi. Badania prowadzono na próbkach krwi pochodzących z Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii oraz z Oddziału Neuroinfekcji i Neurologii Dziecięcej Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II na podstawie zgody Komisji Bioetycznej UJ KBET/94/B/2009.

Cele szczegółowe:

1. Badania pilotażowe - zastosowanie klasycznego PCR do wykrywania bakterii na podstawie sekwencji 16SrRNA w krwi – **publikacja nr 1**
2. Badania nad wpływem hemu na aktywność wybranych enzymów polimeraz oraz wybór najmniej wrażliwego na inhibicję – **publikacja nr 2**
3. Opracowanie skutecznej metody izolacji DNA wszystkich drobnoustrojów z krwi – **publikacja nr 3 i patent**
4. Opracowanie metody detekcji bakterii i grzybów w próbce krwi przy pomocy metody nmPCR – **publikacja nr 4**

5. Porównanie skuteczności metody nmPCR z metodą FISH, zestawem SeptiFast (Roche) oraz hodowlą krwi – **publikacja nr 5.**

4.3.3. Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego:

Publikacja nr 1

(badania pilotażowe - zastosowanie klasycznego PCR do wykrywania bakterii na podstawie sekwencji 16SrRNA w krwi)

Praca miała charakter badań pilotażowych. W ich ramach przeprowadzono badania polegające na zastosowaniu klasycznej amplifikacji PCR przy użyciu pary starterów, pozwalających na wykrycie obecności bakterii w badanych próbkach krwi. Wyniki uzyskiwano na agarozowym żelu elektroforetycznym. Jednocześnie, podjęto próbę wykorzystania metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) do detekcji bakterii bezpośrednio w badanych próbkach krwi. Do tej pory w literaturze naukowej opisywano zastosowanie FISH do wykrywania i różnicowania gatunkowego bakterii w sepsie, ale tylko w dodatnich hodowlach krwi. Przeprowadzono też badania płynów hodowlanych po hodowli krwi.

Próbki krwi pochodziły od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy. Pacjenci byli kwalifikowani do badania przez lekarza. Równolegle z badaniami przy pomocy metody PCR i FISH, próbki krwi były poddawane rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, przy pomocy metody posiewu.

Odsetek wyników pozytywnych dla próbek krwi wynosił: 71,4%; 28,6% i 10,7% odpowiednio dla PCR, FISH i hodowli krwi. Różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi za pomocą metod PCR i FISH oraz PCR i hodowli krwi były statystycznie istotne. W przypadku analizy próbek podłoż hodowlanych, odsetek wyników dodatnich dla metody FISH wynosił 58,3%, natomiast dla metody hodowlanej 33,3%. Różnica ta nie była statystycznie istotna. Czas potrzebny do uzyskania wyniku badania przy użyciu metod PCR i FISH wynosił ok. 4-5 godzin.

Uzyskane rezultaty wstępnie potwierdziły skuteczność metody PCR i FISH w szybkiej diagnostyce bakteryjnych zakażeń krwi.

Publikacja nr 2

(badania nad wpływem hemu na aktywność wybranych enzymów polimeraz oraz wybór najmniej wrażliwego na inhibicję)

Amplifikacja DNA przy pomocy metody PCR pozwoliła na rewolucję w dziedzinie biologii molekularnej oraz w diagnostyce medycznej. Metoda pozwala na bardzo szybkie namnożenie materiału genetycznego w ilościach takich, że możliwa jest jego dalsza analiza, np. sekwencjonowanie czy detekcja markerów genetycznych obecności konkretnych drobnoustrojów w badanym materiale. Kluczowym elementem każdej amplifikacji PCR jest enzym termostabilnej polimerazy DNA. Jak każdy enzym, ma on swoją kinetykę działania zależną od warunków prowadzenia reakcji enzymatycznej (tutaj amplifikacji DNA). Enzymy polimeraz są wrażliwe na inhibitory, z których najbardziej istotnym jest hem, blokujący aktywność katalityczną polimerazy DNA. Hem jest istotnym składnikiem hemoglobiny, która znajduje się w dużych ilościach we krwi. W literaturze można odnaleźć doniesienia na temat różnego rodzaju preparatyki próbek krwi, aby wyeliminować efekt inhibicji PCR. Zazwyczaj są to sposoby polegające na dokładnym przepłukiwaniu próbek czy też ich rozcieńczaniu lub dodawaniu do mieszaniny reakcyjnej np. albuminy wołowej (BSA), glicerolu czy dekstranu lub innych substancji ochronnych, które stanowią dla inhibitorów dodatkowy cel i zmniejszają ich oddziaływanie na polimerazę.

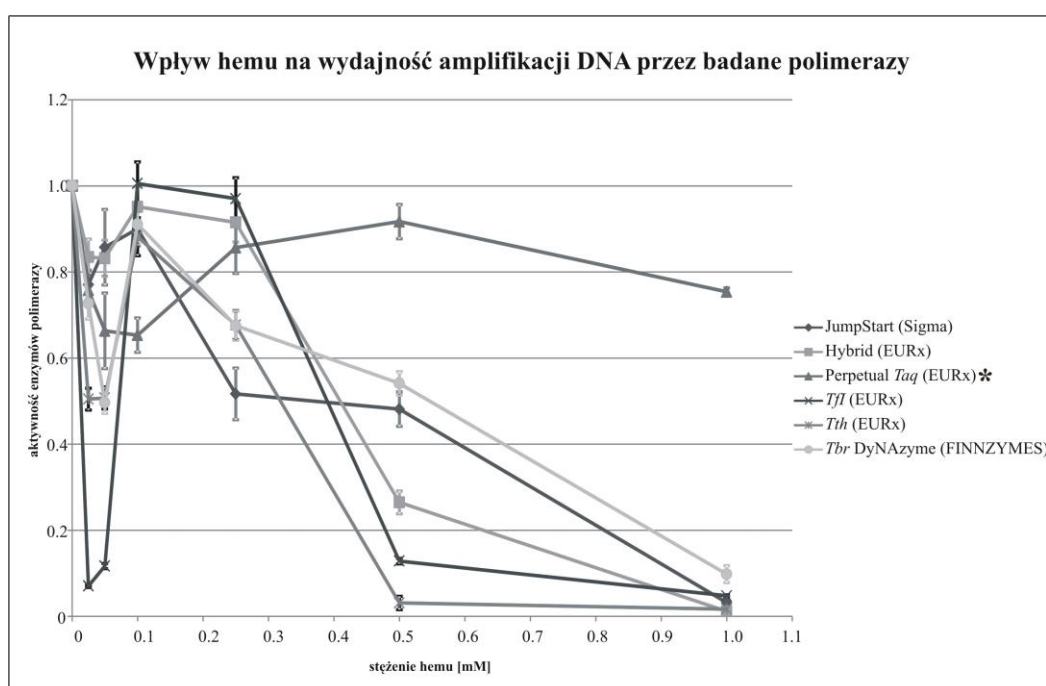
Celem pracy była ocena przydatności termostabilnych polimeraz DNA w celu wybrania najbardziej odpornego na działanie hemu. Jednocześnie sprawdzono czy suplementacja mieszaniny reakcyjnej substancjami ochronnymi wpływa na aktywność enzymatyczną polimeraz.

W badaniach wykorzystano DNA szczepu wzorcowego *Escherichia coli* ATCC25922, którego DNA było amplifikowane oraz zestaw komercyjnych enzymów polimeraz DNA z aktywnością egzonukleazy (5' → 3'): JumpStart *Taq* (Sigma); Hybrid (EURx); Perpetual *Taq* (EURx); *Tfl* (EURx); *Tth* (EURx); *Tbr* (FINNZYMES). Amplifikację prowadzono w czasie rzeczywistym przy użyciu aparatu CFX96 (BioRad). Badanie polegało na amplifikacji 1 µl (2,5 ng/ml) DNA *E. coli* przy pomocy polimeraz w wytworzonym gradiencie stężenia hemu (Sigma) (0 mM – 1,0 mM). Miarą aktywności enzymów był stosunek czułości reakcji (wyrażony wartością parametru C_T^1) w danym stężeniu hemu do czułości w próbce kontrolnej (bez hemu). Kolejnym etapem badania była analiza wpływu siedmiu substancji o potencjale ochronnym (w gradiencie ich stężenia 0% – 2%) na czułość

¹ C_T , tj. numer cyklu reakcji w którym liniowy przyrost produktu przeciął ustaloną linię bazową

i wydajność reakcji amplifikacji DNA *E. coli*: albumina wołowa (BSA) (Sigma); albumina owcza (SSA) (Sigma); betaina (Sigma); DMSO (Sigma); glikogen (Sigma); dextran (Sigma); Triton-X100 (Sigma). Amplifikację prowadzono przy użyciu polimerazy która okazała się najbardziej odporna na inhibicję hemem oraz z dodatkiem badanej substancji ochronnej.

Najwyższą aktywność w obecności hemu zachowała polimeraza Perpetual *Taq* (EURx), której aktywność nie spadła poniżej poziomu 0,65, a wynik ten był istotnie różny ($p < 0,001$) od pozostałych badanych polimeraz (ryc. 1). Z kolei wyniki wpływu substancji ochronnych na tę polimerazę wskazywały, że zarówno czułość jak i wydajność reakcji amplifikacji były niższe niż w próbce kontrolnej (bez dodatku substancji ochronnej) w przypadku każdej z badanych substancji.



Ryc. 1 Porównanie wpływu hemu na aktywność enzymów polimeraz; * - aktywność enzymu istotnie różna ($p < 0.001$) od pozostałych badanych w każdym punkcie pomiarowym.

Do dalszych badań wybrano polimerazę Perpetual *Taq* (EURx) oraz wykazano, że stosowanie protektorów polimeraz wpływa negatywnie na proces amplifikacji DNA.

Publikacja nr 3 i patent

(opracowanie skutecznej metody izolacji DNA wszystkich drobnoustrojów z krwi)

Bardzo ważnym etapem diagnostyki przy wykorzystaniu techniki PCR jest jakość DNA. W przypadku izolowania DNA drobnoustrojów z krwi, konieczne jest uzyskanie wysoko oczyszczonego z hemu preparatu oraz odzyskanie możliwie jak najwięcej kwasów

nukleinowych bakterii czy grzybów, których miana we krwi są bardzo niskie. Różne gatunki tych drobnoustrojów, charakteryzują się zróżnicowaną podatnością na lizę komórek, z uwagi na budowę ich ścian komórkowych i co za tym idzie, możliwością pozyskania z nich DNA. W literaturze naukowej brakuje opisu metod izolacji DNA z krwi skutecznej jednocześnie w przypadku bakterii, jak i grzybów. Wiele prac przedstawia metody sprowadzające się albo tylko do izolacji DNA eukariotycznego z leukocytów lub też osobno z bakterii albo tylko z grzybów, co wydłuża czas preparatyki próbki oraz zwiększa koszty.

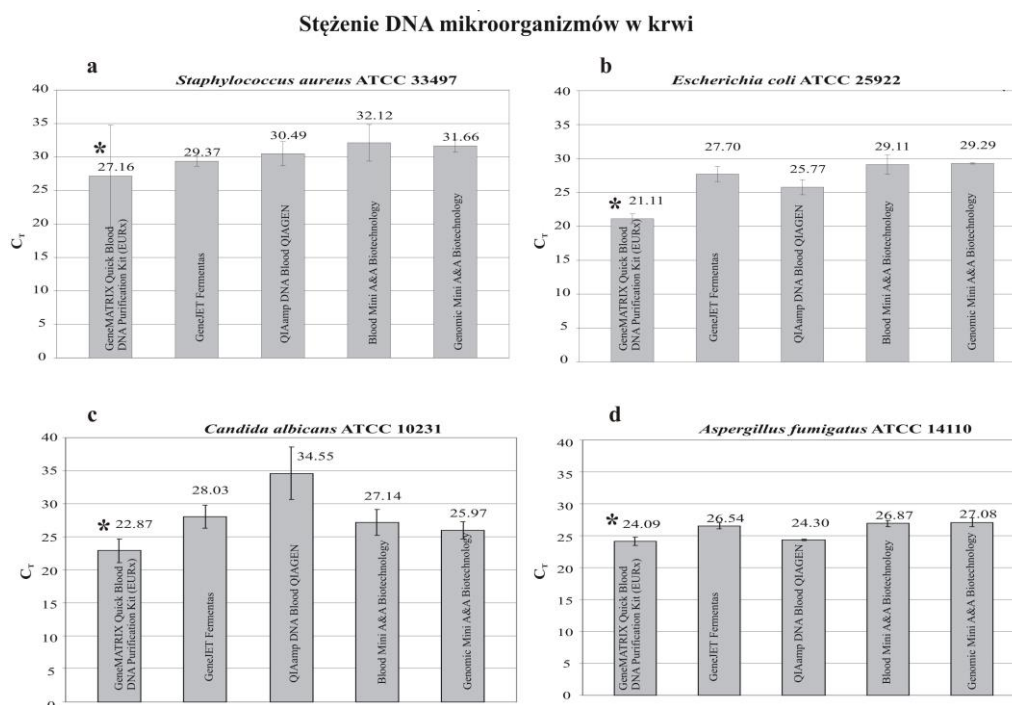
Celem pracy było opracowanie kompleksowej metody izolacji DNA drobnoustrojów (bakterii i grzybów) niezależnie od typu budowy ściany komórkowej oraz uzyskanie izolatu o możliwie najwyższej czystości i stężeniu DNA drobnoustrojów. Wyniki badań zaowocowały nie tylko publikacją naukową, ale też uzyskaniem patentu na nowatorską metodę izolacji DNA drobnoustrojów z krwi (nr prawa wyłącznego: 219490).

W badaniach wykorzystano cztery szczepy wzorcowe, będące przedstawicielami grup drobnoustrojów zróżnicowanych pod względem budowy ściany komórkowej: Gram ujemna *Escherichia coli* ATCC25922, Gram dodatni *Staphylococcus aureus* ATCC33497, grzyb drożdżowy *Candida albicans* ATCC10231 i grzyb strzępkowy *Aspergillus fumigatus* ATCC14110, którymi sztucznie inokulowano jałową krew pochodzącą od zdrowych wolontariuszy, tak aby uzyskać liczbę ich komórek rzędu 10^6 CFU/ml dla każdego z nich.

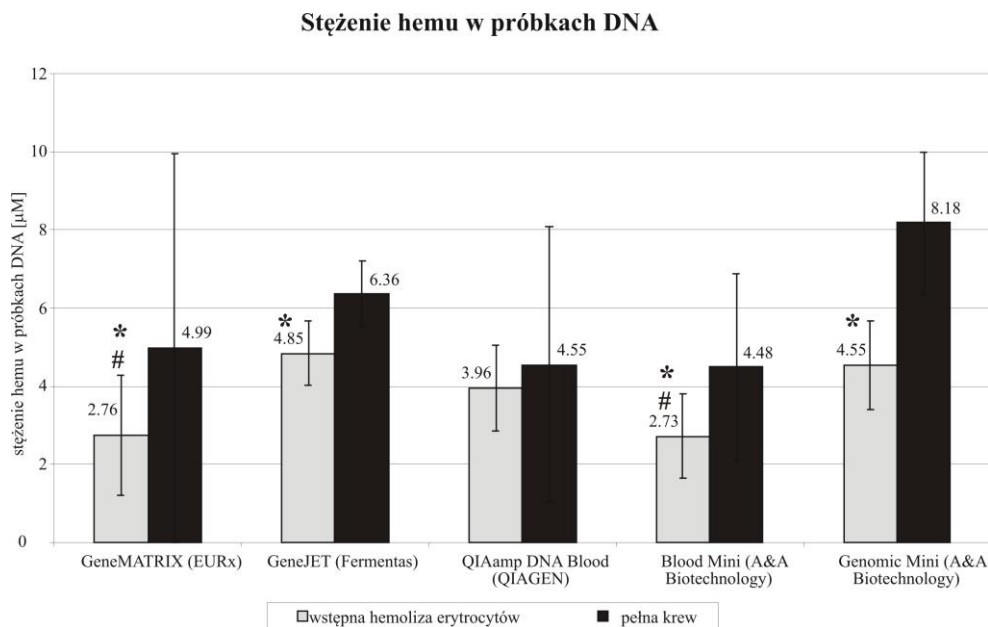
Opracowanie i standaryzacja metody izolacji DNA polegała na testowaniu różnych wariantów wstępnej preparatyki próbek krwi: (a) próbki poddawano lizie erytrocytów w roztworze 0,17 M chlorku amonu (Sigma) (równolegle izolowano DNA z pominięciem tego etapu, aby porównać wyniki); (b) stosowano dezintegrację mechaniczną w obecności szklanych kuleczek ϕ 710 – 1180 μ m (Sigma) w aparacie FastPrep (MP Biomedicals); (c) prowadzono lizę enzymatyczną bakterii w obecności enzymów lizozymu (2mg/ml), lizostafiny (0,2mg/ml) i litykazy 40U (Sigma) w temperaturze 37°C; (d) próbki poddawano działaniu 50 mM NaOH (POCH) w temperaturze 95°C. W dalszym etapie ze wstępnie spreparowanych próbek izolowano DNA przy wykorzystaniu komercyjnych zestawów (zgodnie z zaleceniami producentów): GeneMATRIX Quick Blood DNA Purification Kit (EURx); GeneJET (Fermentas); QIAamp DNA Blood (QIAGEN); Blood Mini (A&A Biotechnology); Genomic Mini (A&A Biotechnology). Zawartość DNA drobnoustrojów w próbkach wyznaczono za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu specyficznych gatunkowo starterów i sond TaqMan oraz zestawu JumpStart Taq ReadyMix (Sigma), wyznaczając wartość C_T , tj. numer cyklu reakcji w którym liniowy przyrost

produktu przeciął ustaloną linię bazową. Wszystkie procesy amplifikacji prowadzono w termocyklerze CFX96 (BioRad). Stężenie oraz czystość izolatów całkowitego DNA w próbkach mierzono spektrofotometrycznie przy długości fal: 260 nm i 280 nm. Stężenie hemu w próbkach mierzono przy długości fali 388 nm. Pomiaru dokonano w izolatach uzyskanych z pełnej krwi oraz poddanych wstępnej hemolizie erytrocytów. Pomiar przeprowadzono przy pomocy aparatu NanoDrop (Thermo Scientific).

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano metodykę izolacji DNA drobnoustrojów z krwi. Polegała ona na prowadzeniu wstępnej preparatyki próbek krwi celem odseparowania hemoglobiny z erytrocytów, a następnie na poddaniu pozostałego materiału (leukocyty i komórki drobnoustrojów) kolejnym etapom lizy mechanicznej (szklane kulki); enzymatycznej (lizozym, lizostafiny litykaza) oraz termiczno-chemicznej (roztwór NaOH i inkubacja w wysokiej temperaturze). Takie podejście zagwarantowało zniszczenie ścian komorowych zarówno bakterii Gram ujemnych oraz Gram dodatnich a także ścian grzybów drożdżowych i pleśniowych. Następnie oceniono, że najlepszym zestawem komercyjnym służącym do izolacji DNA ze spreparowanych próbek krwi były zestawy GeneMATRIX Quick Blood DNA Purification Kit (EURx) oraz Blood Mini (A&A Biotechnology). Kombinacja wstępnej preparatyki krwi oraz komercyjnego zestawu do izolacji DNA umożliwiła uzyskanie izolatów DNA o możliwie najwyższym stężeniu DNA badanych drobnoustrojów wzorcowych (ryc. 2) oraz o najniższym stężeniu hemu w próbkach DNA (ryc. 3).



Ryc. 2 Porównanie zawartości DNA drobnoustrojów przy pomocy metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym: (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *C. albicans*, (D) *A. fumigatus* w próbkach DNA izolowanych z krwi przy zastosowaniu opracowanej wstępnej metody preparatyki próbek krwi i badanych zestawów do izolacji DNA. * - wartości istotnie różne od pozostałych dla danego drobnoustroju ($p < 0.001$).



Ryc. 3 Porównanie stopnia zawartości hemu w izolatach DNA uzyskanych przy pomocy zestawów do izolacji DNA zarówno przy zastosowaniu opracowanej wstępnej metody preparatyki próbek krwi jak i bez niej. * - istotnie różne wyniki porównania stężenia hemu w obrębie jednego zestawu do izolacji DNA przy zastosowaniu wstępnej preparatyki próbek krwi jak i bez niej; # - wyniki uzyskane przy zastosowaniu wstępnej preparatyki próbek krwi istotnie różne od pozostałych badanych zestawów ($p < 0.05$).

Otrzymane wyniki umożliwiły uzyskanie ochrony patentowej metody izolacji DNA drobnoustrojów z krwi, jako metody nowatorskiej [Tomasz Gosiewski, Monika Brzychczy-Włoch „Sposób izolowania DNA drobnoustrojów z krwi” (nr prawa wyłącznego 219490) Urząd Patentowy RP – decyzja o przyznaniu patentu z dn. 24.09.2014]. W zgłoszeniu patentowym zastrzeżono możliwość wykorzystania opatentowanej metodyki w różnych wariantach: izolacja zarówno bakterii jak i grzybów; izolacja tylko grzybów; izolacja tylko bakterii z materiału biologicznego. Procedurę można dostosować do potrzeb, eliminując niektóre etapy, a tym samym oszczędzając czas i zmniejszając koszty.

Publikacja nr 4.

(opracowanie metody detekcji bakterii i grzybów w próbce krwi przy pomocy metody nested-multipleks-PCR w czasie rzeczywistym)

Do tej pory tzw. „złotym standardem” diagnostycznym są hodowle krwi prowadzone na specjalnych podłożach, najlepiej w systemach hodowli automatycznej. Istotną zaletą hodowli krwi jest ich niski koszt badania. Długi czas oczekiwania na wynik w odniesieniu do potrzeby szybkiego wdrożenia odpowiedniej antybiotykoterapii, stanowi jednak niewątpliwą wadę tej metody. Minusem jest także jej niska czułość. Czułość metod molekularnych takich jak PCR znacznie przewyższa czułość metody hodowlanej w wykrywaniu obecności drobnoustrojów we krwi, poza tym wcześniejsze zastosowanie antybiotykoterapii nie wpływa na wynik badania z uwagi na to, że nie ma potrzeby uzyskania wzrostu bakterii czy grzybów na podłożu hodowlanym, a jedynie wykrycie ich sekwencji DNA. Niestety, ograniczenia mają również metody biologii molekularnej. Trudność sprawia wyizolowanie z krwi DNA o odpowiedniej jakości i wysokim stężeniu. Kolejnym problemem jest amplifikacja DNA drobnoustrojów wyizolowanego z krwi, która może być hamowana przez hem będący głównym jej składnikiem. Wobec powyższego, celem pracy było opracowanie alternatywnej metody PCR służącej do wykrywania obecności drobnoustrojów we krwi w celu diagnostyki sepsy.

Materiał do badań stanowiła jałowa krew sztucznie zakażana czterema gatunkami drobnoustrojów wzorcowych (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus*) oraz krew pobrana od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy. Pierwszy etap badań obejmował projektowanie starterów oraz optymalizację warunków reakcji multipleks PCR w czasie rzeczywistym a także jej odmiany w systemie nested (dwustopniowa amplifikacja), a następnie na porównaniu czułości obu metod (tutaj

wykorzystano jałową krew sztucznie inokulowaną znanymi liczbami czterech drobnoustrojów wzorcowych). Startery projektowano na zasadzie wyboru sekwencji DNA specyficznych dla wszystkich gatunków bakterii (16SrRNA) oraz grzybów (18SrRNA) przy użyciu zestawu narzędzi bioinformatycznych oraz bazy danych genetycznych Center for Biotechnology Information: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Specyficzność zaprojektowanych starterów badano w porównaniu do następujących sekwencji rRNA zdeponowanych w bazie BLAST: *Bacillus thuringiensis* (KC153529), *Enterobacter aerogenes* (AB844449), *Enterococcus faecalis* (KC150142), *Escherichia sp.* (KF453959), *Haemophilus influenzae* (AB377170), *Neisseria meningitidis* (AJ239312), *Proteus mirabilis* (KC150143), *Pseudomonas sp.* (JQ613981), *Serratia marcescens* (KC130920), *Staphylococcus aureus* (CP000736.1), *Staphylococcus epidermidis* (CP000029), *Staphylococcus haemolyticus* (EF522132), *Stenotrophomonas maltophilia* (AB008509), *Streptococcus agalactiae* (AB002480), *Streptococcus pneumoniae* (CP000410.1), *Streptococcus pyogenes* (AB002521), *Streptococcus salivarius* (NR042776); *Ascomycota sp.* (JX869355), *Aspergillus fumigatus* (HQ871898), *Aspergillus sp.* (KC120773), *Candida albicans* (JN941105), *Candida glabrata* (AY083231), *Candida parapsilosis* (DQ218328), *Candida tropicalis* (EU034726), *Candida tunisiensis* (JQ612155).

Następnie, wytypowane sekwencje starterów sprawdzono pod kątem możliwości tworzenia niepożądanych trzeciorzędowych struktur wewnętrznych typu „spinka do włosów” (ang. hairpin), oraz czy sekwencje sond i starterów nie będą hybrydyzować same ze sobą – w tym celu wykorzystano kolejny zestaw narzędzi bioinformatycznych: <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/?redirect=true>. Ostateczną weryfikację przydatności zaprojektowanych sekwencji przeprowadzono in vitro na szczepach wzorcowych bakterii i grzybów. Kluczowym elementem badań była standaryzacja mieszaniny reakcyjnej PCR, tak aby dobrać optymalne warunki do równoczesnej amplifikacji czterech sekwencji DNA: bakterii Gram ujemnych, bakterii Gram dodatnich, grzybów drożdżowych i grzybów pleśniowych – system multipleks. Aby zwiększyć czułość detekcji, zaprojektowano amplifikację dwustopniową w systemie nested, tzn. podczas amplifikacji I stopnia matrycą było DNA izolowane z krwi, a podczas amplifikacji II stopnia, matrycą był produkt reakcji I stopnia.

Kolejny etap pracy polegał na przebadaniu 102 próbek krwi pobranej od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy z Oddziału Neuroinfekcji i Neurologii Dziecięcej Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II (kwalifikacja do badania: dr n.

med. Danuta Jurkiewicz-Badacz), przy pomocy opracowanej metody nmPCR oraz równolegle za pomocą klasycznego posiewu krwi w aparacie BacT/ALERT® 3D (bioMérieux). DNA z krwi izolowano przy użyciu metody opisanej w **publikacji nr 3** i w **patencie** oraz przy wykorzystaniu polimerazy wybranej na podstawie badań opisanych w **publikacji nr 2**.

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na stwierdzenie, że czułość metody nested-multipleks PCR w czasie rzeczywistym utrzymywała się na poziomie ok. 10^1 CFU/ml dla każdego z czterech badanych gatunków drobnoustrojów, natomiast czułość odmiany metody w systemie „nienested” (jednostopniowa amplifikacja) była co najmniej o jeden rząd mniejsza (tabela 1). Zastosowanie opracowanej metody detekcji drobnoustrojów pozwoliło zwiększyć odsetek pozytywnych wyników z 18,6% w przypadku posiewu do 69,6% w przypadku nmPCR. Opracowana metoda PCR pozwoliła potwierdzić wyniki posiewu krwi w każdym przypadku oraz wytypować przynależności do grup bakterii Gram dodatnich, Gram ujemnych oraz grzybów drożdżowych (nie wykazano obecności grzybów pleśniowych). We wszystkich 102 próbkach nie uzyskano sygnału amplifikacji dla kontroli negatywnej, co gwarantowało brak kontaminacji.

Tabela 1 Porównanie czułości metod multipleks PCR i nested-multipleks PCR w czasie rzeczywistym.

Badane gatunki	Czułość detekcji multipleks PCR [CFU/ml]	Czułość detekcji nested multipleks PCR [CFU/ml]
<i>Aspergillus fumigatus</i> (grzyby strzępkowe)	$3.7 \times 10^3 \pm 2.4 \times 10^3$ 3.2x10 ³ CFU/reakcję *C _T (31.2-38.5)	$3.7 \times 10^1 \pm 2.7 \times 10^2$ 1.2 CFU/reakcję C _T (29.1-32.2)
<i>Candida albicans</i> (grzyby drożdżowe)	$9.9 \times 10^2 \pm 3.4 \times 10^3$ 9.5x10 ¹ CFU/reakcję C _T (33.3-37.2)	$8.5 \times 10^1 \pm 3.6 \times 10^2$ 0.24 CFU/reakcję C _T (29.7-32.1)
<i>Staphylococcus</i>	$4.5 \times 10^3 \pm 2.5 \times 10^3$	$1.1 \times 10^1 \pm 3.7 \times 10^2$

<i>aureus</i> (bakterie Gram dodatnie)	5.1x10 ² CFU/reakcję C _T (34.0-36.7)	7.8 CFU/reakcję C _T (25.2-28.0)
<i>Escherichia coli</i> (bakterie gram ujemne)	5.4×10 ³ ± 2.5×10 ² 6.1x10 ² CFU/reakcję C _T (30.5-33.2)	1.3×10 ¹ ± 3.7×10 ² 7.3 CFU/reakcję C _T (24.4-27.2)

*C_T, numer cyklu reakcji w którym liniowy przyrost produktu przeciął ustaloną linię bazową

Opracowana metoda nmPCR została zgłoszona w Urzędzie Patentowym RP w trybie krajowym oraz międzynarodowym [Tomasz Gosiewski, i inni: „Method for simultaneous detection of bacteria and fungi in a biological preparation by PCR primers and a set for the detection of bacteria and fungi” [WO/2014/189398](#); PCT/PL2014/050029; 27.11.2014] i oczekuje na przyznanie patentu.

Publikacja nr 5

(porównanie skuteczności metody nmPCR z metodą FISH, zestawem SeptiFast (Roche) oraz hodowlą krwi)

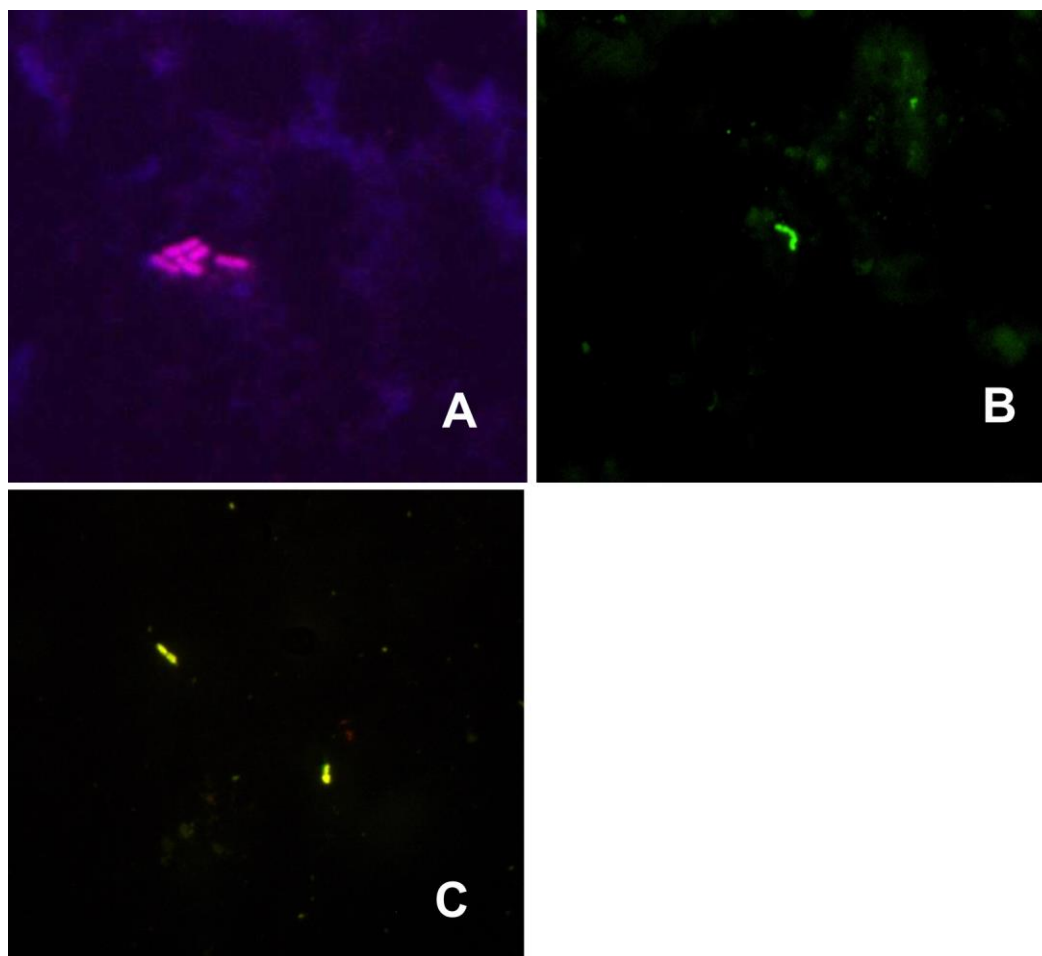
Wykrywanie obecności drobnoustrojów we krwi pacjenta jest kluczowe dla potwierdzenia diagnozy o sepsie. Powszechnie stosowana metoda hodowli krwi nie jest w pełni skuteczna. Poszukiwane są inne metody detekcji drobnoustrojów we krwi, które mogłyby skrócić czas diagnostyki w laboratorium, a także cechujące się wyższą czułością. Alternatywę daje biologia molekularna, która umożliwia precyzyjną oraz szybką detekcję markerów genetycznych drobnoustrojów. Na czoło wysuwają się techniki oparte o metodę PCR. Niestety, wykrywanie mikroorganizmów bezpośrednio we krwi napotyka szereg trudności związanych z bardzo małą ich liczbą w próbce, obecnością inhibitorów zaburzających proces amplifikacji DNA oraz koniecznością uzyskania bardzo dobrej jakości izolatów kwasów nukleinowych. Wymienione trudności sprawiły, że do tej pory na rynku dostępne są bardzo nieliczne zestawy diagnostyczne stosowane w molekularnej diagnostyce sepsy, takie jak np. SeptiFast (Roche), SeptiTest (Molzym) czy VYOO (SIRS-Lab). Alternatywą dla metod amplifikacji kwasów nukleinowych może być metoda FISH

stosowana jednak do tej pory tylko w wypadku próbek krwi po hodowli, co wymusza konieczność oczekiwania na namnożenie się drobnoustrojów.

W tej pracy przedstawiono wyniki badań laboratoryjnych porównania skuteczności czterech metod służących do wykrywania obecności mikroorganizmów we krwi dorosłych pacjentów z klinicznymi objawami sepsy, tj: SeptiFast (Roche) (SF), nested, multiplex, PCR w czasie rzeczywistym (nmPCR), FISH oraz posiew krwi przy zastosowaniu systemu BacT/ALERT 3D (bioMérieux). Badania przeprowadzono na 71 próbkach krwi pobranych od pacjentów z sepsą, hospitalizowanych na Oddziale Anestezjologii i Intensywnej Terapii Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II (kwalifikacja do badania: lek. Agnieszka Flis i dr hab. Rafał Drwiła). DNA z krwi izolowano przy użyciu metody opisanej **w publikacji nr 3 i w patencie**; nmPCR przeprowadzono przy wykorzystaniu metodyki opisanej **w publikacji nr 4**, FISH wykonano przy użyciu metody opisanej **w publikacji nr 1**.

Zastosowanie nmPCR pozwoliło zwiększyć odsetek pozytywnych wyników do 71,8% w porównaniu z 36,6% w przypadku posiewu. Odnotowano także niższy odsetek wyników pozytywnych dla metody SF (25,3%) oraz FISH (29,6%) w porównaniu z uzyskanym z metody nmPCR. Opracowana metoda nmPCR pozwoliła potwierdzić wyniki uzyskane dzięki zestawowi SF oraz FISH (ryc. 4) we wszystkich przypadkach gdzie wykryto bakterie.

Stwierdzono że nmPCR wykrywa obecność drobnoustrojów we krwi istotnie częściej niż metody posiewu, FISH oraz SF ($p < 0.0001$). Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy pozostałymi metodami.



Ryc. 4 Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego, uzyskane za pomocą metody FISH: (A) widoczne bakterie *K. pneumoniae*; (B) widoczne bakterie *Streptococcus* spp.; (C) widoczne bakterie *E. cloacae*. Powiększenie 1000 x. Mikroskop fluorescencyjny BX51 (Olympus).

4.3.4. Podsumowanie

Przedstawiony cykl publikacji oraz uzyskany patent stanowią całość osiągnięcia naukowego, będącego podstawą wniosku o przyznanie stopnia naukowego doktora habilitowanego. Opracowana metoda detekcji bakterii i grzybów we krwi została opracowana – poczynając od badań na poziomie izolacji DNA, poprzez badania enzymów polimeraz, na zaprojektowaniu metody PCR skończywszy – i przetestowania. Udało się stworzyć kompleksową metodykę diagnostyczną, pozwalającą na jednoczesne wykrywanie bakterii Gram ujemnych, Gram dodatnich, grzybów drożdżowych i grzybów pleśniowych w układzie typu nested-multiplex PCR w czasie rzeczywistym.

Badania skuteczności metody nmPCR przeprowadzono na próbkach krwi pochodzących od dzieci jak i od osób dorosłych i w przypadku obydwu grup uzyskany odsetek wyników pozytywnych był znacząco wyższy niż w przypadku metody posiewu.

pozytywnych uzyskanych dzięki nmPCR sięgał ok. 70% (**publikacje nr 4 i 5**), co znacznie przewyższało liczbę pozytywnych wyników uzyskanych z metody posiewu (18,6% i 36,6%) czy SeptiFast (Roche) (25,3%). Tak duża różnica była prawdopodobnie spowodowana tym, że metoda hodowlana ma swoje ograniczenia, opisane powyżej, natomiast komercyjny zestaw SF został zaprojektowany do detekcji kilkunastu konkretnych gatunków drobnoustrojów. Metoda przedstawiona w osiągnięciu naukowym (nmPCR) pozwalała na wykrywanie wszystkich gatunków bakterii i grzybów (zastosowany system kontroli wykluczał kontaminację w metodzie nmPCR). Dodatkowo, opisano zastosowanie autorskiej metody FISH służącej wykrywaniu bakterii bezpośrednio w próbkach krwi z pominięciem etapu hodowli, co stanowi uzupełnienie oraz alternatywę dla zaprojektowanej metody nmPCR. Odsetek pozytywnych wyników uzyskanych dzięki FISH (29,6%) był zbliżony do poziomu jaki dało wykorzystanie zestawu SF (25,3%). Metoda FISH była tańsza oraz szybsza w działaniu niż SF, gdyż nie wymagana była izolacja DNA, może zatem stanowić ona alternatywę dla zestawu SeptiFast (Roche).

Opracowane metody izolacji DNA oraz nmPCR wykazały swoją skuteczność co zostało potwierdzone w przedstawionych publikacjach. Ponad to, do tej pory udało się uzyskać patent na metodę izolowania DNA oraz zgłoszono nmPCR do ochrony patentowej. Wszystko to stanowi rękojmię możliwości praktycznego wykorzystania opisanych metod w medycznej diagnostyce sepsy.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Poniżej przedstawiłem tematykę badawczą, która poza osiągnięciem naukowym opisanym powyżej, stanowi istotną część mojej działalności naukowej.

5.1. Badania nad składem i rolą komensalnej flory bakteryjnej i grzybiczej człowieka w zdrowiu i w chorobie.

Tematyką tą zacząłem zajmować się jeszcze przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, jednak pierwsze publikacje z tego zakresu pojawiły się już po obronie pracy doktorskiej. Poniżej przedstawiłem opis tylko prac opublikowanych w czasopismach posiadających wskaźnik Impact Factor.

Flora komensalna człowieka jest obecna na skórze, w drogach rodnych kobiet oraz na błonach śluzowych jamy ustnej i w całym przewodzie pokarmowym. W jelicie grubym mamy do czynienia z największą obfitością jakościową i ilościową gatunków. Od kilku lat badacze na całym świecie opisują zmiany składu flory (mikrobiota) w przebiegu różnych chorób.

Badania w których brałem udział, dotyczyły zmian składu flory przewodu pokarmowego człowieka w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit (IBD). Praca w tej tematyce była prowadzona pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Strus oraz Pana prof. dr hab. Piotra B. Heczko i we współpracy z Zespołem Pana Prof. dr hab. Krzysztofa Fyderka z Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ CM oraz z Zespołem Pana Prof. dr hab. Tomasz Macha z Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii Katedry Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych UJ CM. Rezultatem tym prac były artykuły, których jestem współautorem.

- [Fyderek K., i inni (2009) **Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease.** World J Gastroenterol. 15:5287-94]. W tej pracy wykazano że zmieniał się skład flory jelita grubego dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD) oraz z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC). Wykazano że bakterie z rodzaju *Streptococcus* dominowały na śluzówce pacjentów z CD, natomiast w grupie z UC dominowały bakterie *Lactobacillus*. W grupie pacjentów z IBD (CD i UC) wykazano istotny spadek liczby bakterii z grupy *Bifidobacterium* w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto, udowodniono, że u pacjentów z IBD zmniejszała się grubość warstwy śluzowej pokrywającej nabłonek okrężnicy od strony jej światła w porównaniu do grupy kontrolnej. Wszystkie opisane różnice były istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej pacjentów zdrowych.
(IF = 2,092)
- [Strus M., i inni (2009) **A role of hydrogen peroxide producing commensal bacteria present in colon of adolescents with inflammatory bowel disease in perpetuation of the inflammatory process.** J Physiol Pharmacol. Suppl 6:49-54]. W tej pracy wykazano, że w jelicie grubym pacjentów z IBD wzrastała liczba bakterii tlenowych, a spadała liczba beztlenowych w porównaniu do grupy kontrolnej. Udowodniono też, że w grupie bakterii tlenowych znajdowały się te, które miały

zdolność do produkowania nadtlenku wodoru (H₂O₂). Wykazano także, że na śluzówce jelita grubego w przebiegu IBD wzrastała liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, co mogło mieć wpływ na zaostrzenie procesu zapalnego z uwagi na obecność większej ilości LPS (endotoksyny).

(IF = 1,489; MNiSW = 24)

- [Gosiewski T., i inni (2012) **Horizontal distribution of the fecal microbiota in adolescents with inflammatory bowel disease.** J Pediatr Gastroenterol Nutr. 54:20-7]. Artykuł opisuje tzw. warstwowy układ flory jelita grubego na przekroju poprzecznym okrężnicy w przebiegu IBD u dzieci. Wykazano że grupie z IBD można wyróżnić trzy warstwy poczynając od błony śluzowej jelita: I – flora zbliżona składem do tej znajdującej się na błonie śluzowej; II – flora o składzie przejściowym między warstwą I a III; III – flora o składzie różnym od flory błony śluzowej. W grupie kontrolnej trzy frakcje nie wykazywały zróżnicowania składu jakościowego i ilościowego. Potwierdzono także, że w grupie pacjentów zdrowych występowało istotnie więcej bakterii *Bifidobacterium* niż u pacjentów z UC i CD. Wykazano także, że flora bakteryjna przywarta do śluzówki okrężnicy pacjentów z UC miała in vitro istotnie większą zdolność do degradacji mucyny (składnika śluzu jelitowego) niż w flora w grupie kontrolnej.

(IF = 2,196; MNiSW = 30)

- [Pilarczyk-Żurek M., (2013) **Possible role of *Escherichia coli* in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis.** BMC Gastroenterol. 13:61]. W pracy wykazano znaczący wzrost liczebności bakterii *E. coli* na błonie śluzowej jelita grubego u pacjentów z UC w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza PFGE nie wykazała aby w grupie badanej wstępowały specyficzne szczepy *E. coli*, jednak szczepy te posiadały znacznie częściej sekwencje genów *chuA* i *iutA*, które ułatwiają pozyskiwanie żelaza podczas przewlekłych procesów zapalnych jelit. Wiadomo że w przebiegu UC występuje krwawienie ze śluzówki jelita, zatem dostarczane jest żelazo, które może stymulować zwiększanie się kolonizacji błony śluzowej okrężnicy przez *E. coli* w przebiegu UC.

(IF = 2,113; MNiSW = 25)

- [Golińska E., i inni (2013) **Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease.** World J Gastroenterol. 19:3562-72]. Kolejną grupą mikroorganizmów na której skupiliśmy swoją uwagę, były bakterie z rodzaju *Enterococcus*. Stwierdzono że, skumulowane występowanie genów wirulencji w genomie izolatów *Enterococcus* w grupie pacjentów z IBD było wyższe niż w grupie kontrolnej, jednak różnice nie były istotne statystycznie. In vitro potwierdzono istotnie większą zdolność do adherowania do epitelialnej jelitowej linii komórkowej Caco-2 szczepów *Enterococcus* izolowanych od pacjentów z grupy IBD w porównaniu do grupy kontrolnej.

(IF = 2,433; MNiSW = 25)

Następną jednostką chorobową w przebiegu której podjęto badania składu mikrobiota w jelicie grubym była cukrzyca typu 1 (T1DM) i typu 2 (T2DM). Prace są wciąż jeszcze prowadzone w ramach projektu grantowego, którym kieruję: [2011/03/D/NZ5/00551 NCN „Badanie flory bakteryjnej przewodu pokarmowego u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 oraz z otyłością olbrzymią lub patologiczną poddawanych zabiegowi rękawowej resekcji żołądka” (2012-2015)]. Badania są prowadzone we współpracy z Panem Prof. dr hab. Maciejem Małeckim z Kliniki i Katedry Chorób Metabolicznych UJCM oraz dr Pawłem Wołkowem, kierownikiem Ośrodka Genomiki Medycznej – OMICRON UJCM. Badania są prowadzone przy wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji 16S, pozwalającego na skanowanie całego mikrobiomu. Do tej pory opublikowaliśmy jedną pracę, ponieważ projekt jest wciąż w trakcie realizacji

- [Gosiewski T., i inni (2014) **Quantitative evaluation of fungi of the genus *Candida* in the feces of adult patients with type 1 and 2 diabetes - a pilot study.** Gut Pathog. 6:43]. Po raz pierwszy przebadano ilościowy skład grzybów z rodzaju *Candida* w jelicie grubym u pacjentów z obydwoma typami cukrzycy. Wykazano, że zarówno w T1DM jak i w T2DM istotnie wzrasta liczba komórek grzybów w porównaniu do grupy kontrolnej. Bardzo ciekawym spostrzeżeniem było wykazanie, że wraz ze wzrostem liczby komórek *Candida* u pacjentów z T2DM, spada stężenie frakcji lipidów (cholesterol całkowity, HDL, LDL, trójglicerydy) w osoczu krwi u tych samych pacjentów. Niewykluczone że we florze jelitowej pacjentów z cukrzycą typu 2 występują szczepy *Candida* o potencjale probiotycznym, zdolne rozkładać lipidy

w treści pokarmowej. To przypuszczenie stało się podstawą do przygotowania kolejnego wniosku grantowego, skierowanego do NCN i mającego na celu dokładne zbadanie opisanej zależności – wniosek w trakcie oceny.

(IF = 2,070; MNiSW = 25)

5.2. Molekularna struktura populacji, czynniki wirulencji, determinanty oporności na antybiotyki paciorkowców z grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i noworodków.

Mój udział w ramach opisywanej tematyki badawczej był możliwy dzięki Pani dr hab. Monice Brzychczy-Włoch, która koordynowała całość badań oraz była kierownikiem projektu własnego [N N401 042337 MNiSW „Charakterystyka izolatów *Streptococcus agalactiae* pochodzących z inwazyjnych zakażeń i od nosicieli oraz analiza immunoreaktywnych antygenów białkowych obecnych na ich powierzchni” (2009-2012)], którego byłem współwykonawcą. Badania dotyczyły szeroko zakrojonych badań nad nosicielstwem GBS u kobiet w ciąży oraz zakażeń u noworodków. Ich celem była ocena populacji tych bakterii pod kątem występującego profilu oporności na antybiotyki, obecności typów antygenów powierzchniowych w postaci białek z rodziny Alp oraz polisacharydów warunkujących serotyp. Badania były prowadzone na szczepach GBS zebranych dzięki Polskiej Sieci Neonatologicznej, kierowanej przez prof. Ewę Helwich z Kliniki Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. Wynikiem pracy naukowej w ramach tej tematyki badawczej były liczne publikacje, których jestem współautorem.

- [Strus., i inni (2009) **Group B streptococcus colonization of pregnant women and their children observed on obstetric and neonatal wards of the University Hospital in Krakow, Poland.** J Med Microbiol. 58:228-33]. Wstępne badania dotyczące kolonizacji 340 kobiet oraz ich dzieci przeprowadzono na populacji pacjentek hospitalizowanych na Oddziale Klinicznym Położnictwa i Perinatologii oraz na Oddziale Klinicznym Neonatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Badania wykazały, że kobiety z ciążą przebiegającą nieprawidłowo były częściej kolonizowane GBS (20%) w porównaniu do pacjentek z prawidłowym przebiegiem

cięży (17,2%). Ponadto, kobiety z nieprawidłowo przebiegającą ciążą były dwukrotnie częściej kolonizowane przez szczepy GBS o fenotypie oporności typu MLS_B.

(IF = 2,272; MNiSW = 20)

- [Brzywczy-Włoch M., i inni (2010) **Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance.** J Med Microbiol. 59:780-6]. Badania przeprowadzono na izolatach GBS pochodzących z Sieci Neonatologicznej przy pomocy metody PCR multipleks. Oceniono częstość występowania genów kodujących oporność na makrolidy, genów warunkujących serotyp oraz kodujących białka powierzchniowe Alp (alpha-like protein). Wykazano że wśród badanej puli izolatów GBS, 16% było opornych na erytromycynę, zaś 10% na klindamycynę. W grupie izolatów z opornością, 63% posiadało mechanizm konstytucyjny MLS_B, 26% indukcyjny MLS_B, a 11% typ M. Pośród izolatów opornych, serotyp V was dominujący (67 %), następnie serotypy: II (15 %), Ia (11 %) i III (7 %). Rozkład częstości występowania białek powierzchniowych przedstawiał się następująco: alp3 (70 %), rib (11 %), epsilon (7.5 %), bca (7.5 %) oraz alp2 (4 %). Przy pomocy metody PFGE wykazano, że największa homogenność genetyczna występowała wśród izolatów należących do serotypu V.

(IF = 2,380; MNiSW = 27)

- [Brzywczy-Włoch M., i inni (2012) **Molecular characterization of capsular polysaccharides and surface protein genes in relation to genetic similarity of group B streptococci isolated from Polish pregnant women.** Epidemiol Infect. 140:329-36]. Przeprowadzono badania częstości występowania poszczególnych białek powierzchniowych z rodziny Alp oraz serotypów na puli 353 izolatów GBS. Badania przeprowadzono dzięki metodzie multipleks PCR. Wykazano że odsetki występowania poszczególnych serotypów były następujące: III (35%), Ia (20%), V (17%), II (15%), Ib (8%) i IV (5%). Najczęściej występującym białkiem Alp był epsilon (26%), oraz kolejne: rib (22%), alp2 (21%), bca (17%) i alp3 (14%). Występowanie niektórych białek było istotnie związane z konkretnymi serotypami (P<0.0001): epsilon z Ia, Ib, IV; bca z Ib, II; rib z II, III; alp3 z V; alp2 z III. Ocena występowania poszczególnych serotypów i białek powierzchniowych w populacji

GBS na terytorium Polski jest ważna z uwagi na opracowanie przyszłej szczepionki przeciwko GBS.

(IF = 2,867; MNiSW = 25)

- [Bodaszewska-Lubaś M., i inni (2012) **Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins--pilot study.** Postepy Hig Med Dosw (Online). 66:787-94]. W ramach tej pracy przeprowadzono badania nad wpływem bakteriocyn produkowanych przez bakterie kwasu mlekowego *L. plantarum* C 11, *L. sakei* DSMZ 6333, and *L. lactis* ATCC 11454 na szczepy *S. agalactiae* w zależności od ich serotypu i białek powierzchniowych Alp. Największą zdolność do hamowania wzrostu GBS miał szczep *L. plantarum* C 11. Szczep *L. sakei* DSMZ 6333 nie wykazywał zdolności hamujących GBS, natomiast szczep *L. lactis* ATCC 11454 hamował GBS w niewielkim stopniu. Najmniej wrażliwe na bakteriocyny były serotypy Ib i III, podczas gdy najbardziej wrażliwy był serotyp II. Wrażliwość GBS na bakteriocyny nie była związana z konkretnym białkiem powierzchniowym Alp.

(IF = 0,552; MNiSW = 15)

- [Bodaszewska-Lubaś M., i inni (2013) **Adherence of group B streptococci to human rectal and vaginal epithelial cell lines in relation to capsular polysaccharides as well as alpha-like protein genes - pilot study.** Pol J Microbiol. 62:85-90]. Przeprowadzono badania nad adhezją szczepów GBS izolowanych od kobiet oraz noworodków do pochwowej linii komórkowej A431 oraz linii jelitowej HT-29 celem sprawdzenia zdolności do kolonizacji dróg rodnych oraz przewodu pokarmowego przez wybrane izolaty GBS ze względu na ich serotyp oraz białka Alp. Wykazano że adhezja szczepów GBS do komórek linii HT-29 była znacznie wyższa niż do linii komórkowej A431. Największą zdolność do adhezji ze względu na białka Alp wykazywały szczepy z białkiem rib i alp2. Serotyp III adherował do linii A-431 bardziej wydajnie, zwłaszcza jeśli szczepy GBS posiadały równocześnie białka rib i alp2. Szczepy GBS posiadające geny rib adherowały do linii komórkowych HT-29 i A-431 lepiej niż szczepy GBS posiadające inne białka Alp.

(IF = 0,871; MNiSW = 15)

- [Brzychczy-Włoch M., i inni (2014) **Multilocus sequence types of invasive and colonizing neonatal group B streptococci in Poland.** Med Princ Pract. 23:323-30].
Celem pracy było wykorzystanie metody MLST (Multi Locus Sequence Typing) do typowania genetycznego izolatów GBS pochodzących z zakażeń i z nosicielstwa u noworodków. Na podstawie uzyskanych sekwencji siedmiu genów housekeeping (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tki*) określono typy sekwencyjne (ST) badanych izolatów GBS, a następnie przyporządkowano je do grup klonalnych (CC). Dzięki porównaniu wyników z bazami MLST przeprowadzono pierwsze w Polsce porównanie izolatów *S. agalactiae* pochodzących od zdrowych noworodków skolonizowanych przez paciorkowce z grupy B oraz od noworodków z zakażeniem z izolatami tego gatunku pochodzącymi z innych krajów. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że w grupie noworodków zdrowych przeważały izolaty z serotypem III (60%), dalej Ia (20%), II (10%), V (5%) i Ib (5%). Wśród noworodków z zakażeniem GBS dominował serotyp III (50%), następnie II (27%), V (14%) i Ia (9%). W grupach noworodków nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w rozkładzie serotypów. Analiza izolatów GBS pod względem genów kodujących białka Alp wykazała, że u noworodków zdrowych występowały głównie izolaty posiadające gen *alp2* (50%), następnie epsilon (25%), *rib* (10%), *bca* (10%) i *alp3* (5%). W grupie noworodków z zakażeniem dominowało białko *rib* (58%), następnie *bca* (23%), *alp2* (9%), *alp3* (5%) oraz epsilon (5%). Wykazano istotność statystyczną między izolatami GBS pochodzącymi z nosicielstwa, a występowaniem białka *alp2* oraz izolatami z zakażeń a białkiem *rib*.

Wykorzystanie metody MLST umożliwiło oznaczenie 14 typów ST, z czego 10 typów wchodziło w skład jednej z czterech głównych grup klonalnych: CC10, CC17, CC19 oraz CC23. Najwięcej izolatów tworzyło kompleks CC23 (49%) reprezentowany przez typy sekwencyjne: ST-23, ST-220, ST-249; następnie CC19 (17%): ST-19, ST-106, ST-286; CC17 (10%): ST-17; oraz CC10 (10%): ST-10, ST-12, ST-358. Ponadto, w badanej puli izolatów GBS oznaczono pojedyncze typy ST, nie tworzące kompleksów klonalnych, takie jak: ST-1, ST-22, ST-255 oraz ST-410.

(IF = 1,113; MNiSW = 25)

- [Brzychczy-Włoch M., i inni (2014) **Dynamics of colonization with group B streptococci in relation to normal flora in women during subsequent trimesters of pregnancy.** New Microbiol. 37:307-19]. W ramach prac przeprowadzono badania ilościowego i jakościowego składu flory pochwy oraz odbytu u kobiet w ciąży skolonizowanych GBS oraz bez kolonizacji w trzech trymestrach ciąży. Badano także próbki moczu pod kątem obecności GBS. W grupie pacjentek z nosicielstwem GBS wykazano że odsetek obecności GBS był zależny o etapu ciąży: trymestr I - 21%, trymestr II - 14% oraz trymestr III - 17%. Populacja GBS w odbycie w trzecim trymestrze ciąży była istotnie najbardziej obfita i przyjmowała średnią liczbę 4×10^5 CFU/ml, zaś w połogu 2×10^3 CFU/ml. U 13% pacjentek skolonizowanych GBS wykazano bezobjawową bakteriurię *S. agalactiae*. Generalnie można stwierdzić, że kolonizacja dróg moczowo-płciowych i odbytu przez GBS u kobiet w kolejnych trymestrach ciąży miała charakter ciągły, przerywany lub okresowy, przy czym rezerwuarem szczepów GBS był przewód pokarmowy. Analiza globalnej flory pochwy w kolejnych trymestrach ciąży nie wykazała różnic pomiędzy grupą kobiet skolonizowanych paciorkowcem z grupy B, a grupą pacjentek bez potwierdzonej kolonizacji.

(IF = 1,603; MNiSW = 15)

5.3. Opracowanie i standaryzacja metod biologii molekularnej w diagnostyce mikrobiologicznej innej niż diagnostyka sepsy.

W ramach tego tematu badawczego prowadzę badania nad możliwością zastosowania metod biologii molekularnej w diagnostyce bakteriologicznej. Biologia molekularna jest szeroko stosowana w wirusologii, natomiast bakteriologia nadal bazuje głównie na klasycznych metodach diagnostycznych, takich jak posiew czy badania serologiczne. Oprócz szczegółowo opisanego osiągnięcia badawczego, dotyczącego opracowania molekularnych metod diagnostyki sepsy, a będącego podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, prowadzę badania nad innymi metodami molekularnymi mogącymi mieć zastosowanie w bakteriologii. Poniżej przedstawiam prace z tego zakresu.

- [Gosiewski T., i inni (2012) **The application of multiplex PCR to detect seven different DNA targets in group B streptococci.** Folia Microbiol. 57:163-7].

Paciorkowce z grupy B są czynnikiem etiologicznym groźnych zakażeń noworodków. Patogenność GBS jest związana z typem serologicznym szczepu oraz z jego profilem oporności na antybiotyki, głównie na makrolidy i linkozamidy. W szybkiej diagnostyce molekularnej ważne jest potwierdzenie obecności *S. agalactiae* w materiale diagnostycznym oraz określenie serotypu i genów oporności na makrolidy. W ramach pracy, opracowano i standaryzowano metodę multipleks PCR umożliwiającą detekcję podczas pojedynczej reakcji amplifikacji aż siedmiu sekwencji markerowych GBS warunkujących: serotypy Ia, III, V (najczęściej występujące w populacji GBS w USA i w Europie); geny oporności na makrolidy *ermB*, *mefA/E*; hiperwirulentnego typu sekwencyjnego ST17; *cfb*, sekwencji markerowej dla GBS. Opracowanie metody multipleks PCR służącej do detekcji siedmiu sekwencji genetycznych w pojedynczej reakcji amplifikacji jest dużym osiągnięciem, zwłaszcza że udało się połączyć razem startery pochodzące z różnych niezależnych publikacji naukowych, jak również opracować jeden program amplifikacji w celu uzyskania tak bardzo różnych pod względem wielkości produktów reakcji PCR (153-1826 bp). Ponadto, metoda ta może stanowić doskonałe narzędzie do skriningu diagnostycznego jak i epidemiologicznego w szpitalach dysponujących laboratorium diagnostycznym wyposażonym w podstawowy sprzęt do badań molekularnych. Dzięki jej zastosowaniu możliwe jest nie tylko potwierdzenie obecności GBS ale także szybkie wykrycie genów warunkujących oporność na makrolidy, wykrycie hiperwirulentnych szczepów ST-17 oraz detekcję najczęściej występujących serotypów Ia, III i V związanych z dużą zachorowalnością oraz śmiertelnością wśród pacjentów.

(IF = 0,791; MNiSW = 15)

- [Gosiewski T., i inni (2012) **The application of genetics methods to differentiation of three *Lactobacillus* species of human origin.** Ann Microbiol. 62:1437-1445]. Zainteresowanie probiotykami jako suplementami diety lub lekami wzrasta. Aby uznać konkretny izolat bakterii za probiotyczny, należy dokładnie określić jego cechy probiotyczne oraz właściwości taksonomiczne do poziomu szczepu włącznie. Większość znanych metod genotypowania została zaprojektowana dla powszechnie występujących bakterii patogennych. W niniejszej pracy dokonano standaryzacji metod RAPD, PFGE i FISH do typowania genetycznego bakterii należących do

gatunków *L. fermentum*, *L. gasseri* i *L. plantarum*. Dodatkowo, zastosowano metodę MLST do genotypowania *L. plantarum*. W wyniku prac badawczych zaprojektowano sondy FISH specyficzne dla gatunków *L. fermentum* i *L. gasseri*, umożliwiające wykrywanie tych bakterii bezpośrednio w materiale badawczym, jakim może być próbka kału czy np. jogurtu. Ponadto, opracowano schemat genotypowania dla trzech badanych gatunków bakterii przy pomocy metod RAPD oraz PFGE. Wykazano, że izolaty *L. plantarum* pochodzenia ludzkiego nie poddają się dyskryminacji genetycznej i są bardzo homogenne genetycznie, a jedynie szczepy pochodzenia roślinnego wykazują odmienną genetyczną. Nawet metoda MLST nie była w stanie różnicować ludzkich izolatów *L. plantarum*. Rezultatem pracy są narzędzia genetyczne (FISH, RAPD, PFGE) użyteczne w typowaniu i genotypowaniu szczepów *L. fermentum* i *L. gasseri*, co jest niezbędne w badaniach preparatów probiotycznych skonstruowanych na bazie tych bakterii. W przypadku *L. plantarum* wskazano na konieczność poszukiwania bardziej dyskryminujących metod genotypowania tego gatunku bakterii oraz przy okazji odkryto wysoki stopień homogenności genetycznej wśród izolatów pochodzenia ludzkiego.

(IF = 1,549; MNiSW = 15)

W trakcie realizacji jest projekt statutowy, kierowany przez mnie [K/ZDS/004624 UJCM „**Opracowanie molekularnej metodyki diagnostyki zakażeń wywołanych przez *Borrelia burgdorferi* – izolacja DNA oraz real time PCR**”], dotyczący możliwości diagnostyki zakażenia wywołanego przez *B. burgdorferi*. Obecnie diagnostyka opiera się przede wszystkim na badaniach serologicznych ELISA i Western-Blot. Niestety, wyniki badań serologicznych często nie są miarodajne. Poszukiwane są alternatywne metody diagnostyczne, takie jak np. amplifikacja DNA bakterii. W ramach projektu którym kieruję, udało się do tej pory opracować sekwencje starterów specyficznych wobec *B. burgdorferi* oraz przeprowadzić badania na grupie pacjentów u których wykonywano także klasyczną diagnostykę serologiczną. Badanymi próbkami była krew. Wykazano że opracowana technika PCR w czasie rzeczywistym specyficznie wykrywa obecność krętków in vitro w próbkach krwi sztucznie zakażonych bakterią. Niestety, wyniki badań próbek krwi od pacjentów z podejrzeniem zakażenia nie pokrywały się z rezultatami badań serologicznych tych samych próbek. Bardzo często uzyskiwano pozytywny wynik PCR i negatywny z badań serologicznych oraz odwrotnie. Można wysnuć wniosek, że krew nie jest dobrym materiałem

diagnostycznym w przebiegu boreliozy, ponieważ krętki szybko przechodzą z krwi to tkanek pacjenta. W dalszym etapie badań planujemy zbadać płyn mózgoworzeniowy u pacjentów z neuroboreliozą i sprawdzić możliwości diagnostyczne zaprojektowanej metody PCR. Dotychczasowym efektem badań była praca licencjacka Pana Krzysztofa Ufira z WBiNoZ UJ, której byłem promotorem (lipiec 2014).

5.4. Prace wykraczające poza obszar głównych tematyk badawczych.

- [Strus M., i inni (2006) **The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities.** FEMS Immunol Med Microbiol. 48:56-63]. W pracy przedstawiono rolę nadtlenu wodoru produkowanego przez bakterie *Lactobacillus* w pochwie. Badano wymazy z pochwy od 60 kobiet oraz ustalano skalę Nugenta i pH. Wykazano że H₂O₂ był produkowany przez gatunki bakterii: *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. johnsonii* i *L. gasseri* w stężeniach 0,05 do 1,0 mM. Drobnoustroje związane z patologią pochwy wykazywały zróżnicowaną podatność na H₂O₂ w zakresie jego stężeń produkowanych przez badane gatunki *Lactobacillus*. Największy efekt działania przeciwko gatunkom patogennym wykazano w obecności płynu po hodowli *Lactobacillus* w którym znajdował się nadtlenek wodoru oraz inne produkty metabolizmu bakterii. Wyciągnięto wniosek, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa *Lactobacillus* jest związana z działaniem synergistycznym H₂O₂ i innych substancji produkowanych przez te bakterie.

(IF = 2,281; MNiSW = 15)

- [Chmielarczyk A., i inni (2012) **Control of an outbreak of *Acinetobacter baumannii* infections using vaporized hydrogen peroxide.** 81:239-45]. Celem pracy była analiza dwóch epidemii szpitalnych wywołanych przez wielolekooporne szczepy *A. baumannii* w kontekście skuteczności dezynfekcji powierzchni przy użyciu waporyzowanego nadtlenu wodoru (VHP). Wynikiem badania były wnioski o skuteczności stosowania VHP do dezynfekcji powierzchni w połączeniu ze ścisłą kontrolą zakażeń oraz higieną rąk w kontrolowaniu epidemii zakażeń *A. baumannii* w środowisku szpitalnym.

(IF = 2,855; MNiSW = 30)

Szczegółowy wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych wraz z informacją o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki stanowi odrębny załącznik (nr 3) do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.



Dr n. med. Tomasz Gosiewski