

## AUTOREFERAT

### I. Imię i nazwisko:

Irina Niecwietajewa (poprz. Netsvyetayeva)

### II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania – oraz tytuł rozprawy doktorskiej

**1989** – dyplom lekarza uzyskany na Wydziale Lekarskim w Krymskim Państwowym Instytucie Medycznym (ZSRR)

**1999** – nostryfikacja dyplomu lekarza w Polsce

**2010** – uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych w zakresie medycyny, nadanego uchwałą Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie rozprawy doktorskiej *Zmienność fenotypowa klinicznych szczepów *Candida parapsilosis* w aspekcie ich zjadliwości*

**Promotor:** dr hab. n. med. Ewa Swoboda-Kopec

**Recenzenci:** dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec

prof. dr hab. n. med. Waldemar L. Olszewski

**2010** – tytuł specjalisty w dziedzinie *mikrobiologii lekarskiej*

### III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

**2011 – nadal** adiunkt, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

**2017 – nadal** epidemiolog szpitalny, Instytut Hematologii i Transfuzjologii  
w Warszawie

**2014 – nadal** przewodnicząca Zespołu Kontroli Zakażeń Szpitalnych,  
Szpital Czerniakowski w Warszawie

**2011 – 2016** epidemiolog, Szpital Chirurgii Urazowej św. Anny w Warszawie

**2009 – 2011** asystent, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

**2004 – 2009** lekarz rezydent, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

**2002 – 2003** lekarz w pierwszym roku pracy, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus  
– Centrum Leczenia Obrażeń w Warszawie

**IV. Wskazane osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

Cykl 6 tematycznie powiązanych i recenzowanych międzynarodowych publikacji w obszarze badawczym z łącznym **IF 12,743**

***Badania nad klinicznymi aspektami interakcji pomiędzy makroorganizmem a drobnoustrojem w zależności od czynników ryzyka***

**IN1.** Ewa Swoboda-Kopec, **Irina Netsvyetayeva**, Magdalena Sikora, Mariusz Jasik and Piotr Fiedor (August 17th 2011). Handling of Fungal Infections in Patients with Chronic Immunosuppression Post Renal Transplant. After the Kidney Transplant – The Patients and Their Allograft. Jorge Ortiz and Jason Andre, Intech Open, doi: 10.5772/10645.

**IN2.** Swoboda-Kopec E, Sikora M, Golas M, Piskorska K, Gozdowski D, **Netsvyetayeva I.** *Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*. Mycoses. 2014;57(12):747-53.

**IF 2,239**

**IN3.** **Netsvyetayeva I**, Sikora M, Golas M, Swoboda-Kopec E, Walter de Walthoffen S, Dembicka O, Fraczek M, Mlynarczyk A, Pacholczyk M, Chmura A, Mlynarczyk G. *Acinetobacter baumannii* Multidrug-Resistant Strain Occurrence in Liver Recipients With Reference to Other High-Risk Groups. Transplantation Proceedings. 2011;43:3116–3120.

**IF 1,005**

**IN4.** **Netsvyetayeva I**, Fraczek M, Piskorska K, Golas M, Sikora M, Mlynarczyk A, Swoboda-Kopec E, Marusza W, Palmieri B, Iannitti T. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Ukraine: antibacterial resistance, and virulence factor encoding genes. BMC Infectious Diseases. 2014;5(14):128.

**IF 2,613**

**IN5.** **Netsvyetayeva I**, Marusza W, Olszanski R, Szyller K, Krolak-Ulinska A, Swoboda-Kopec E, Sierdzinski J, Szymonski Z, Mlynarczyk G. Skin bacterial flora as a potential risk factor predisposing to late bacterial infection after cross-linked hyaluronic acid gel augmentation. Infect Drug Resist. 2018;11:213-222.

**IF 3,443**

**IN6.** Marusza W, Olszanski R, Sierdzinski J, Ostrowski T, Gruber-Miazga J, Szyller K, **Netsvyetayeva I.** The impact of lifestyle upon the probability of occurrence of late bacterial infection resulting from soft-tissue filler augmentation. Infection and Drug Resistance 2019;12:855–863.

**IF 3,443**

**Łączny IF cyklu – 12,743**

**całkowity wskaźnik IF – 27,475**

**indeks Hirscha z Web of Science: 5**

**liczba cytowań według bazy Web of Science bez autocytowań: 80**

Prezentowany cykl prac naukowych obejmuje trzy ściśle ze sobą powiązane obszary badawcze: badania mikrobiologiczne przeprowadzone u chorych z immunosupresją, badania u zdrowych nosicieli oraz badania dotyczące osób zdrowych, u których wystąpiły powikłania po określonych zabiegach z naruszeniem ciągłości skóry.

## **1. Analiza interakcji mikrobiologicznej w praktyce klinicznej. Rodzaj wzajemnych oddziaływań pomiędzy makroorganizmem w stanie immunosupresji farmakologicznej a drobnoustrojami oportunistycznymi**

### **1.1. Czynniki zależne od makroorganizmu: biorcy narządów**

#### **1.2. Grzyby jako patogeny oportunistyczne**

##### **1.2.1. Czynniki zależne od patogenu oportunistycznego: zjadliwość grzybów drożdżopodobnych**

##### **1.2.2. Aspekty kliniczne interakcji grzybów drożdżopodobnych a makroorganizmu w immunosupresji**

##### **1.2.3. Czynniki zjadliwości grzybów drożdżopodobnych warunkujące zakażenia inwazyjne**

### **1.3. Interakcje pomiędzy wrażliwym makroorganizmem a oportunistycznym patogenem bakteryjnym na przykładzie *Acinetobacter baumannii***

#### **1.3.1. Badania problemu wielolekooporności na przykładzie *A. baumannii***

#### **1.3.2. Typowanie molekularne umożliwiające śledzenie przeniesienia szczepów patogenów oportunistycznych w warunkach oddziałów szpitalnych**

## **2. Interakcje pomiędzy patogenem o dużym potencjale zjadliwości a makroorganizmem bez czynników ryzyka**

### **2.1. Nosicielstwo *Staphylococcus aureus* w przedsionku nosa**

#### **2.1.1. Obecność czynników zjadliwości u *S. aureus* pochodzących z nosicielstwa**

## **3. Interakcje pomiędzy immunokompetentnym makroorganizmem a jego mikrobiomem**

### **3.1. Wpływ składu normalnej flory skóry na możliwość wystąpienia późnych powikłań po określonych zabiegach z naruszeniem ciągłości skóry**

### **3.2. Badanie związku wystąpienia powikłań bakteryjnych zabiegów z naruszeniem ciągłości skóry i wprowadzeniem ciała obcego z aktywnością życiową pacjentów, wpływającą na skład ich mikrobiomu**

### **3.3. Aspekty kliniczne przeprowadzonych badań**

## **4. Praktyczne zastosowanie otrzymanych wyników: czynniki ryzyka zależne od makroorganizmu – nowe ujęcie problemu**

Organizmy jednokomórkowe są wszechobecne: każde środowisko na Ziemi jest zamieszkane przez właściwe sobie drobnoustroje. Zasiedlają one każdy wielokomórkowy organizm. Liczba wszystkich komórek drobnoustrojów, które występują w organizmie ludzkim lub na jego powierzchni, 10-krotnie przewyższa liczbę komórek gospodarza, podczas gdy liczba genów drobnoustrojów jest 100-krotnie większa od liczby genów ludzkich. Zróżnicowana społeczność mikroorganizmów określana jako mikrobiota składa się z dużej liczby gatunków archeonów, bakterii, grzybów oraz wirusów. W ciągu ostatnich 10 lat niejednokrotnie udowodniono, że mikrobiota/mikrobiom człowieka (wcześniejsze określenie: flora fizjologiczna) jest bardzo istotnym czynnikiem wpływającym zarówno na utrzymanie stanu zdrowia, jak i na występowanie i rozwój różnych chorób. Należy jednak w tym przypadku uwzględnić fakt, że wśród tych schorzeń znajdują się również choroby o niezakaźnej etiologii. Wyniki dużej liczby badań wskazują na bezpośredni związek zaburzonego składu flory jelitowej z występowaniem otyłości, cukrzycy, astmy, atopowego zapalenia skóry, łuszczycy, nowotworów przewodu pokarmowego, chorób układu krążenia. Symbiotyczne mikroorganizmy poprzez swój istotny udział w endogennej przemianie tryptofanu kształtują odpowiedź immunologiczną oraz stan psychiczny gospodarza.

Makroorganizm i jego mikrobiom koegzystują w skomplikowanych wzajemnych relacjach. Charakter tej interakcji jest uzależniony od współwystępowania dwóch grup czynników: zależnych od gospodarza oraz zależnych od mikroorganizmów. Do czynników zależnych od gospodarza należą przede wszystkim stan odporności naturalnej i odpowiedzi immunologicznej oraz barierowa funkcja skóry i błon śluzowych. Czynniki zależne od mikroorganizmu to szeroko pojęte czynniki zjadliwości drobnoustroju. Często mikroorganizmy patogenne, o dużym potencjale zjadliwości, przy prawidłowo działającym układzie odpornościowym gospodarza i braku dodatkowych czynników ryzyka, występują jako drobnoustroje kolonizujące, nie powodując zakażenia (np. *Neisseria meningitidis* lub *Staphylococcus aureus*); i odwrotnie, mikroorganizmy typowo symbiotyczne, niepatogenne w określonych warunkach mogą powodować ciężkie postaci zakażeń. Przykładem mogą być: *Staphylococcus epidermidis* jako czynnik etiologiczny zakażenia miejsca operowanego w zabiegach z wszczepieniem ciała obcego lub *Candida parapsilosis* jako czynnik etiologiczny kandydozy układowej z punktem wyjścia z centralnej linii naczyniowej u chorego z neutropenią.

# **1. Analiza interakcji mikrobiologicznej w praktyce klinicznej. Rodzaj wzajemnych oddziaływań pomiędzy makroorganizmem w stanie immunosupresji farmakologicznej a drobnoustrojami oportunistycznymi**

## **1.1. Czynniki zależne od makroorganizmu: biorcy narządów**

Rozdział „Handling of Fungal Infections in Patients with Chronic Immunosuppression Post Renal Transplant” w podręczniku „After the Kidney Transplant – the Patients and Their Allograft” (IN1) powstał w wyniku współpracy międzynarodowej. W obszarze transplantologii klinicznej badania Zespołu Mikrobiologicznego koordynował prof. Piotr Fiedor z Instytutu Transplantologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w formie publikacji naukowej we współpracy z *Einstein Medical Center Philadelphia* pod kierunkiem prof. Jorge Ortiza, który jednocześnie jest Redaktorem naukowym podręcznika. Wyniki te są efektem realizacji projektu naukowo-badawczego Grant 3G8 „Opracowanie strategii diagnostycznej pozwalającej na zapobieganie i wczesne wykrycie grzybicy uogólnionej u biorców narządów unaczynionych w oparciu o ocenę czynników ryzyka oraz istotnych w patogenezie cech wirulencji grzybów” pod kierownictwem dr hab. n. med. Ewy Swobody-Kopeć, którego byłam jednym z głównych wykonawców.

Powyższa publikacja cyklu przedstawia sposób interakcji makroorganizmu o licznych czynnikach ryzyka i znacznie upośledzonej funkcji układu immunologicznego z grzybami, drobnoustrojami typowo oportunistycznymi, symbiontami niepowodującymi zakażenia w warunkach braku dodatkowych obciążeń. Przewlekłe leczenie immunosupresyjne zapobiegające odrzucaniu przeszczepu hamuje odpowiedź typu komórkowego i jednocześnie znacząco zwiększa podatność na zakażenia, szczególnie drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi, do których należą grzyby. Liczne dodatkowe czynniki ryzyka w tej grupie chorych wynikają z choroby podstawowej, która doprowadziła do schyłkowej niewydolności nerek, oraz przebytego skomplikowanego zabiegu operacyjnego.

Efektom wieloletnich obserwacji grupy 1301 biorców nerki ze zwłok i/lub od dawcy rodzinnego było opracowanie schematu postępowania diagnostycznego zmierzającego do rozpoznania zakażenia grzybiczego we właściwym czasie, który jest krytycznym warunkiem skuteczności leczenia antymikotycznego. Jednocześnie została przedstawiona szczegółowa analiza czynników zależnych od biorcy w różnych okresach po przeszczepieniu.

Zdefiniowano czynniki ryzyka zakażenia grzybiczego, spośród których stwierdzenie dwóch zobowiązuje do wdrożenia aktywnego monitoringu biorcy.

We wczesnym okresie potransplantacyjnym (kilka dni po zabiegu) bardzo istotne są czynniki, których obecność została stwierdzona przed zabiegiem przeszczepienia:

- kolonizacja skóry i błon śluzowych przez grzyby drożdżopodobne lub pleśniowe
- indukcja immunosupresji czynnikami biologicznymi u pacjentów wysoce immunizowanych
- terapia antybiotykami szerokiego spektrum z powodu zakażeń bakteryjnych
- przetoczenia krwi
- szczególnie zagrażająca możliwość transmisji dawca–biorca czynnika kolonizującego lub powodującego zakażenie grzybicze u dawcy, zwłaszcza zmarłego. W celu wykluczenia takiego czynnika ryzyka niezbędne jest wykonanie posiewów krwi i moczu dawcy w kierunku grzybów
- zanieczyszczenie grzybami płynu prezerwacyjnego.

Czynniki ryzyka występujące we wczesnym okresie (do miesiąca):

- kolonizacja skóry lub błon śluzowych szczepami grzybów drożdżopodobnych
- infekcje bakteryjne
- kolejny zabieg przeszczepienia nerki
- ostra niewydolność nerki przeszczepionej
- reoperacje z powodu wczesnych powikłań pooperacyjnych
- przedłużony czas zabiegu przeszczepienia
- terapia ostrego odrzucania przeszczepu wysokimi dawkami sterydów lub czynnikami biologicznymi
- podwyższone poziomy leków podstawowego schematu immunosupresji.

Czynniki ryzyka w pośrednim okresie (od 1 do 6 miesięcy):

- kolonizacja skóry lub błon śluzowych szczepami grzybów drożdżopodobnych
- terapia ostrego odrzucania przeszczepu wysokimi dawkami sterydów lub czynnikami biologicznymi
- zakażenie lub reaktywacja zakażeń wirusami immunomodulującymi: CMV, HHV, EBV
- leukopenia, hipogammaglobulinemia
- nawracające zakażenia bakteryjne
- długotrwała antybiotykoterapia.

Czynniki ryzyka w późnym okresie potransplantacyjnym (ponad 6 miesięcy):

- kolonizacja skóry lub błon śluzowych szczepami grzybów drożdżopodobnych

- terapia ostrego odrzucania przeszczepu wysokimi dawkami sterydów lub czynnikami biologicznymi
- zakażenie wirusami immunomodulującymi: CMV, HHV, EBV
- leukopenia, hipogammaglobulinemia
- nawracające zakażenia bakteryjne
- długotrwała antybiotykoterapia
- przewlekła nefropatia nerki przeszczepionej
- terapia chorób nowotworowych.

## 1.2. Grzyby jako patogeny oportunistyczne

Przykładem interakcji pomiędzy makroorganizmem w immunosupresji a patogenem oportunistycznym są ciężkie, trudne do leczenia, czasami śmiertelne zakażenia występujące u biorców nerki powodowane przez grzyba drożdżopodobnego należącego do gatunku *Trichosporon asahii*. U osób immunokompetentnych drobnoustrój ten nie powoduje zakażeń inwazyjnych. Rodzaj interakcji w tym przypadku może polegać na kolonizacji skóry lub wywoływaniu piodry białej – zmian występujących wyłącznie na włosach, które dotyczą mieszkańców równikowej strefy klimatycznej.

W swojej pracy „*Trichosporon asahii* as a prospective pathogen in solid organ transplant recipients” (P2) analizowałam częstość występowania tego gatunku u biorców nerek, wątroby oraz chorych po zabiegach jednoczesnego przeszczepienia nerek i trzustki. Obserwacje były prowadzone przez 3 lata w Instytucie Transplantologii w Warszawie. *T. asahii* został wyizolowany w 26 próbkach pobranych od 18 biorców i 1 dawcy spośród 475 pobranych od 263 biorców narządów oraz 26 dawców. To stanowiło 6% wszystkich dodatnich w kierunku grzybów próbek pobranych od biorców narządów.

Standardowy protokół immunosupresji składał się ze stosowania kortykosteroidów, inhibitorów kalcyneuryny: cyklosporyny A i takrolimusu, lub leku antyproliferacyjnego – mykofenolanu mofetylu. Większość przypadków wyhodowań była związana z bezobjawową kolonizacją układu moczowego. W dwóch przypadkach dodatnie posiewy wiązały się z zakażeniami objawowymi u biorców nerki: zapaleniem najądrza oraz urosepsą. Oporność na leki przeciwgrzybicze często występująca u *T. asahii* stanowi poważne zagrożenie. Spośród 18 wyizolowanych szczepów 11 było opornych na flukonazol, 4 na itraconazol, a 3 na amfoterycynę B (P2). Badanie profilu lekowrażliwości grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* na antymikotyki stanowiło temat pracy: Gołaś M, Sikora M, Piskorska K, Sulik-Tyszka B, Netsvyetayeva I, Swoboda-Kopeć E. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* species – one year observation. Polish Journal of Microbiology. 2014;63(2):217-

-222 (P7). Wyniki otrzymano w trakcie opracowywania pracy magisterskiej Marleny Gołaś, której byłam opiekunem.

W swojej pracy „Porównanie gatunków grzybów drożdżopodobnych wyhodowanych z moczu pacjentów po zabiegach przeszczepienia narządów mięsnych z gatunkami wyhodowanymi z moczu pacjentów internistycznych” (P11) wykazałam różnice w spektrum grzybów drożdżopodobnych, które powodują zakażenia lub kolonizują układ moczowy biorców nerki i tych wyhodowanych u osób leczonych z powodu chorób internistycznych. W grupie biorców *T. asahii* stanowi trzeci co do częstości gatunek drożdżaków po *C. glabrata* i *C. albicans*. Nie został on natomiast stwierdzony wśród chorych internistycznych. W tej grupie dominuje *C. albicans*, a *C. glabrata* znajduje się na drugim miejscu.

### **1.2.1. Czynniki zależne od patogenu oportunistycznego: zjadliwość grzybów drożdżopodobnych**

Do najważniejszych czynników wirulencji grzybów drożdżopodobnych należy zdolność tworzenia biofilmu na powierzchniach sztucznych i tkankach biologicznych, co jest uwarunkowane obecnością adhezyn, zjawiskiem *phenotypic switching* i zdolnością wytwarzania pseudostrzępek oraz produkcją różnego rodzaju enzymów.

W warunkach prawidłowo działającego układu immunologicznego oraz w początkowym stadium zakażenia u chorych w immunosupresji interakcja pomiędzy makro- a mikroorganizmem polega na kolonizacji przez grzyba skóry i błon śluzowych gospodarza oraz powierzchni ciał obcych (cewników, drenów, implantów, linii naczyniowych). Komórki grzybów ulegają adhezji, a następnie namnażają się, tworząc linearną kolonię, która powszechnie jest nazywana biofilmem (ang. film – warstwa) – błona biologiczna oznacza zorganizowaną populację drobnoustrojów osadzoną w wytworzonej przez nie macierzy, występującej na powierzchniach żywych tkanek makroorganizmu lub na powierzchniach sztucznych. Komórki mikroorganizmów tworzące biofilm są zawieszane w matrycy utworzonej z biopolimerów i wody. Jest to warstwowy, złożony strukturalnie i funkcjonalnie system cechujący się dużą dynamiką, w którym poszczególne elementy spełniają różne funkcje, pozostając we wzajemnych relacjach i zależnościach, oraz przekazują sobie informacje. Drobnoustroje wchodzące w skład biofilmu wykazują zasadniczo inne właściwości niż komórki planktoniczne.

Występowanie biofilmu na powierzchni tkanek żywych jest bardzo ciekawym i do tej pory nie do końca poznanym sposobem interakcji pomiędzy makro- a mikroorganizmem. Tworząc biofilm, drobnoustroje – zarówno grzyby, jak i bakterie – kolonizują tkanki, najczęściej błony



śluzowe i uszkodzoną skórę gospodarza. Kolonizacja błony śluzowej dolnego odcinka układu moczowego jest częstym zjawiskiem obserwowanym w warunkach upośledzonego odpływu moczu, który może być spowodowany przerostem prostaty, kamicy nerkową, przeszczepieniem nerki, obecnością cewnika, pęcherzem neurogennym, ciążą. Biofilm wielobakteryjny lub bakteryjno-drożdżakowy na powierzchni ran przewlekłych i odleżyn uniemożliwia prawidłowy proces gojenia.

Dalszy przebieg interakcji jest zależny od stanu immunologicznego makroorganizmu. Antygeny grzybów należących do rodzaju *Candida* bytujące w postaci biofilmu indukują odpowiedź immunologiczną makroorganizmu polegającą na stymulacji wytwarzania IL-2, IL--17 oraz IFN- $\gamma$ . Uniemożliwia to inwazję i przejście kolonizacji w stadium zakażenia. Podatność na inwazyjne zakażenia drożdżakowe występująca u chorych w stanie immunosupresji jest zatem uwarunkowana brakiem odpowiedniej reakcji ze strony Th1 na stymulację antygenową.

### **1.2.2. Aspekty kliniczne interakcji grzybów drożdżopodobnych a makroorganizmu w immunosupresji**

Biofilm drożdżakowy występujący na skórze i błonach śluzowych jest najczęstszą formą interakcji pomiędzy makro- a mikroorganizmem (**P17**) i przejawem kolonizacji, która w większości przypadków nie wymaga leczenia. Jednak ryzyko inwazji grzybów w głąb tkanek osób w stanie immunosupresji jest bardzo duże. Aktywny monitoring biorców z dodatkowymi czynnikami ryzyka zakażenia grzybiczego oraz schematy diagnostyczne pozwalające różnicować kolonizację z zakażeniem są niezbędnymi elementami opieki potransplantacyjnej. W pracy „Handling of Fungal Infections in Patients with Chronic Immunosuppression Post Renal Transplant” (**IN1**) została opracowana strategia postępowania zmierzającego do szybkiego rozpoznania grzybicy układowej w przypadku podejrzenia jej występowania. Postępowanie diagnostyczne powinno się opierać na wszystkich dostępnych metodach badania: klinicznych, radiologicznych, histologicznych, metodach klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej, serologicznych, enzymatycznych oraz metodach biologii molekularnej. Należy jednak podkreślić, że każda z wymienionych metod diagnostycznych obarczona jest znaczącymi ograniczeniami. Decyzja o niezbędności wdrożenia terapii przeciwgrzybiczej powinna się opierać na interpretacji wyników co najmniej kilku badań.

Podstawowym, niezbędnym elementem diagnostycznym pozostaje hodowla czynnika etiologicznego z naturalnie jałowych, aseptycznie pobranych materiałów: krwi i innych płynów ustrojowych, materiałów biopsyjnych, materiałów uzyskanych z dolnych dróg oddechowych.

Mikrobiologiczne kryteria rozpoznania grzybic uogólnionych obejmują:

- dodatnie wyniki posiewów z krwi i innych fizjologicznie jałowych jam ciała
- stwierdzenie obecności grzybni w preparacie bezpośrednim wykonanym z badanego materiału
- identyfikację antygenów krążących metodami serologicznymi
- identyfikację materiału genetycznego grzyba w próbkach klinicznych pochodzących z miejsc naturalnie jałowych
- identyfikację swoistych przeciwciał (ograniczone zastosowanie, wątpliwa wartość)
- stwierdzenie obecności charakterystycznych enzymów grzybów w moczu lub w innych płynach ustrojowych
- stwierdzenie obecności morfologicznych fragmentów grzyba w tkankach pobranych metodą biopsji.

Różnicowanie kolonizacji z zakażeniem:

- Równoczesne wyhodowanie szczepu tego samego gatunku z różnych miejsc pobrania (co najmniej trzech)
- Wielokrotne wyhodowanie szczepu tego samego gatunku z jednego miejsca pobrania
- Równoczesne występowanie grzybiczych antygenów krążących w surowicy lub w innych naturalnie jałowych płynach ustrojowych
- Znamienny (co najmniej 4-krotny) wzrost miana przeciwciał w surowicy
- Występowanie enzymów hydrolitycznych charakterystycznych dla danego gatunku w płynach ustrojowych (**IN1**).

Algorytm stosowania poszczególnych metod diagnostyki mikologicznej pozwalający na odróżnienie kolonizacji od zakażenia został przedstawiony w pracy „Algorithm of Clinical Protocol Lowering the Risk of Systemic Mycosis Infections in Allografts Recipients” (**P1**).

Aspektom klinicznym diagnostyki zakażeń grzybami pleśniowymi należącymi do rodzaju *Aspergillus* były poświęcone badania, których wyniki prezentują prace: Swoboda-Kopeć E, Gołaś M, Piskorska K, Dąbkowska M, **Niecwietajewa I**, Pączek L, Sikora M. *Aspergillus* galactomannan detection in comparison to a real-time PCR assay in serum samples from a high-risk group of patients. Cent Eur J Immuno. 2015;40(4):454-460 (**P8**) oraz Swoboda-Kopeć E, Sikora M, Piskorska K, Gołaś M, **Netsvyetayeva I**, Przybyłowska D, Mierzwińska-Nastalska E. Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. Adv Exp Med Biol. 2017;944:27-33 (**P9**).

### 1.2.3. Czynniki zjadliwości grzybów drożdżopodobnych warunkujące zakażenia inwazyjne

Do czynników wirulencji umożliwiających inwazję drożdżaków w głąb tkanek makroorganizmu należą różnego rodzaju enzymy. Fosfolipazy i lipazy charakteryzują się zróżnicowanym profilem substratowym i są odpowiedzialne za hydrolizę fosfolipidów, co sprzyja wniknięciu drobnoustrojów do komórek nabłonkowych. Różne rodziny proteaz są uznawane za podstawowe enzymy determinujące zjadliwość drożdżaków z rodzaju *Candida*. Proteinaza asparaginowa (SAP) jest enzymem polipeptydowym powodującym hydrolizę wiązań peptydowych białek gospodarza, w tym białek zaangażowanych w procesy odpowiedzi na zakażenie grzybicze. Proteazy yapsynowe (YPS) występujące przede wszystkim u *C. glabrata* oraz innych gatunków umożliwiają grzybom przeżycie wewnątrz makrofagów i uwalnianie się z nich. Wewnątrz komórek nabłonkowych drożdżaki ulegają namnożeniu, co w efekcie prowadzi do zniszczenia komórek makroorganizmu i dalszej inwazji grzybiczej.

Wykrywanie genów kodujących proteazy YPS, głównych czynników zjadliwości grzybów drożdżopodobnych należących do gatunku *C. glabrata*, było przedmiotem badań w pracy „*Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*” (IN2). Stanowiła ona rozwinięcie tematu mojej rozprawy doktorskiej, która dotyczyła określenia cech zjadliwości i oporności charakterystycznych dla różnych fenotypów gatunku *Candida parapsilosis* (P12, P14).

Głównym celem pracy „*Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*” (IN2) było określenie cech charakterystycznych dla różnych form fenotypowych, zjawiska *phenotypic switching* występującego w obrębie gatunku *C. glabrata* oraz oszacowanie częstości występowania nowych gatunków *Candida nivariensis* i *Candida bracarensis* należących do kompleksu *C. glabrata*. Ponadto podjęłam próbę oceny różnic ich zjadliwości na podstawie wykrywania genów kodujących proteazy yapsynowe.

Materiał do badań stanowiły 224 kliniczne szczepy *C. glabrata* wyhodowane z materiałów pobranych od chorych hospitalizowanych w Szpitalu Klinicznym Dzieciątka Jezus w latach 2010 – 2012. W celu określenia fenotypu kolonii zidentyfikowane szczepy hodowano na podłożu CHROMagar *Candida*. Potwierdzenie przynależności wyhodowanych szczepów do gatunku zostało przeprowadzone metodą klasycznej techniki PCR i polegało na detekcji genu *CGL1* (region ITS – internal transcribed spacer) charakterystycznego dla gatunku *C. glabrata*. Szczepy o niepotwierdzonej przynależności do gatunku *C. glabrata* zostały poddane

sekwencjonowaniu przy użyciu starterów specyficznych dla gatunków *C. nivariensis* i *C. braccarensis*. Wyniki sekwencjonowania analizowane były w programie BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Detekcja genów kodujących YPS2, YPS4, YPS6 została przeprowadzona metodą klasycznej PCR ze starterami specyficznymi dla ich genów kodujących.

Otrzymane wyniki były następujące:

1. W grupie 224 szczepów, których identyfikacja do gatunku *C. glabrata* została przeprowadzona przy użyciu testów asymilacyjnych, stwierdzono fenotypy: biały (W) – 33 szczepy, jasnoróżowy (LP) – 152 szczepy, ciemnoróżowy (DP) – 39 szczepów.
2. Analiza genotypowa wykazała obecność 13 z 224 szczepów nieposiadających genu *CGL1* (przynależność do gatunku *C. glabrata* nie została potwierdzona genetycznie).
3. Wszystkie 13 szczepów, których przynależność do gatunku *C. glabrata* nie została potwierdzona genetycznie, prezentowało fenotyp biały (W).
4. Wyniki przeprowadzonego sekwencjonowania wszystkich 13 szczepów po analizie w programie BLAST wykazały 99% homologii do gatunku *C. nivariensis*.
5. Nie wykryto szczepów wykazujących homologię do gatunku *C. braccarensis*.
6. 70% szczepów należących do gatunku *C. glabrata* charakteryzowało się obecnością trzech wybranych do badania genów proteaz yapsynowych: YPS2 + YPS4 + YPS6; 15% – YPS2 + YPS6; 7% – YPS4 + YPS6; 6% – YPS2 + YPS4; obecnością tylko jednego z trzech genów – YPS6 charakteryzowało się 2% badanych szczepów o potwierdzonej przynależności do gatunku *C. glabrata*.
7. Szczepy należące do gatunku *C. nivariensis* stanowiły 6% spośród ogólnej liczby klinicznych szczepów należących do gatunku *C. glabrata* zidentyfikowanych metodami klasycznej diagnostyki mykologicznej.
8. W grupie 13 szczepów zidentyfikowanych jako *C. nivariensis* 77% (10 izolatów) nie posiadało genów z rodziny proteaz yapsynowych. Jeden szczep (7%) posiadał gen YPS4, dwa szczepy (14%) posiadały jednocześnie dwa geny: 1 – YPS2 + YPS6 oraz 1 – YPS2 + YPS4.

Sformułowano następujące wnioski:

1. Fenotypem *C. glabrata*, który najczęściej występował w grupie badanej, był fenotyp LP (jasnoróżowy), który wykazywał obecność wszystkich trzech genów proteaz yapsynowych, co może świadczyć o jego największym potencjale zjadliwości.
2. Wszystkie szczepy zidentyfikowane jako *C. nivariensis* prezentowały fenotyp biały.
3. Szczepy zidentyfikowane jako *C. nivariensis* wykazywały znacznie rzadsze występowanie genów kodujących enzymy z rodziny YPS w porównaniu z *C. glabrata*, co może świadczyć o ich mniejszym potencjale zjadliwości w porównaniu ze szczepami *C. glabrata*.

Próba scharakteryzowania różnych fenotypów w obrębie gatunku *C. glabrata* poskutkowała izolacją i identyfikacją „nowego” wówczas gatunku *C. nivariensis* występującego jako jeden z genogatunków w obrębie „starego” gatunku *C. glabrata*. Było to pierwsze doniesienie na ten temat pochodzące z Polski (**IN2**).

Diagnostyczne aspekty wykrywania nowego gatunku *C. nivariensis* zostały opublikowane w pracy „Różnicowanie gatunków w kompleksie *Candida glabrata*. *Candida nivariensis* – nowy potencjalny patogen?” (**P16**).

W pracy „Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients” (**P3**) zostały opublikowane wyniki badań określające czynniki zjadliwości grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* występujące w grupie chorych żywionych pozajelitowo. Chorzy otrzymujący całkowite żywienie pozajelitowe należą do grupy zwiększonego ryzyka kolonizacji i/lub zakażeń o etiologii grzybiczej. W tej grupie zaobserwowano dominację gatunku *C. glabrata*, w odróżnieniu od grupy biorców narządów mięsnych, w której dominują *C. albicans* (**IN1**). *C. glabrata* jest gatunkiem o naturalnej obniżonej wrażliwości na flukonazol, antymikotyk pierwszego rzutu najczęściej stosowany zarówno w leczeniu otwartym, jak i zamkniętym. Dominacja tego gatunku może być związana z presją selekcyjną w konsekwencji rutynowo stosowanej u chorych z całkowitym żywieniem pozajelitowym medycznej profilaktyki przeciwgrzybiczej. Jest to uzasadnione postępowanie ze względu na to, że jest to grupa chorych szczególnie narażona na fungemie odcewnikowe, zakażenia obarczone wysoką śmiertelnością. W wyniku przeprowadzonej analizy obecności poszczególnych enzymów z rodziny SAP u *C. albicans* i YPS u *C. glabrata* stwierdzono jednoznacznie korelację pomiędzy liczbą genów kodujących poszczególne grupy enzymów proteolitycznych (SAP1-10; YPS2, YPS4, YPS6) i poziomem ich sekrecji a zjadliwością szczepu. Największą liczbę genów kodujących proteazy i wyższy poziom sekrecji

stwierdzono u szczepów powodujących zakażenia w porównaniu ze szczepami kolonizującymi (P3).

### **1.3. Interakcje pomiędzy wrażliwym makroorganizmem a oportunistycznym patogenem bakteryjnym na przykładzie *Acinetobacter baumannii***

Rodzaj wzajemnych oddziaływań podobny do interakcji pomiędzy chorym w immunosupresji a patogenem grzybiczym występuje u obciążonych chorych chirurgicznych w stosunku do oportunistycznych patogenów bakteryjnych. Typowym przykładem takiego patogenu jest *Acinetobacter baumannii*, Gram-ujemna pałeczka niefermentująca glukozy o względnym potencjale zjadliwości, niepowodująca zakażeń u osób bez czynników ryzyka. Charakterystyczną cechą tego gatunku jest naturalna oporność na większość antybiotyków rutynowo stosowanych w leczeniu zakażeń oraz wysoce rozwinięta zdolność wykształcania lekooporności nabytej. Cechuje się on również zdolnością wzrostu w postaci biofilmu na powierzchniach biologicznych i sztucznych. W przypadku obecności tego drobnoustroju na powierzchni skóry, błon śluzowych lub ciał obcych znajdujących się w ustroju gospodarza z wydolnymi mechanizmami naturalnej odporności typu komórkowego nie dochodzi do inwazji tkanek. Rodzaj interakcji pomiędzy makro- a mikroorganizmem w tym przypadku polega wyłącznie na zjawisku kolonizacji. W ostatnim czasie obserwowane jest wzrastające znaczenie gatunku *A. baumannii* jako czynnika etiologicznego zakażeń związanych z opieką zdrowotną. Uwarunkowaniem tego jest wybitna zdolność przeżycia w środowisku szpitalnym, gatunkowo-specyficzna wielolekooporność oraz zdolność wytwarzania w krótkim czasie różnorodnych mechanizmów lekooporności nabytej pod wpływem presji antybiotykowej. Oporność bakterii na leki najczęściej powstaje w wyniku mutacji chromosomalnych lub plazmidowych. Następnie w wyniku selekcji dochodzi do rozprzestrzeniania się tej nowo nabytej cechy w środowisku oddziału szpitalnego. Terapia zakażeń wielolekoopornymi szczepami *A. baumannii* MDR (*multidrug-resistant*) jest bardzo trudna ze względu na znacznie ograniczoną liczbę leków o udowodnionej skuteczności klinicznej.

#### **1.3.1. Badania problemu wielolekooporności na przykładzie *A. baumannii***

W pracy „*Acinetobacter baumannii* Multidrug-Resistant Strain Occurrence in Liver Recipients With Reference to Other High-Risk Groups” (IN3) przeprowadziłam analizę wielolekoopornych szczepów *A. baumannii*, które powodowały zakażenia układowe u biorców wątroby w porównaniu z grupą chorych z powikłaniami septycznymi po zabiegach z powodu choroby nowotworowej jelita grubego oraz grupą chorych z zakażeniem miejsca operowanego

po zabiegach otwartego zespolenia złamań kończyn dolnych z wszczepieniem ciała obcego. Badanie zostało przeprowadzone w dwóch warszawskich szpitalach: Szpitalu Klinicznym Dzieciątka Jezus oraz Wojewódzkim Szpitalu Urazowym św. Anny.

Analizy wzorów lekooporności dokonano na podstawie metody fenotypowej, zdolność wytwarzania enzymów rozkładających karbapenemy oceniono przy użyciu klasycznej metody PCR ze starterami specyficznymi dla genów kodujących poszczególne karbapenemazy.

Uzyskano następujące wyniki:

1. Oporność na karbapenemy stwierdzono u jednego spośród pięciu szczepów uzyskanych od biorców wątroby, u trzech spośród sześciu uzyskanych od pacjentów z chorobą nowotworową oraz dwóch spośród pięciu szczepów uzyskanych od pacjentów z powikłanymi urazami narządu ruchu.
2. Metodą fenotypową DDST nie wykryto szczepów *A.baumannii* produkujących MBL, wyhodowanych z wymazów uzyskanych od wszystkich przebadanych grup pacjentów.
3. Nie stwierdzono również produktów reakcji amplifikacji PCR ze starterami specyficznymi dla genów VIM, IMP oraz SPM.
4. Wszystkie badane szczepy prezentowały wrażliwość na kolistynę.
5. Piętnaście z 16 przeanalizowanych szczepów posiadało gen OXA51.
6. Dwa spośród 5 szczepów *A. baumannii* wyizolowane od biorców wątroby posiadały wyłącznie gen OXA51, 1 – geny OXA51 oraz OXA24, 1 – geny OXA51 oraz OXA23.
7. Jeden szczep prezentujący fenotypową wrażliwość na wszystkie podstawowe leki o potencjalnej aktywności wobec *A. baumannii* wykazał brak posiadania genów typu OXA.
8. Trzy spośród 6 szczepów wyizolowanych od pacjentów z chorobą nowotworową jelita grubego posiadały wyłącznie gen OXA51, 2 spośród 6 – gen OXA51 oraz OXA 58, 1 spośród 6 – gen OXA51 oraz OXA23.
9. Dwa spośród 5 szczepów wyhodowanych od pacjentów z powikłanymi urazami narządu ruchu posiadały wyłącznie gen OXA51, 3 spośród 5 – geny OXA51 oraz OXA58.

We wnioskach stwierdzono, że lekooporność szczepów *A. baumannii* na analizowanych oddziałach jest uwarunkowana wyłącznie przez enzymy należące do rodziny OXA, które są uważane za charakterystyczny dla pałeczek niefermentujących mechanizm oporności nabytej na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe.

### **1.3.2. Typowanie molekularne umożliwiające śledzenie przeniesienia szczepów patogenów oportunistycznych w warunkach oddziałów szpitalnych**

W pracy „The Probability of the *Acinetobacter baumannii* Strain Clonal Spreading in Donor-recipient Systems, as Confirmed by the Molecular Analysis of Randomly Amplified Polymorphic DNA” (P4) została przeprowadzona analiza pokrewieństwa genetycznego 13 szczepów *A. baumannii* wyhodowanych od 8 dawców i 5 biorców wątroby metodą RAPD-PCR. Nie stwierdzono klonalnego rozprzestrzenienia się szczepów *A. baumannii* wśród pacjentów poddanych zabiegom przeszczepienia wątroby. Szczepy wyhodowane z próbek uzyskanych od biorców i dawców wątroby nie wykazały pokrewieństwa genetycznego. Dla wszystkich pięciu izolatów uzyskano unikatowe wzory prążków wizualizujące produkty RAPD-PCR.

Sześć szczepów wyizolowanych z próbek uzyskanych od pacjentów z chorobą nowotworową zakwalifikowano do trzech typów, pięć szczepów pochodzących od pacjentów z urazami narządu ruchu – do dwóch typów genetycznych, co nie wyklucza klonalnego ich szerzenia się w obrębie analizowanych oddziałów o profilu chirurgicznym i ortopedycznym (P4).

W pracy „PCR melting profiles of *Candida glabrata* clinical isolates in solid-organ transplant recipients in comparison to the other group of surgical patients” (P6) zostały opublikowane wyniki badań nad częstością występowania oraz pochodzeniem szczepów należących do gatunku *C. glabrata*, które powodowały zakażenia/kolonizację u biorców wątroby, w porównaniu z grupą chorych otrzymujących całkowite żywienie pozajelitowe. Przy użyciu klasycznych metod diagnostyki mykologicznej stwierdzono, że w grupie biorców częstość występowania *C. glabrata* wynosiła 29%, natomiast w grupie chorych otrzymujących całkowite żywienie pozajelitowe – 54% spośród wszystkich szczepów grzybów drożdżopodobnych. Przy użyciu metody genotypowania stwierdzono, że u biorców wątroby szczepy *C. glabrata* miały pochodzenie endogenne. W grupie chorych żywionych pozajelitowo zaobserwowano przypadki przeniesienia czynników etiologicznych zakażeń drożdżakowych z pacjenta na pacjenta (P6).



## **2. Interakcje pomiędzy patogenem o dużym potencjale zjadliwości a makroorganizmem bez czynników ryzyka**

### **2.1. Nosicielstwo *Staphylococcus aureus* w przedsionku nosa**

Rodzaj interakcji pomiędzy makro- a mikroorganizmem radykalnie różniący się od opisanego w powyższych badaniach został przedstawiony w pracy „*Staphylococcus aureus* nasal carriage in Ukraine: antibacterial resistance, and virulence factor encoding genes” (IN4). W tym przypadku analizie poddano występowanie *S. aureus*, patogenu najczęściej powodującego zakażenia u osób bez zaburzeń immunologicznych i innych znaczących czynników ryzyka.

#### **2.1.1. Obecność czynników zjadliwości u *S. aureus* pochodzących z nosicielstwa**

Materiały do badania zostały uzyskane w trakcie Misji Medycznej „Ukraina – Mołdawia 2011” zorganizowanej przez Stowarzyszenie Wspólnota Polska i Ministerstwo Zdrowia RP. Powody podjęcia tego badania były dwa: po pierwsze, brak danych w piśmiennictwie światowym pochodzących z tego regionu na temat częstości występowania w populacji nosicielstwa *S. aureus* MSSA i MRSA oraz profilu ich zjadliwości i lekooporności; po drugie, możliwość uzyskania materiału do badań pochodzącego od licznej grupy osób ze środowiska pozaszpitalnego.

Grupę badaną stanowili obywatele Ukrainy zgłaszający się po poradę lekarską do polskich lekarzy (uczestników misji) z powodu schorzeń internistycznych. Kryteria włączenia do badania stanowiły: wiek powyżej 18 lat, brak objawów sugerujących aktywne zakażenie, immunosupresji, chorób autoagresywnych, brak hospitalizacji i antybiotykoterapii stosowanej w okresie 3 miesięcy poprzedzających badanie oraz zebranie dokładnego wywiadu chorobowego. Materiałem do badania były wymazy z przedsionka nosa od 357 osób pobrane na podłoża transportowe, które zostały dostarczone do opracowania w Polsce. Hodowlę, izolację, identyfikację i oznaczanie lekowrażliwości przeprowadzano klasycznymi metodami rutynowo stosowanymi w diagnostyce mikrobiologicznej. Szczepy MRSA identyfikowano za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej oraz klasycznej metody PCR ze starterami specyficznymi dla genu *mecA*. Zidentyfikowane szczepy MSSA i MRSA poddano badaniu na obecność wybranych czynników wirulencji: toksyny Panton-Valentine, odpowiedzialnej za martwicze zapalenie płuc; białka wiążącego fibronektynę, odgrywającego zasadniczą rolę w adhezji do tkanek makroorganizmu; toksyn eksfoliatywnych, odpowiedzialnych za gronkowcowy zespół oparzonej skóry. W tym celu zastosowano standardową metodę PCR ze starterami specyficznymi dla ich genów kodujących: *fnbA*, *eta*, *etb*, *etd*, *lukE-lukD*.

Uzyskano następujące wyniki:

1. Nosicielstwo *S. aureus* w przedsionku nosa w badanej grupie stanowiło 40,34%.
2. Częstość występowania MRSA wynosiła 9,09%.
3. Gen kodujący *fibronectin-binding protein A* wykryto u 59,59% wyizolowanych szczepów *S. aureus*.
4. Geny kodujące *Panton-Valentine leukocidin* wykryto u 58,58% szczepów.
5. Geny kodujące *Exfoliative toxins* wykryto u 39,39% szczepów.

Wnioski płynące z tego badania dotyczyły częstości nosicielstwa w przedsionku nosa mieszkańców Ukrainy gronkowca złocistego MSSA i MRSA, która okazała się znacznie wyższa niż wśród obywateli Polski i innych krajów Europy. Stwierdzono zaskakująco duży odsetek wysoce zjadliwych szczepów występujących jako czynniki kolonizujące u osób immunokompetentnych, bez dodatkowych czynników ryzyka (IN4).

### **3. Interakcje pomiędzy immunokompetentnym makroorganizmem a jego mikrobiomem**

#### **3.1. Wpływ składu normalnej flory skóry na możliwość wystąpienia późnych powikłań po określonych zabiegach z naruszeniem ciągłości skóry**

Kolejny rodzaj interakcji pomiędzy drobnoustrojem a makroorganizmem został wykazany w pracy „Skin bacterial flora as a potential risk factor predisposing to late bacterial infection after cross-linked hyaluronic acid gel augmentation” (IN5). Grupa pacjentek kliniki medycyny estetycznej, u których wystąpiło zakażenie po podaniu do tkanki podskórnej twarzy usieciowanego kwasu hialuronowego, stanowi ciekawy model do badania wzajemnych relacji pomiędzy organizmem ludzkim a jego mikrobiotą. Jest to grupa osób zdrowych, bez dodatkowych obciążeń i zaburzeń immunologicznych. Obecnie nie budzi żadnych wątpliwości fakt, że usieciowany kwas hialuronowy stosowany jako wypełniacz w medycynie estetycznej i innych dziedzinach medycyny do momentu jego degradacji stanowi ciało obce w obrębie tkanek miękkich. Późne powikłania infekcyjne przebiegające w postaci guzów zapalnych, które występują w okresie dłuższym niż 4 tygodni od momentu jego podania, są uwarunkowane zakażeniem związanym ze wzrostem bakterii w postaci biofilmu na powierzchni wypełniacza. Są to rzadkie, ale niezwykle trudne do leczenia powikłania, często pozostawiające chorą z na stałe zdeformowaną twarzą, co w znacznym stopniu pogarsza komfort życia. Pierwsza obserwacja takiego przypadku została opisana w pracy: Marusza W, Mlynarczyk G, Olszanski R, Netsvyetayeva I, Obrowski M, Iannitti T, Palmieri B. Probable biofilm formation in the cheek as a complication of soft tissue filler resulting from improper endodontic treatment of tooth 16. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1441-7 (P5).

Pomimo wyraźnych przesłanek wynikających ze stanu miejscowego (obrzęk, stwardnienie, zaczerwienienie, ból, ropna wydzielina, powstanie przetok) potwierdzających bakteryjną etiologię tego powikłania oraz licznych prób, do tej pory nie udało się jednoznacznie zidentyfikować czynnika etiologicznego tych zakażeń. Jest to dodatkowy argument potwierdzający jego „biofilmową” hipotezę. Grubość warstwy biofilmu na powierzchni sztucznej stanowi od 5 do 1200  $\mu\text{m}$ , co niezwykle utrudnia pobranie reprezentatywnej próbki do badania. Z tym jest związane uzyskanie fałszywie ujemnych wyników badań z zastosowaniem klasycznych metod diagnostyki mikrobiologicznej. Za reprezentatywne metody uznaje się: biopsję z późniejszym wykorzystaniem PNA-FISH lub *Three-dimensional confocal laser scanning microscopy*; obserwację bezpośrednią przy użyciu *Confocal laser scanning micrograph*. Trudno jednak byłoby się spodziewać zgody ze strony chorej na pobranie wycinka oraz obecności urządzeń tego typu w klinikach medycyny estetycznej.

W pracy „Skin bacterial flora as a potential risk factor predisposing to late bacterial infection after cross-linked hyaluronic acid gel augmentation” (IN5) została podjęta próba odpowiedzi na pytanie, czy zaburzony skład mikroflory skóry może się przyczyniać do zwiększonego ryzyka powstania późnych powikłań bakteryjnych w miejscu podania wypełniaczy. Celem prospektywnego badania była ocena jakościowego składu bakteryjnej flory skóry pacjentów z tego typu powikłaniem w porównaniu ze składem flory skóry osób, u których po wykonaniu podobnych zabiegów nie wystąpiło żadne powikłanie z nimi związane.

Do grupy badanej zakwalifikowano 10 uprzednio zdrowych kobiet ze świeżo rozpoznany, nieleczonym wcześniej *infectious nodule*, powstałym w miejscu podania usieciowanego kwasu hialuronowego; do grupy kontrolnej zaś – 17 zdrowych kobiet, w podobnym wieku oraz z porównywalnymi ilościami i miejscem podania usieciowanego kwasu hialuronowego, u których nigdy nie wystąpiły żadne powikłania w miejscu jego podania. Ocenie poddano ilościowy skład flory skóry pacjentek z grupy badanej w trakcie toczącego się zakażenia przed rozpoczęciem leczenia i po wyleczeniu. Uzyskane wyniki porównywano z wynikami oceny ilościowego składu flory skóry osób z grupy kontrolnej.

Stwierdzono istotnie statystycznie częstsze występowanie *Staphylococcus epidermidis* w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą badaną. Grupa badana charakteryzowała się statystycznie istotnie częstszym występowaniem *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus haemolyticus* w porównaniu z grupą kontrolną. We florze bakteryjnej skóry osób, u których nie występowały powikłania infekcyjne w miejscu podania preparatów usieciowanego kwasu hialuronowego, dominują bakterie niepatogenne, symbionty należące do typowych składników flory fizjologicznej, przede

wszystkim *Staphylococcus epidermidis*. Wyniki tej pracy potwierdziły niejednokrotnie udowodnioną we wcześniejszych badaniach ochronną przed zakażeniami drobnoustrojami patogennymi funkcję, jaką pełnią *S. epidermidis*. Ponadto wykazano, że zaburzony, odbiegający od prawidłowego stan flory (mikrobioty) może być czynnikiem zwiększającym ryzyko powstania powikłań infekcyjnych związanych z naruszeniem ciągłości skóry i wprowadzeniem do tkanki podskórnej ciała obcego (IN5).

### **3.2. Badanie związku wystąpienia powikłań bakteryjnych zabiegów z naruszeniem ciągłości skóry z aktywnością życiową pacjentów, wpływającą na skład ich mikrobiomu**

Niejednokrotnie zostało udowodnione, że mikrobiota człowieka kształtuje się pod wpływem czynników środowiskowych. Jej jakościowy i ilościowy skład może być uzależniony od: stosowania antybiotyków, kontaktu z opieką zdrowotną, diety i stylu życia. Wielu badaczy w ostatnich latach wskazuje na związek poszczególnych elementów stylu życia z ryzykiem występowania rozmaitych chorób u ludzi, w tym różnego rodzaju zakażeń.

W badaniu, którego wyniki zostały opublikowane w pracy „The impact of lifestyle upon the probability of occurrence of late bacterial infection resulting from soft-tissue filler augmentation” (IN6), została podjęta próba odpowiedzi na pytanie, czy poszczególne elementy stylu życia mogą stanowić czynniki zwiększające ryzyko występowania zakażeń związanych z naruszeniem ciągłości skóry i wprowadzeniem ciała obcego. Badanie przeprowadzono w jednej z warszawskich klinik medycyny estetycznej w latach 2012 – 2018. Grupę pacjentek, u których wystąpiło zakażenie związane ze stosowaniem usieciowanego kwasu hialuronowego, uznałam za odpowiedni model do przeprowadzenia tego badania. Większość tych osób nie należy do grupy ryzyka powikłań infekcyjnych z powodu obniżonej odporności lub ciężkich chorób towarzyszących. Jedynym czynnikiem ryzyka jest zabieg związany z wprowadzeniem ciała obcego w tkankę podskórną twarzy. Do grupy badanej zakwalifikowano 25 uprzednio zdrowych kobiet, które spełniały kryteria rozpoznania późnego zakażenia w miejscu podania usieciowanego kwasu hialuronowego: obrzęk, stwardnienie, zaczerwienienie, ból, ropna wydzielina i/lub obecność przetoki, z wystąpieniem tych objawów w okresie dłuższym niż miesiąc od wykonania zabiegu. Kryteria czasowe zostały wprowadzone w celu wykluczenia przypadków wczesnych zakażeń, których wystąpienie zazwyczaj jest związane z naruszeniem zasad aseptyki i antyseptyki w trakcie wykonywania zabiegu. Elementy stylu życia, które poddano analizie, to: wiek, wykonywany zawód, stosowanie antybiotykoterapii w okresie 12 miesięcy poprzedzających badanie, przebyte hospitalizacje w ciągu 12 miesięcy przed badaniem, posiadanie zwierzęcia domowego, funkcja rozrodcza

(miesiączkowanie/menopauza), stosowanie hormonalnej terapii zastępczej, korzystanie co najmniej raz w tygodniu z siłowni, podobnie z basenu, co najmniej raz w miesiącu z sauny, podobnie z solarium. Otrzymane wyniki zostały porównane z wynikami osób należących do grupy kontrolnej. Do tej ostatniej zakwalifikowano 92 osoby regularnie korzystające z zabiegów z użyciem preparatów kwasu hialuronowego, u których nie stwierdzono żadnych powikłań z tym związanych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu SAS 9.4. W celu wykazania istotności różnic między grupami wykorzystano testy U Manna-Whitneya, test chi-kwadrat oraz analizę regresji logistycznej. Wykazano statystycznie istotne różnice w porównywanych grupach pod względem: aktywności zawodowej, liczby stosowanych kursów antybiotykoterapii, stosowania hormonalnej terapii zastępczej, posiadania zwierzęcia domowego, korzystania z basenu, sauny, siłowni. Wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej ujawniła, że stosowanie antybiotykoterapii, hormonalnej terapii zastępczej, posiadanie zwierzęcia domowego, korzystanie z sauny wykazują wartość predykcyjną wpływającą na prawdopodobieństwo wystąpienia analizowanego zdarzenia.

Najwyższą wartość predykcyjną w zwiększeniu szansy wystąpienia późnego zakażenia w miejscu podania wypełniacza wykazano dla stosowania antybiotykoterapii. Wynik ten jest w pewnym sensie zgodny z wynikami badania opublikowanego w pracy „Skin bacterial flora as a potential risk factor predisposing to late bacterial infection after cross-linked hyaluronic acid gel augmentation” (IN5). Zmiana składu mikrobiomu następująca pod wpływem antybiotykoterapii prowadzi do zwiększenia podatności na zakażenia oportunistyczne, zakażenia szpitalne oraz zakażenia związane z naruszeniem ciągłości skóry i błon śluzowych. Ciekawa wydaje się stwierdzona w badaniu statystycznie istotna różnica w częstości posiadania zwierzęcia domowego pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. Obecność zwierząt w domu osób, u których nie występowały późne powikłania infekcyjne (grupa kontrolna), była znacznie częstsza niż u osób dotkniętych zakażeniem (grupa badana). Można to w pewnym stopniu tłumaczyć hipotezą „różnorodności”, zgodnie z którą większa ekspozycja na środowisko naturalne i różnorodną florę bakteryjną przyczynia się do stymulacji naturalnych mechanizmów obronnych i zmniejsza podatność na zakażenia.

### **3.3. Aspekty kliniczne przeprowadzonych badań**

Z uwagi na to, że zabiegi związane z wszczepieniem ciała obcego, w tym usieciowanego kwasu hialuronowego, stają się codziennością i ich liczba stale rośnie, wydaje się niezbędne opracowanie standardów postępowania w przeprowadzaniu takich zabiegów oraz leczeniu powikłań. We współpracy z jedną z klinik medycyny estetycznej uczestniczyłam w

opracowaniu empirycznego schematu skutecznego leczenia późnych zakażeń w miejscu wprowadzenia wypełniacza. Wyniki tego badania zostały opublikowane w pracy „Treatment of late bacterial infections resulting from soft-tissue filler injections” (P10).

Bakterie tworzące biofilm wykazują oporność na antybiotyki i inne leki przeciwbakteryjne. Jest to związane z brakiem penetracji, powstaniem opornych fenotypów oraz specyficznym mikrośrodowiskiem wewnątrz biofilmu. Rekomendacje ESCMID z 2014 roku dotyczące leczenia zakażeń związanych z wszczepieniem ciała obcego uwzględniają stosowanie antybiotyków, opracowanie chirurgiczne oraz określają warunki do usunięcia lub pozostawienia implantu. Antybiotykoterapia w tym przypadku powinna być długotrwała, z zastosowaniem co najmniej dwóch antybiotyków działających zarówno na bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne przez co najmniej 3 tygodnie. Zakażony implant w większości przypadków powinien być usunięty. Pozostawić można go jedynie w przypadku zachowania jego stabilności, braku przetoki oraz jeśli został zidentyfikowany czynnik etiologiczny zakażenia i jest on wrażliwy na antybiotyki skuteczne w leczeniu zakażeń związanych z biofilmem.

Na tych rekomendacjach zostało oparte wielokierunkowe podejście do proponowanego schematu leczenia wzorowanego na standardach obowiązujących w innych dziedzinach medycyny: kardiochirurgii, ortopedii. Obejmuje ono: usunięcie martwiczych tkanek i drenaż; usunięcie ciała obcego, na którym został utworzony biofilm, w tym przypadku degradację usieciowanego kwasu hialuronowego przy użyciu hialuronidazy; długotrwałą skojarzoną antybiotykoterapię empiryczną. Antybiotykoterapia powinna objąć swoim spektrum działania wszystkie bakterie, które mogą stanowić czynnik etiologiczny zakażenia. Przy niepełnej eradykacji infekcji drobnoustroje występujące w biofilmie mogą przetrwać i spowodować nawrót po zakończonym leczeniu. W danym kontekście poszukiwania dotyczyły skutecznych empirycznych opcji terapeutycznych o jak najszerszym spektrum działania z uwagi na brak możliwości identyfikacji czynnika etiologicznego zakażenia. Leki przeciwdrobnoustrojowe powinny być skuteczne wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i bakterii beztlenowych oraz posiadać zdolność penetracji do środowiska biofilmu. Według informacji zawartych w kartach charakterystyki produktów leczniczych oraz danych piśmiennictwa wszystkie powyższe kryteria spełniają moksyflokscyna i klarytromycyna, które zaproponowano do stosowania. Skuteczność tego schematu terapeutycznego została wykazana w pracy „Treatment of late bacterial infections resulting from soft-tissue filler injections” (P10).

#### **4. Praktyczne zastosowanie otrzymanych wyników: czynniki ryzyka zależne od makroorganizmu – nowe ujęcie problemu**

W celu opracowania standardów postępowania minimalizujących ryzyko powstania powikłań po zabiegach z naruszeniem ciągłości skóry i wprowadzeniem ciała obcego przede wszystkim należy określić czynniki ryzyka zależne od makroorganizmu. Pierwszym elementem w takim postępowaniu jest wnikliwa kwalifikacja pacjenta do zabiegu. Polega ona na ocenie stanu ogólnego pacjenta i stanu jego skóry w celu dostosowania zakresu i rodzaju planowanego zabiegu oraz postępowania przygotowawczego. Do bezwzględnych przeciwwskazań do przeprowadzania zabiegów z użyciem wypełniaczy należą: stany zapalne i infekcje skóry, objawy zakażenia w obrębie zatok przynosowych, uszu, zmiany przywierzchołkowe zębów, aktywne zakażenia w obrębie innych narządów i układów (przewodu pokarmowego, układu moczowego), choroby autoimmunologiczne, immunosupresja, obecność innych zakażeń drobnoustrojami o potencjalnym działaniu immunosupresyjnym (wirusami z rodziny *Herpesviridae* i innymi wirusami immunomodulującymi), bakteriami atypowymi, prątkami gruźlicy. Względny przeciwwskazaniem, które mogą mieć wpływ na kwalifikację do zabiegu, są: nieinfekcyjne stany zapalne skóry, źle kontrolowana cukrzyca, dysfunkcja tarczycy.

W przypadku wykrycia bezwzględnych przeciwwskazań, w celu ograniczenia ryzyka poważnych powikłań, należy zmniejszyć zakres zabiegu bądź zrezygnować z jego wykonania. Przy obecności względnych przeciwwskazań należy wdrożyć działania przygotowawcze minimalizujące ryzyko.

Kolejnym niezbędnym elementem postępowania przy wykonywaniu procedur z naruszeniem ciągłości skóry i wprowadzeniem ciała obcego jest bezwzględne stosowanie zasad aseptyki i antyseptyki. Kluczowe w tym kontekście są: właściwa dezynfekcja miejsca operowanego, stosowanie jałowych materiałów i narzędzi, przeprowadzenie całego zabiegu w taki sposób, aby uniknąć kontaminacji i zapobiec zakażeniu, oraz stosowanie antybiotykowej profilaktyki okołoperacyjnej. Wczesne zakażenia, które występują w ciągu tygodnia po wykonanym zabiegu zazwyczaj są w bezpośredni sposób związane z naruszeniem tych zasad. Późne zakażenia występujące od kilku tygodni do kilku miesięcy po wykonanym zabiegu są zazwyczaj związane z naruszeniem zasad dotyczących innych elementów postępowania i często uwarunkowane wzrostem drobnoustrojów w postaci biofilmu. Takim zakażeniom nie można całkowicie zapobiec: ani stosując zasady aseptyki i antyseptyki, ani w bardzo skrupulatny sposób kwalifikując pacjenta do zabiegu. Nie zostało również do tej pory

jednoznacznie określone, jakie dodatkowe czynniki zależne od makroorganizmu mogą wpływać na zwiększenie ryzyka wystąpienia późnych zakażeń związanych z zabiegami z użyciem ciała obcego.

Jako wniosek z przeprowadzonych badań uważam za zasadne wprowadzenie do postępowania przygotowującego pacjenta do zabiegu z wszczepieniem ciała obcego działań minimalizujących zaburzenie oraz ukierunkowanych na zbalansowanie składu jego flory fizjologicznej (mikrobiomu).

**V. Publikacje o tematyce innej niż osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

Moja praktyczna działalność wynikająca z uprawnień związanych z posiadaną specjalizacją lekarską koncentruje się na epidemiologii szpitalnej i stosowaniu antybiotykoterapii. Problemom związanym z kontrolą zakażeń szpitalnych są poświęcone publikacje: „Świadomość personelu a prewencja zakażeń krwi związanych ze stosowaniem cewników” (P15) oraz „Mikrobiologiczna kontrola higieny rąk jako ważny element multimodalnej strategii prewencji zakażeń związanych z opieką zdrowotną” (P18). Szkolenia personelu z zakresu profilaktyki zakażeń stanowią jeden z podstawowych elementów działania Zespołów Kontroli Zakażeń Szpitalnych, których przewodniczącą jestem w kilku warszawskich szpitalach. Uważam za zasadne prowadzić szkolenia personelu w taki sposób, aby zwiększać świadomość ryzyka związanego z szerzeniem się drobnoustrojów w placówkach ochrony zdrowia oraz dążyć do przestrzegania standardów i procedur kontroli zakażeń przez każdą grupę zawodową.

**VI. Wykaz innych (niewchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w punkcie VI) opublikowanych prac naukowych**

**P1.** Swoboda-Kopec E, Netsvyetayeva I, Paczek L, Dabkowska M, Kwiatkowski A, Jaworska-Zaremba M, Mierzwinska-Nastalska E, Sikora M, Blachnio S, Mlynarczyk G, Fiedor P. Algorithm of Clinical Protocol Lowering the Risk of Systemic Mycosis Infections in Allografts Recipients. Transplantation Proceedings. 2009;41(8):3264–3266.



- P2.** Netsvyyetayeva I, Swoboda-Kopec E, Paczek L, Fiedor P, Sikora M, Jaworska-Zaremba M, Blachnio S, Luczak M. *Trichosporon asahii* as a prospective pathogen in solid organ transplant recipients. *Mycoses*. 2009;52(3):263–265.
- P3.** Sikora M, Dabkowska M, Swoboda-Kopec E, Jarzynka S, Netsvyyetayeva I, Jaworska-Zaremba M, Pertkiewicz M, Mlynarczyk G. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. *Folia Microbiologica*. 2011;56:143–148.
- P4.** Sikora M, Netsvyyetayeva I, Golas M, Swoboda-Kopec E, Walter de Walthoffen S, Sawicka-Grzelak A, Pacholczyk M, Chmura A, Mlynarczyk G. The Probability of the *Acinetobacter baumannii* Strain Clonal Spreading in Donor-recipient Systems, as Confirmed by the Molecular Analysis of Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Transplantation Proceedings*. 2011;43:3121–3124.
- P5.** Marusza W, Mlynarczyk G, Olszanski R, Netsvyyetayeva I, Obrowski M, Iannitti T, Palmieri B. Probable biofilm formation in the cheek as a complication of soft tissue filler resulting from improper endodontic treatment of tooth 16. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1441–7.
- P6.** Golas M, Netsvyyetayeva I, Piskorska K, Sikora M, Jaworska-Zaremba M, Mierzwinska-Nastalska E, Paczek L, Swoboda-Kopec E. PCR melting profiles of *Candida glabrata* clinical isolates in solid-organ transplant recipients in comparison to the other group of surgical patients. *Transplantation Proceedings*. 2014;46(5):1366–70.
- P7.** Gołaś M, Sikora M, Piskorska K, Sulik-Tyszka B, Netsvyyetayeva I, Swoboda-Kopec E. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* species – one year observation. *Polish Journal of Microbiology*. 2014;63(2):217–222.
- P8.** Swoboda-Kopec E, Gołaś M, Piskorska K, Dabkowska M, Nicwietajewa I, Paczek L, Sikora M. *Aspergillus* galactomannan detection in comparison to a real-time PCR assay in serum samples from a high-risk group of patients. *Cent Eur J Immuno*. 2015;40(4):454–460.
- P9.** Swoboda-Kopec E, Sikora M, Piskorska K, Gołaś M, Netsvyyetayeva I, Przybyłowska D, Mierzwińska-Nastalska E. Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Adv Exp Med Biol*. 2017;944:27–33.

- P10.** Marusza W, Olszanski R, Sierdzinski J, Ostrowski T, Szyller K, Młynarczyk G, **Netsvjetayeva I.** Treatment of late bacterial infections resulting from soft-tissue filler injections. *Infection and Drug Resistance.* 2019;12:469–480.
- P11.** **Netsvjetayeva, I,** Swoboda-Kopeć E, Dąbkowska M, Kawecki D, Kądzielska J, Łuczak. Porównanie gatunków grzybów drożdżopodobnych wyhodowanych z moczu pacjentów po zabiegach przeszczepienia narządów mięsnych z gatunkami wyhodowanymi z moczu pacjentów internistycznych. *Family Medicine & Primary Care Review.* 2006;8(3):715–717.
- P12.** **Netsvjetayeva, I,** Swoboda-Kopeć E, Dąbkowska M, Kądzielska J, Łuczak M. Różnorodność fenotypowa klinicznych szczepów *Candida parapsilosis*. *Mikologia Lekarska.* 2008;15(3):131–134.
- P13.** Dąbkowska M, Sikora M, Swoboda-Kopeć E, **Netsvjetayeva I,** Jarzynka S, Pertkiewicz M, Młynarczyk G. Mikologiczna analiza próbek materiału klinicznego uzyskanego od chorych żywionych pozajelitowo. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia.* 2010;62(2):163–170.
- P14.** **Netsvjetayeva I,** Swoboda-Kopeć E. *Candida parapsilosis* – zmienne oblicze. *Postępy Nauk Medycznych.* 2011;10(t. XXIV):876–886.
- P15.** **Netsvjetayeva I.,** Dembicka O, Gołaś M, Dąbkowska M, Swoboda-Kopeć E, Sikora M, Frączek M. Świadomość personelu a prewencja zakażeń krwi związanych ze stosowaniem cewników. *Zakażenia.* 2011;6:111–118.
- P16.** Piskorska K, Sikora M, Gołaś M, **Netsvjetayeva I,** Swoboda-Kopeć E, Różnicowanie gatunków w kompleksie *Candida glabrata*. *Candida nivariensis* – nowy potencjalny patogen? *Zakażenia.* 2013;3:51–55.
- P17.** Jarzynka S, Dąbkowska M, **Netsvjetayeva I,** Sikora M, Młynarczyk G, Swoboda-Kopeć E. Biofilm szczepów *Candida* spp. izolowanych od pacjentów z podejrzeniem fungemii odcewnikowych. *Zakażenia.* 2015;1:51–55.
- P18.** **Niecwietajewa I,** Pracz W, Gienza M, Jakubiak J, Szymańczak M, Marusza W. Mikrobiologiczna kontrola higieny rąk jako ważny element multimodalnej strategii prewencji zakażeń związanych z opieką zdrowotną. *Zakażenia XXI wieku.* 2018;1(5):209–215.

**P19.** Olszanski R, Dabrowiecki Z, Marusza W, **Netsvyetayeva I**, Niewiedzia D, Siermontowski P, Zielinski E. Vascular Complication in Aesthetic Medicine Treated With Hyperbaric Oxygenation. Polish Hyperbaric Research. 2018;63(2):33–38.

**P20.** Jarzynka S, Dąbkowska M, **Netsvyetayeva I**, Swoboda-Kopeć E. Mikotoksyny – niebezpieczne metabolity grzybów pleśniowych. Medycyna Rodzinna. 2010;4: 113–119.

**P21.** **Netsvyetayeva I**, Sikora M, Gołaś M, Piskorska K, Swoboda-Kopeć E. Diagnostyczne aspekty zakażeń grzybiczych u chorych po przeszczepieniu narządów unaczynionych (ze szczególnym uwzględnieniem przeszczepienia nerki). Nowa Klinika. Medycyna Zakażeń. 2011;18(4):4079–4088.

**P22.** Dembicka O, Swoboda-Kopeć E, **Niecwietajewa I**. Standardy i procedury jako elementy prewencji zakażeń w praktyce pielęgniarskiej. Zakażenia. 2014;2:60–65.

**P23.** **Niecwietajewa I**, Piskorska K. Lekooporność bakterii – poważne zagrożenie epidemiczne. Chirurgia po Dyplomie. 2016;11(3):29–36.

**P24.** Olszański R, Marusza W, **Netsvyetayeva I**. Powikłania po zabiegach z użyciem nici liftingujących – przypadki własne. Dermatologia Estetyczna. 2017;19(2):121–127.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Irena Necwietajewa'. The signature is written in a cursive, flowing style with some loops and flourishes.

