

Akceptuję  
*[Signature]*

Prof. dr hab. med. Małgorzata Bulanda

Katedra Mikrobiologii

Collegium Medicum UJ

Kraków, dnia 31 lipca 2023

### Recenzja

Pracy doktorskiej Pani mgr. Danuty Bieńko o tytule:

„Ocena typowania wielolekoopornych klinicznych szczepów pałeczek Gram- ujemnych przy użyciu metody MALDI-TOF-MS”.

Pracę wykonano w Zakładzie Mikrobiologii CSK UCK WUM  
(obecnie: Laboratorium Mikrobiologii CSK UCML UCK WUM)

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska  
Promotor pomocniczy: dr n. med. Dorota Żabicka

Nierozważne, w tym nadmierne stosowanie od przeszło 80 lat antybiotyków w różnych środowiskach, w tym w medycynie do leczenia zakażeń, często nie racjonalne, doprowadziły do ujawnienia się możliwości przystosowawczych drobnoustrojów do nowej niesprzyjającej im sytuacji, mianowicie wytworzenie różnych, wielorakich mechanizmów oporności u bakterii i grzybów na antybiotyki. Zgodnie z definicjami stopnia oporności tzw. szczepów alarmowych, ustalonymi przez CDC w 2010 roku, szczepy odporne mogą mieć charakter szczepów: MDR, XDR, a nawet całkowicie opornych PDR na leki przeciwdrobnoustrojowe.

W ostatnich latach największy problem zarówno terapeutyczny jak i epidemiologiczny na całym świecie, ale coraz poważniejszy także w polskich szpitalach, stanowią wielooporne szczepy pałeczek Gram –ujemnych, w tym odporne na karbapenemy, leki „ostatniej szansy” z grupy leków B- laktamowych.

Ze względu na najczęstsze występowanie jako czynniki etiologiczne zakażeń oraz nosicielstwo przewodu pokarmowego, wysoką oporność izolatów, szczepy z gatunku *Klebsiella pneumoniae* o mechanizmie z klasy B (MBL) w grupie NDM mają największe znaczenie terapeutyczne, ale przede wszystkim epidemiologiczne ze względu na dużą łatwość rozprzestrzeniania się w środowisku szpitalnym, przez co zagrażającym bezpieczeństwu hospitalizowanych pacjentów. Podstawową metodą zapobiegawczą jest przecinanie dróg przenoszenia drobnoustrojów, między innymi poprzez izolację chorych lub nosicieli. Aby wprowadzić tę procedurę należy jak najszybciej zidentyfikować izolowany szczep wiarygodną metodą mikrobiologiczną.

Przedstawiona do recenzji praca poświęcona jest właśnie przyśpieszeniu, poszerzeniu i unowocześnieniu typowania wielolekoopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych poprzez zastosowanie nowoczesnej metody MALDI-TOF-MS oraz porównaniu wyników tej metody z jedną z najnowocześniejszych metod genetycznych- sekwencjonowaniu nanoporowym.

Zatem sam wybór tematu jest bardzo aktualny ze względu na obecną sytuację epidemiologiczną i mający duże wartości praktyczne dla Zespołów Kontroli Zakażeń dążących do zapewnienia bezpieczeństwa epidemiologicznego hospitalizowanych.

Autorka podjęła się ambitnego zadania, charakterystyki klinicznych szczepów wielolekoopornych pałeczek Gram-ujemnych, próbie określenia czynników ryzyka nabywania zakażenia o etiologii wielolekoopornymi szczepami pałeczek Gram-ujemnymi oraz przeprowadzenia oceny przydatności szybkiego testu MALDI-TOF-MS w ich typowaniu.

Przedstawiona praca ma układ typowy dla monografii rozpraw doktorskich (wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i piśmiennictwo), ale należy zaznaczyć, że praca jest zredagowana z wyjątkową starannością. Zawiera słowa kluczowe, a wstęp jest poprzedzony spisem rycin i tabel, bardzo obszernym wykazem stosowanych w tekście skrótów oraz bardzo dobrym streszczeniem w języku polskim i angielskim wprowadzającym czytającego w temat (treść) ocenianej pracy.

W spisie literatury widnieje imponująca liczba 215 pozycji piśmiennictwa z zakresu przedmiotu badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt zamieszczenia w spisie i cytowanie w tekście wielu znaczących pozycji prac pochodzących z ostatnich pięciu lat, zarówno zagranicznych jak i polskich.

W Aneksie zamieszczonym na końcu rozprawy jest zamieszczony skan dokumentu Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym stwierdzający, że przeprowadzenie opisanych badań, a ocenianych obecnie, nie stanowi eksperymentu medycznego i nie wymaga uzyskania opinii Komisji.

We wstępie (dane z piśmiennictwa) zawartym na 27 stronach, Doktorantka zapoznaje czytającego z zagadnieniami: lekoopornością bakterii, patogenami alarmowymi, mechanizmami oporności bakterii na leki przeciwdrobnoustrojowe. Poświęca jeden z podrozdziałów wstępu omówieniu charakterystyki gatunku *Klebsiella pneumoniae*, wybranego modelu badawczego. Dwa kolejne podrozdziały wstępu poświęcone są omówieniu znaczenia występowania bakterii wielolekoopornych w epidemiologii zakażeń związanych z opieką zdrowotną oraz ograniczoną możliwością terapeutyczną leczenia zakażeń wywołanych przez wielolekooporne pałeczki Gram-ujemne. Ze zrozumiałych przyczyn Autorka pracy poświęciła dużo uwagi na omówienie metod typowania drobnoustrojów, w tym metodom fenotypowym (między innymi metodzie analizy białek) i genotypowym, ze szczególnym uwzględnieniem technik sekwencjonowania, w tym najnowszym typem sekwencjonowania 3. generacji jakim jest sekwencjonowanie nanoporowe. Podrozdział 1.8 wstępu to szczegółowe omówienie metody MALDI-TOF-MS, poprzez opisanie zasad działania spektrometru mas oraz wielorakich (między innymi identyfikacji bakterii i grzybów, wykrywaniu drobnoustrojów bezpośrednio w dodatniej próbce krwi lub moczu czy wykrywanie szczepów antybiotykoopornych np. KPC) zastosowań tej techniki, także w typowaniu bakterii, czyli analizie pokrewieństwa w obrębie tego samego gatunku.

Rozdział napisany jest bardzo dokładnie, przyjaźnie, zrozumiale dla czytelnika, zawiera wiele cennych informacji, między innymi dotyczących nowoczesnych metod fenotypowych, coraz częściej mających zastosowanie w ogólnie pojętej diagnostyce mikrobiologicznej.

Z obowiązku recenzenta stwierdzam nieliczne literówki i niezręczności stylistyczne w tekście wstępu oraz pomyłkę w taksonomii *Haemophilus influenzae*, należącego do rzędu *Pasteurellaceae*, a nie *Enterobacterales*. Dodatkowo, moim zdaniem tak szczegółowe omówienie zastosowania MALDI-TOF-MS w typowaniu bakterii mogłoby być częścią dyskusji.

**Założenia i cele** pracy są jasno sformułowane.

**Celem głównym** pracy jest ocena przydatności i korzyści w zastosowaniu spektrometrii mas w typowaniu ( określenie profili białkowych) wielolekoopornych klinicznych szczepów pałeczek Gram- ujemnych, jako nowej metody w nadzorze mikrobiologicznym stosowanym w zakresie kontroli zakażeń związanych z opieką zdrowotną.

W **6 celach szczegółowych** zawarta jest szczegółowa analiza występowania wielolekoopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych wyizolowanych z materiałów klinicznych w trakcie rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej w szpitalu klinicznym, wykazanie czynników zwiększających ryzyko wystąpienia zakażenia o tej etiologii, określenie przydatności określania profili białkowych w typowaniu szczepów bakteryjnych oraz ocena zmienności profili białkowych szczepów bakteryjnych w trakcie hospitalizacji pacjentów oraz porównanie wyników typowania najczęściej występującego gatunku *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 metodami fenotypowymi i genotypowymi, w tym porównanie par szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 wyizolowanych od danego pacjenta w przebiegu hospitalizacji z materiału klinicznego oraz z badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa jelitowego patogenów alarmowych.

W rozdziale **Material i metody** Doktorantka przedstawiła charakterystykę, w tym strukturę Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie, oraz opisuje pozyskane 37 388 wyniki badań mikrobiologicznych o statucie dodatnim, w tym materiałów klinicznych i badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa jelitowego pacjentów hospitalizowanych w latach 2014-2016 w SP CSK.

Z materiałów klinicznych wyhodowano 35 026 szczepów bakterii oraz grzybów, zidentyfikowane metodą spektrometrii mas jako 534 różne gatunki, a odsetek poszczególnych grup drobnoustrojów pochodzących w 3 lat przedstawia rycina 10.

Tlenowe pałeczki G-ujemne rzędu *Enterobacterales* stanowiły 36% (na rycinie) 35% (tekście), a pałeczki niefermentujące 8% z wszystkich izolowanych szczepów, a szczegółowe zestawienie gatunków i rodzajów zostało przedstawione w tabeli 6. Moim zdaniem wymienienie poszczególnych gatunków lepiej byłoby przedstawić w kolejności najczęściej izolowanych, a nie alfabetycznie.

Szczegółowej analizie typowania fenotypowego przy użyciu metody MALDI-TOF MS poddano 70 szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1. Łącznie było to 35 par szczepów wyizolowanych z miejsca zakażenia oraz z materiału badanego w kierunku nosicielstwa patogenów alarmowych (wymaz z odbytu).

Udział procentowy wybranych do analizy szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 w zależności od miejsca hospitalizacji pacjentów zawarty jest w kolejnej tabeli 11, a udział procentowy materiałów klinicznych, z których wyizolowano *Klebsiella pneumoniae* NDM-1, opisuje tabela 12.

Autorka z niezwykłą starannością w podrozdziale 3.3 opisała szczegółowe postępowanie, w tym interpretację wyników, w pracy laboratoryjnej zastosowanej w całej pracy. Podrozdział 3.4.3 poświęcony jest omówieniu metod wykrywania karbapenemaz: fenotypowych z zakresie typu KPC, MBL i OXA-48, biochemicznych oraz genetycznych. Zamieszczona rycina 13 doskonale ilustruje tok postępowania w wykonywaniu fenotypowych testów przesiewowych do wykrywania wytwarzania karbapenemaz różnych typów przez pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Ostatni podrozdział rozdziału Metod to omówienie zastosowanych technik w typowaniu szczepów zarówno feno – jak i genotypowym.

Cały omawiany rozdział nie budzi zastrzeżeń, zilustrowany jest pięcioma rycinami, a omówienia w tekście zebrane są dobrze w opracowanych czterech tabelach. Ten rozdział wykazuje wyjątkową staranność Autorki w redakcji swej pracy.

**Wyniki** opracowano starannie, są zawarte na 24 stronach maszynopisu, w 11 tabelach i zilustrowane w 13 rycinach, co szczególnie ułatwia zapoznanie się z ich treścią. Całość wyników Autorka podzieliła na cztery części. **W pierwszej** analizuje 15 303 szczepy pałeczek Gram- ujemnych z czego 10,9% stanowiły szczepy MDR, a wśród nich 3,7% odporne na karbapenemy. Wśród 12 446 szczepów należących do rzędu *Enterobacterales* 6,1% stanowiły MDR, aż w 69,4% opornych na karbapenemy, natomiast wśród pałeczek Gram- ujemnych niefermentujących na 2857 szczepów, 32% to MDR, a 7,3 % opornych na karbapenemy.

Wśród pałeczek rzędu *Enterobacterales* MDR dominował gatunek *Klebsiella pneumoniae* produkująca karbapenemy klasy B, izolowany zarówno z materiałów przesiewowych jak i klinicznych, szczególnie wśród pacjentów oddziałów zachowawczych z zakażeniem dróg moczowych. Natomiast wśród pałeczek niefermentujących opornych na karbapenemy dominował gatunek *Acinetobacter baumannii* wśród pacjentów oddziałów zabiegowych z zakażeniem rany.

**Druga** część to charakterystyka wybranych 70 szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1, w tym 35 izolowanych z odbytu i 35 z materiałów klinicznych, w których dominowały mocze (pary badań).

**Trzecia** część to analiza typowania 70 szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 metodą MALDI-TOF-MS, a **czwarta** to typowanie 6 wybranych z tej grupy szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 metodą sekwencjonowania nanoporowego. Szkoda, że nie udało się przetytować więcej niż tylko 6 szczepów tą najnowszą metodą genetyczną.

W efekcie tych analiz wykazano 100% zgodność obu metod w wykazania pokrewieństwa oraz nie zaobserwowano zmian w profilu białkowym badanych par w czasie.

W tej części wyników wystąpił prawdopodobnie błąd polegający na złej numeracji szczepów w badanych parach. W Tabeli 14, 15, 18, 19 oraz w tekście na str.92 występuje szczep N 11119, a na rycinach 26, 29 oraz w tekście na stronie 83 i 89 występuje szczep N 11149, a powinien to być chyba ten sam szczep.

Zdaniem oceniającej szkoda, że w doborze par nosicielstwo- miejsce zakażenia, zabrakło szczepu klinicznego pochodzącego z rany.

Kolejny rozdział pracy „**Dyskusja**” zawarty na 17 stronach maszynopisu napisany jest bardzo dobrze. Ten rozdział uważam za bardzo wartościowy. Autorka pracy jeszcze raz uzasadnia celowość swojej pracy i zasadność stosowanych metod badawczych powołując się na wiele badań innych autorów.

Pani mgr Danuta Bieńko po kolei omawia swoje wyniki badań dotyczące poszczególnych etapów swojej pracy, wnikliwie i krytycznie je analizując, porównując je z wynikami innych autorów zajmujących się tym problemem, przywołuje dobrze wyselekcjonowane piśmiennictwo.

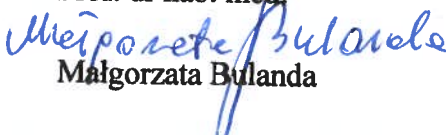
**Wnioski** ( w liczbie 8) wyciągnięte przez Panią mgr Danutę Bieńko są jasno sformułowane, prawdziwe i bezpośrednio wynikające z uzyskanych wyników, w pełni realizujące podstawowe założenie i cele pracy.

Pracę oceniam, jako bardzo dobrą, posiadającą wiele aspektów praktycznych i zaznaczam, że nieliczne niedociągnięcia wymienione powyżej, nie zmniejszają wartości pracy i przedstawiona mi do oceny praca stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego, a jej zawartość wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w danej dziedzinie naukowej i

potwierdzam przydatność wyników przeprowadzonych badań, zwłaszcza dla Zespołów ds. Zakażeń w polskich szpitalach w trakcie dochodzeń epidemiologicznych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Danuty Bieńko spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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, z późn. Zm.) .

W tym stanie rzeczy pozwalam sobie przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczeniu Pani mgr Danuty Bieńko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. med.  
  
Małgorzata Bulanda