

Akceptacja
A J

Prof. dr hab. n. med. Stefania Giedrys-Kalemba
em. kierownik Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Immunologii
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Danuty Bieńko pt.

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

Zakażenia wielolekoopornymi szczepami drobnoustrojów stanowią obecnie jeden z ważniejszych problemów medycznych, na równi z chorobami serca i nowotworami. Prognozuje się nawet, że w 2050 roku zgony z powodu takich zakażeń znajdą się na pierwszym miejscu. W zakażeniach szpitalnych wśród lekoopornych drobnoustrojów niewątpliwie dominują pałeczki Gram-ujemne należące do rzędu *Enterobacterales*. Najwięcej problemów terapeutycznych stwarzają szczepy odporne na powszechnie stosowane antybiotyki β -laktamowe, szczególnie odporne na karbapenemy, które należą do leków tzw. „ostatniej szansy”. Ze względu na wysoką śmiertelność tych zakażeń, łatwość rozprzestrzeniania się szczepów opornych w środowisku i kolonizacji pacjentów, szybka diagnostyka mikrobiologiczna z określeniem mechanizmu oporności oraz pokrewieństwa szczepów w aspekcie ustalenie dróg transmisji i ewentualnie źródła zakażenia, ma istotne znaczenie. W ostatnich latach do identyfikacji i typowania drobnoustrojów, oprócz sprawdzonych już metod genetycznych, próbuje się wykorzystywać metodę spektrometrii mas określającą unikatowe profile białkowe szczepów, nie mniej prac z tego tematu nie jest jeszcze zbyt dużo.

Z przedstawionych wyżej powodów, wybór tematu pracy dotyczący typowania wielolekoopornych klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych przy użyciu metody MALDI-TOF MS i porównania z wynikami badań genetycznych jest ważny i aktualny, zarówno w aspekcie poznawczym jak i aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska liczy łącznie 135 stron maszynopisu, w tym 8 rozdziałów, 31 rycin i 19 tabel. Została przygotowana z zachowaniem typowego dla takich opracowań układu. Kolejne rozdziały to: *Wstęp*, *Założenia i cele pracy*, *Material i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski*, *Piśmiennictwo* oraz *Aneks*, a także Spis rycin i tabel, Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w jęz. polskim i angielskim. *Aneks* zawiera: *Oświadczenie Komisji Bioetycznej*, że przedmiotowe badanie nie stanowi eksperymentu medycznego i nie wymaga opinii Komisji Etycznej. Całość uzupełnia 19 tabel oraz 31 czytelnych rycin, w większości kolorowych, pochodzących z własnych zbiorów.

We *Wstępie* Autorka najpierw przedstawia m.in. klasyfikację szczepów opornych, mechanizmy oporności, także problemy epidemiologiczne i terapeutyczne zakażeń wywołanych lekoopornymi pałeczkami Gram-ujemnymi. Następnie opisuje metody fenotypowe i genotypowe stosowane w typowaniu epidemiologicznym szczepów, szerzej zaś

omawia zasady działania, wady i zalety metody oraz możliwości stosowania metody MALDI-TOF MS w typowaniu drobnoustrojów.

Rozdział ten niewątpliwie świadczy o dużej wiedzy Doktorantki w zakresie poruszanych zagadnień i uzasadnia postawienie celu badań własnych.

Celem głównym badań było określenie potencjalnych korzyści w zakresie kontroli zakażeń wynikających z zastosowania spektrometrii mas w typowaniu wieloopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych. Cele szczegółowe stanowiły: analiza występowania takich szczepów w materiałach klinicznych, porównanie par szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 pochodzących od pacjentów z zakażeniem i z badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa patogenów alarmowych, porównanie wyników typowania metodami fenotypowymi i genotypowymi, określenie przydatności badania profili białkowych, a także określenie czynników zwiększających ryzyko wystąpienia zakażenia wielolekoopornym szczepem pałeczek Gram-ujemnych.

Materiał i metody. Wstępny materiał kliniczny stanowiło 12446 (35% wszystkich) niepowtarzalnych izolatów pałeczek Gram-ujemnych rzędu *Enterobacterales* izolowanych z różnych materiałów od pacjentów hospitalizowanych w różnych oddziałach Centralnego Szpitala Klinicznego (CSK) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2014-2016. Do badań szczegółowych Doktorantka wybrała 70 opornych szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających karbapenemazę NDM-1, istotnych obecnie epidemiologicznie. Były to pary szczepów izolowane po raz pierwszy od 35 pacjentów z nosicielstwa takiego szczepu w przewodzie pokarmowym (przy przyjęciu lub w okresie późniejszym) i z miejsca zakażenia. Identyfikację szczepów przeprowadzono z użyciem systemu MALDI-TOF MS. Do wykrycia oporności na karbapenemy stosowano przesiewowe testy fenotypowe, wykrywające KPC, MBL, OXA-48, test biochemiczny Carba NP oraz test genetyczny Xpert Carba-R w systemie GeneXpert. Typowanie szczepów metodą fenotypową z wykorzystaniem spektrometrii mas przeprowadzono za pomocą analizatora MALDI Biotyper. Porównawcze badania genetyczne metodą sekwencjonowania nanoporowego (technika trzeciej generacji) wykonano dla 6 wytypowanych szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 we współpracy z Laboratorium Genetyki Molekularnej genXone S.A. w Poznaniu.

Rozdział jest napisany konsekwentnie, zwięźle i treściwie. Opis kolejnych badań i analiz oraz stosowane metody, w tym statystyczne, nie budzą zastrzeżeń.

Wyniki badań. Autorka, zgodnie z postawionymi celami badań najpierw przedstawia wyniki analiz wieloopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych izolowanych w latach 2014-2016 w CSK WUM, ich mechanizmy oporności, materiały i oddziały, w których były izolowane. Następnie opisuje wyniki badanych 35 par izolatów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 z wymazów z odbytu i z miejsca zakażenia (najczęściej drogi moczowe – 40%). Typowanie metodą MALDI-TOF MS pozwoliło wyodrębnić 4 rodzaje profili białkowych, ale wykazało 100% zgodność w profilu białkowym każdej pary szczepów. Podobnie wyniki typowania 3 par szczepów metodą sekwencjonowania nanoporowego, mimo stwierdzenia nielicznych wariantów różniących pary, wskazują z wysokim prawdopodobieństwem, że są to te same szczepy ($p=0,239$). Opisane wyniki dobrze ilustrują i uwiarygadniają zarówno tabele jak i wyraźne, kolorowe ryciny, szczególnie dotyczące analizy widm.

W rozdziale *Dyskusja* (17 stron) Autorka, przedstawiając krótko historię ery antybiotykowej, kolejno omawia pojawienie się i narastanie oporności bakterii, szerzenie się szczepów wielolekoopornych, stanowiących coraz większe zagrożenie zdrowotne i wyzwanie, a także powstawanie programów i działań zmierzających do racjonalnego stosowania

antybiotyków oraz właściwej kontroli i ograniczania zakażeń. Wprowadzenie techniki spektrometrii mas dało możliwość bardzo szybkiej identyfikacji drobnoustrojów i stało się jedną z ważniejszych opcji diagnostycznych w ostatnich latach, a być może, przy lepszej standaryzacji i automatyzacji odczytu, będzie mogło konkurować z metodami genetycznymi w typowaniu szczepów szpitalnych. Doktorantka przedstawia szereg prac wykorzystujących do typowania izolatów metody MALDI-TOF dyskutując równocześnie wyniki własne.

Pracę podsumowuje 8 wniosków. Istotne dla tematu pracy i podjętego tematu badań są cztery ostatnie (5-8). Potwierdzają one możliwość stosowania techniki MALDI-TOF MS z wykorzystaniem systemu MALDI Biotyper jako przydatną w typowaniu szczepów wielolekoopornych, która może być stosowana jako metoda przesiewowa w dochodzeniu epidemiologicznym w ognisku zakażenia. Pozostałe wnioski 1-4 są właściwie podaniem wyników szczegółowych analiz wieloopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych izolowanych w danym szpitalu, w badanym okresie (do wykorzystania w zespole kontroli zakażeń szpitalnych), z której to puli szczepów wybrano do badań od 35 pacjentów 70 szczepów.

Piśmiennictwo jest imponujące, liczy 215 pozycji. Jest starannie dobrane i nienagannie przedstawione w kolejności cytowania. Autorka wykorzystuje głównie artykuły oryginalne z ostatnich lat, obcojęzyczne i polskie, także strony internetowe.

Streszczenia, w języku polskim i angielskim są zwięzłe, zawierają najważniejsze wyniki i wnioski dotyczące przedmiotu przeprowadzonych badań.

Uwagi Recenzenta:

1. Doktorantka dokonała bardzo szczegółowej analizy 3-letnich wyników izolacji opornych na karbapenemy szczepów pałeczek Gram-ujemnych (592), w tym najwięcej było szczepów *Klebsiella pneumoniae* (490), które najczęściej wytwarzały enzym NDM-1. Jakie były kryteria wybrania z tej puli tylko 70 szczepów (od 35 osób) do badań profilu białek, a także 3 par (?) szczepów do typowania genetycznego?
2. O ile można przyjąć, że wystarczająca jest liczba szczepów użytych do badań porównawczych techniką MALDI-TOF MS, dyskusyjne są wyniki analizy czynników ryzyka zwiększających zakażenie szczepem wieloopornym na podstawie badania 35 osób. Można było to przeanalizować dla całej puli szczepów lub z tego zrezygnować, bez szkody dla całości pracy.
3. „Niepowtarzalne izolaty” – określenie nie jest precyzyjne. Są to szczepy izolowane z różnych oddziałów i od różnych pacjentów, ale mogą być spokrewnione i należeć do tych samych klonów, krążących w szpitalu.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Danuty Bieńko stanowi oryginalne rozwiązanie wybranego problemu naukowego i jest dodatkową cenną informacją o możliwościach zastosowania systemu MALDI-TOF MS we wstępnym typowaniu bakterii wielolekoopornych, jakimi są szczepy *Klebsiella pneumoniae* NDM-1, stanowiące obecnie coraz większe wyzwanie diagnostyczno-epidemiologiczne. Całość jest przedstawiona przejrzysto, bez zarzutów merytorycznie i redakcyjnie, opatrzona bogatą dokumentacją graficzną. Praca zawiera zarówno elementy poznawcze jak i aplikacyjne. Całość świadczy o

dużej wiedzy teoretycznej Doktorantki, dobrym opanowaniu warsztatu naukowego i wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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 związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn.zm.) i dlatego zwracam do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Danuty Bieńko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 10 lipca 2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Stefania Giedrys-Kalemba

Prof. dr hab. n. med.
Stefania Giedrys-Kalemba
specjalista mikrobiolog
1012475

