



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, dn. 14 lipca 2023 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Olgi Saran  
pt. „Ocena metod wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki  
klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych”**

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

*Promotor pomocniczy: dr n. med. Dorota Żabicka*

Podstawą formalną wykonania recenzji było pismo z Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 17 maja 2023 r.

Praca doktorska stanowi monografię będącą podsumowaniem badań laboratoryjnych izolatów klinicznych pałeczek Gram-ujemnych przeprowadzonych przez Doktorantkę w Zakładzie Mikrobiologii Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Do rozprawy dołączono oświadczenie Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (z dnia 15 kwietnia 2019 r.), iż przedstawione badanie nie stanowiło eksperymentu medycznego w rozumieniu art. 21 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. z 2018 r. poz. 617) i nie wymagało uzyskania opinii Komisji Bioetycznej, o której mowa w art. 29 ust. 1 ww. ustawy.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy bardzo istotnego problemu zarówno klinicznego jak i diagnostycznego. Aktualnie jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego jest dynamiczne i globalne rozprzestrzenianie się pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających karbapenemazy (ang. *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* - CPE). Bezobjawowa kolonizacja szczepami CPE jest źródłem rozprzestrzeniania się tych bakterii w populacjach pacjentów hospitalizowanych i poddawanych długotrwałej antybiotykoterapii, ponadto, wiąże się z wysokim ryzykiem rozwoju zakażeń u tych chorych. Na oddziałach szpitalnych poza szczepami opornymi na karbapenemy (CPE) ciągłe zagrożenie stanowią także szczepy wytwarzające  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym typu ESBL (ang. *extended-spectrum beta-lactamases*). Konsekwencje kliniczne i epidemiologiczne zakażeń szczepami CPE oraz o fenotypie ESBL sprawiają, że istnieje potrzeba stałego nadzoru i monitorowania obserwowanego zjawiska. W tym celu szczególnie znaczenie nabiera



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

dostępność szybkich i precyzyjnych testów diagnostycznych umożliwiających wykrycie, zidentyfikowanie i określenie mechanizmów oporności badanych izolatów. Taka diagnostyka gwarantuje wczesne wdrożenie celowanej terapii antybiotykowej, co jest szczególnie istotne w sytuacji rozprzestrzeniania się wśród pacjentów hospitalizowanych szczepów wielolekoopornych.

Założenia rozprawy doktorskiej zakładały ocenę metod wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych. Ponadto, analizę występowania izolatów z przypadków nosicielstwa wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ESBL, izolatów wytwarzających karbapenemazy typu MBL (ang. *metallo-beta-lactamase*) oraz izolatów opornych na karbapenemy, u których nie wykryto enzymatycznego mechanizmu oporności. A także analizę badanych szczepów pod względem wrażliwości na wybrane antybiotyki zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczenia Lekowrażliwości (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST*) oraz Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD).

Biorąc pod uwagę powyższe, tematyka ocenianej pracy doktorskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Jest ona bardzo ważna i odpowiada na bieżące potrzeby diagnostyki mikrobiologicznej, skutecznej terapii pacjentów oraz kontroli zakażeń. Przedstawione w pracy badania wpisują się w tematykę z dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

**CHARAKTERYSTYKA FORMALNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Olgi Saran przygotowana została w tradycyjny sposób, tj. stanowi obszerną monografię liczącą 262 strony tekstu z uwzględnieniem literatury oraz załączników. Praca została podzielona na typowe części składowe, a mianowicie: wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i piśmiennictwo. Do rozprawy załączono streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Ponadto, w pracy znalazł się spis rycin - liczący 87 pozycji, spis tabel - których jest 29 oraz wykaz stosowanych skrótów - liczący aż 9 stron tekstu. Na końcu pracy znajduje się skan oświadczenia Komisji Bioetycznej oraz obszerny aneks liczący 12 stron. Doktorantka przygotowała rozprawę w oparciu o 327 pozycje literaturowe z lat 1940-2023, z czego ok. 80% stanowią prace od 2000 roku. Rozprawa doktorska jest napisana poprawnym językiem, bez istotnych błędów stylistycznych, czy interpunkcyjnych.



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

CHARAKTERYSTYKA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

**Wstęp** do pracy liczący aż 50 stron przygotowany został z bardzo obszernym przedstawieniem literatury przedmiotu. Doktorantka we wstępie omówiła systematykę i charakterystykę pałeczek Gram-ujemnych, w tym szczepów wielolekoopornych. Ponadto zawarła szczegółową charakterystykę antybiotyków  $\beta$ -laktamowych oraz  $\beta$ -laktamaz w tym  $\beta$ -laktamaz typu ESBL oraz karbapenemaz. Dalej opisała nieenzymatyczne mechanizmy oporności na karbapenemy oraz problem występowania pałeczek Gram-ujemnych opornych na karbapenemy w środowisku szpitalnym. Szczególnie wartościowym jest podrozdział poświęcony omówieniu nowych opcji terapeutycznych. Wstęp kończy szczegółowe omówienie metod diagnostycznych stosowanych do wykrywania mechanizmów oporności na karbapenemy oraz wartości diagnostycznych testów. Analiza wstępu wskazuje na bardzo szeroką i ugruntowaną wiedzę Doktorantki.

W świetle przedstawionych we wstępie do pracy problemów, Doktorantka postawiła sobie za **cel główny** porównanie dostępnych testów diagnostycznych wykrywających mechanizmy oporności pałeczek Gram-ujemnych na karbapenemy (fenotypowa metoda dyfuzyjno-krażkowa, test biochemiczny, test immunochromatograficzny, metoda PCR w czasie rzeczywistym oraz test oparty na technice spektrometrii mas) oraz oceny ich wiarygodności. Dodatkowo sformułowała **pięć celów szczegółowych** zakładających poza powyższym celem głównym, analizę występowania: Gram-ujemnych pałeczek z rzędu *Enterobacterales* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), Gram-ujemnych pałeczek z rzędu *Enterobacterales* opornych na karbapenemy, wytwarzających karbapenemazy typu MBL (ang. metallo- $\beta$ -lactamase) oraz Gram-ujemnych pałeczek z rzędu *Enterobacterales* oraz pałeczek *Pseudomonas aeruginosa* opornych na karbapenemy, u których nie wykryto enzymatycznego mechanizmu oporności na te antybiotyki. Ostatni z celów szczegółowych dotyczył analizy badanych szczepów bakteryjnych pod względem wrażliwości na wybrane antybiotyki zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) oraz Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD). Należy zauważyć, że tak szeroko sprecyzowane cele szczegółowe powodują, iż przedstawiona do oceny rozprawa jest bardzo obszerna, wielowątkowa i przez to niekiedy trudna w ocenie z uwagi na dużą liczbę podjętych tematów i przeprowadzonych analizy.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Rozdział **materiały i metody** liczy 24 strony i przedstawia bardzo szczegółowe omówienie charakterystyki szpitala, wykorzystanych materiałów w tym izolatów pałeczek Gram-ujemnych, warunków hodowli, metod identyfikacji oraz oznaczania lekowrażliwości badanych izolatów na antybiotyki. Rozdział ten może stanowić wartościową lekturę dla osób przygotowujących się do specjalizacji z mikrobiologii medycznej. Szczególnie interesujące i nowatorskie jest zastosowanie testu MBT STAR-Carba IVD Kit do analizy aktywności karbapenemaz poprzez hydrolizę imipenemu, wykorzystującego spektrometrię mas z użyciem aparatu MALDI-TOF MS [Bruker].

Rozdział **wyniki** jest bardzo obszernym opracowaniem i liczy 79 stron tekstu. Ta część zawiera szczegółowy i wielowątkowy opis rezultatów uzyskany przez Doktorantkę na podstawie metodyki opisaną wcześniej. Tak szerokie opracowanie jest często trudne w ocenie i jego lektura stanowi duże wyzwanie dla recenzenta. Doktorantka, starając się przedstawić czytelnie uzyskane wyniki, zaprezentowała ich analizę na licznych rycinach, razem w tym tylko rozdziale jest ich 64, oraz przedstawiła je w 21 tabelach. Dodatkowo szczegółowe wyniki załączyła w postaci 6 załączników w aneksie. Z punktu widzenia praktycznego wykorzystania wyników doktoratu, najbardziej wartościowe, o dużej wartości publikacyjnej są wyniki analiz porównania metod wykrywania karbapenemaz. Poza rzetelną analizą badanego zagadnienia, doktorantka prezentuje ciekawe zestawienie czasu trwania wybranych metod wykrywania karbapenemaz (Ryc.40) oraz porównanie cen dostępnych testów (Tabela 14). W świetle bardzo dużej popularności w ostatnich latach metody spektrometrii mas oraz coraz większej dostępności aparatów typu MALDI-TOF MS i ich wdrożenia do zastosowań w identyfikacji gatunkowej bakterii, na uwagę zasługują wyniki z zastosowania tej metody do oceny aktywności karbapenemaz. To stosunkowo nowe wykorzystanie tej metody, które wymaga dalszych prac nad jej standaryzacją i walidacją, więc tym bardziej cenne jest użycie jej przez Doktorantkę.

**Dyskusja** otrzymanych wyników w świetle dostępnych danych literaturowych liczy 32 strony. W rozdziale tym Doktorantka wyszczególniła poszczególne podrozdziały w celu utrzymania bardziej przejrzystego tekstu i łatwiejszej lektury. Na wstępie omawiane są pałeczki Gram-ujemne z rzędu *Enterobacterales* wytwarzające ESBL. Następnie zawarto dyskusję na temat porównania lekowrażliwości szczepów z rzędu *Enterobacterales* ESBL(+) oraz izolatów *Pseudomonas aeruginosa* i pałeczek należących do rzędu *Enterobacterales* opornych na karbapenemy w innym mechanizmie niż enzymatyczny. Po czym Doktorantka zajmuje się



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

szczegółową dyskusją dotyczącą porównania metod wykrywania karbapenemaz, co stanowi główny cel tej rozprawy. Połowa tego rozdziału (16 stron) zawiera omówienie wyników oceny częstości występowania i lekowrażliwości na antybiotyki pałeczek Gram-ujemnych z rzędu *Enterobacterales* wytwarzających karbapenemazy. W części tej szczegółowo omówiono dostępne opcje terapeutyczne do leczenia zakażeń szczepami opornymi, w tym wrażliwość na cefiderokol, ceftazydym z awibaktamem, meropenem z waborbaktamem, imipenen z relebaktamem czy fosfomicynę. Ten fragment dyskusji jest szczególnie wartościowy dla klinicystów i członków zespołów zakażeń szpitalnych.

Dysertację doktorską kończy rozdział przedstawiający wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych analiz wnioski. Doktorantka sformułowała 12 obszernych wniosków, z których 11 bezpośrednio wynika z uzyskanych wyników, zaś 12 wniosków nie odnosi się do prowadzonych badań i raczej powinien być wykorzystany w podsumowaniu pracy, niż jako wniosek. Wnioski numer 3 do 9 odnoszą się do celu głównego pracy jakim była ocena metod wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych.

UWAGI DYSKUSYJNE I KOMENTARZE:

W zakresie analizy merytorycznej pracy należy poruszyć kilka poniższych kwestii:

1. W przedstawionej do oceny rozprawie izolaty pałeczek Gram-ujemnych pochodziły z wymazów z odbytu pobranych w okresie od 01.07.2017 r. do 30.09.2018 r. od pacjentów hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym (SP CSK) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM), obecnie: Centralny Szpital Kliniczny (CSK) Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (UCK) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM). Uwagę recenzenta zwraca okres pozyskania izolatów, pięć lat od złożenia monografii do oceny, który jest bardzo odległy. Przedstawione zatem liczne szczegółowe analizy izolatów z podziałem na siedem Klinik Szpitala (np. Ryc. 48, Ryc. 56, Ryc. 74 – 84, Tabela 16, 17, 28), w związku z tym, że nie zostały wcześniej opublikowane, a dotyczą lat 2017-2018, w obecnym czasie mają niewielką wartość merytoryczną czy praktyczną. Dowodzą jedynie umiejętności Doktorantki w samodzielnym prowadzeniu analizy i opracowania wyników pracy naukowej. W ocenie recenzenta szczegółowe opisy, ryciny, tabele oraz załączniki (w aneksie) dotyczące analizy izolatów z nosicielstwa z uwzględnieniem wybranych Klinik, z których pochodzili pacjenci, istotnie utrudniają lekturę rozprawy i powodują, że ocena realizacji założonego celu głównego, którym było





UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

porównanie testów wykrywających mechanizmy oporności pałeczek Gram-ujemnych na karbapenemy oraz ocena ich wiarygodności, staje się bardzo żmudna i trudna. Należy także zauważyć, że badane izolaty pochodziły jedynie z przypadków nosicielstwa. W badanym materiale zabrakło szczepów z zakażeń, co istotnie wpłynęłoby na wartość merytoryczną przedstawionych opracowań z podziałem na Kliniki Szpitala.

2. Dodatkowa trudność w ocenie rozprawy doktorskiej związana jest z przedstawieniem przez Doktorantkę bardzo licznych szczegółowych analiz uwzględniających wybrane grupy izolatów, wśród których obok dominujących gatunków znajdują się także pojedyncze izolaty reprezentujące różne gatunki. Na przykład w rozdziale 4.1.1. wśród 121 pałeczek Gram-ujemnych z rzędu Enterobacterales wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ESBL analizie poddano izolaty *Escherichia coli* (n=62) oraz *Klebsiella pneumoniae* (n=49), stanowiące ok 92% całej puli, a także pojedyncze izolaty *Citrobacter freundii* (n=3), *Klebsiella oxytoca* (n=2), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Enterobacter aerogenes* (n=1), *Klebsiella variicola* (n=1), *Kluyvera ascorbata* (n=1) czy *Proteus mirabilis*. Na początku Doktorantka omawia i przedstawia rozkład lekowrażliwości na wybrane antybiotyki wśród wszystkich badanych izolatów pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających ESBL (Ryc. 26), po czym przechodzi do analiz z uwzględnieniem wybranych gatunków (Ryc. 27, Ryc. 28). Następnie przedstawia szczegółowe wyniki liczby i odsetka izolatów wytwarzających ESBL w odniesieniu do wrażliwości na wybrane antybiotyki w postaci tabeli (Tabela 8). A na koniec na kolejnych dwóch rycinach (Ryc. 29, Ryc.30) prezentuje analizę rozkładu wartości MIC wybranych antybiotyków dla badanych izolatów pałeczek Gram-ujemnych ESBL (+). Takie podejście w opracowaniu wyników generuje bardzo dużą liczbę danych trudnych w analizie, interpretacji i dyskusji, nie mających istotnej wartości merytorycznej. Aby przedstawione wyniki w rozdziale 4.1.1. były czytelne i możliwe do analizy oraz porównania z innymi powinny uwzględnić jedynie dominujące gatunki, w tym, przypadku *E. coli* i *K. pneumoniae*, przedstawione na dwóch rycinach w tym rozdziale (Ryc. 26, Ryc. 27).

Kolejnym przykładem jest analiza profilu lekowrażliwości pałeczek wytwarzających karbapenemazy (rozdział 4.2.3, str. 138) uwzględniająca wszystkie izolaty (Ryc. 49) oraz z podziałem na gatunki (Ryc. 50 i 51). W przedstawionej analizie w celu uzyskania przejrzystych wyników powinno uwzględnić się jedynie izolaty należące do gatunku *K. pneumoniae* (n=52, 88%) (Ryc. 52).

3. W ocenie recenzenta wysoką wartość publikacyjną mają wyniki dotyczące porównania testów wykrywających mechanizmy oporności pałeczek Gram-ujemnych na karbapenemy, dlatego zachęca się Doktorantkę do podjęcia takich działań, celem przygotowania



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

manuskryptu pracy. Jednakże z uwagi na nowelizację przepisów ustawy o zawodach lekarza i lekarza dentysty, która dokonana została dnia 16 lipca 2020 roku i wprowadziła istotną zmianę zasad przeprowadzania eksperymentów medycznych, którym obecnie jest również przeprowadzenie badań materiału biologicznego, w tym genetycznego pobranego od osoby do celów naukowych, przed złożeniem manuskryptu zasadne jest rozważenie pozyskania opinii Komisji Bioetycznej.

4. Doktorantka w swojej rozprawie podaje, że do analizy użyto 261 szczepów pałeczek Gram-ujemnych, w tym 121 unikatowych izolatów (np. str 26, str 110), wytwarzających  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym – ESBL, 95 izolatów pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających karbapenemazy, a także 22 izolaty pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*/rzędu *Enterobacterales* oraz 23 izolaty *Pseudomonas aeruginosa* odporne lub o obniżonej wrażliwości na karbapenemy w mechanizmie innym niż enzymatyczny. Szczepy te nazywa także „niepowtarzalnymi” (str. 87). Na jakiej podstawie uznano te izolaty za unikatowe? Czy zastosowano metodę typowania molekularnego w celu oceny ich podobieństwa genetycznego? Jeśli tak, to jaką i jakie były wyniki? Jeśli nie, sugeruje się aby przed złożeniem manuskryptu publikacji rozważyć możliwość przeprowadzenia takiego typowania np. metodą REA-PFGE (ang. *Restriction Enzyme Analysis with Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

Należy zaznaczyć iż powyższe uwagi/komentarze wynikają z obowiązku recenzenta i mają na celu głównie pomoc przy redagowaniu przyszłego manuskryptu pracy celem ich opublikowania, nie wpływają jednak na pozytywną ocenę przedłożonej dysertacji doktorskiej Pani mgr Olgi Saran.

Pod względem uwag edycyjnych/edytorskich należy zwrócić uwagę na poniższe fragmenty pracy:

1. W przypadku pojedynczych rycin (np. Ryc. 10, Ryc. 13, Ryc. 15) brak informacji czy przedstawione schematy stanowią oryginalne opracowanie Doktorantki, czy zostały zaczerpnięte z pozycji literaturowych (brak cytacji).
2. Rycina 52 powinna zostać przedstawiona w postaci jednego wykresu, a nie być prezentowana w formie dwóch osobnych wykresów.
3. Rycina 56 nie zawiera opisu osi Y i jednostek.



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

4. Doktorantka podaje, że ze względu na koszty oznaczenie lekowrażliwości, analizę wykonano jedynie dla 59 izolatów wyhodowanych od pacjentów hospitalizowanych w pięciu klinikach szpitala (str. 138). Brak informacji jakie było kryterium wyboru izolatów.
5. Rozdział dyskusja miejscami zawiera powtórzenie wyników, szczególnie jest to widoczne na stronach 197 – 199., gdzie brakuje dyskusji przedstawionych wyników oraz odniesienia do danych literaturowych.
6. Załącznik nr 1 przedstawiony w aneksie prezentuje ogólnodostępne wytyczne dotyczące interpretacji wartości MIC zgodnie z EUCAST i KORD. Zabrakło jednak istotnych informacji co do roku, z którego pochodzą te rekomendacje, brak też odniesienia do piśmiennictwa.
7. Załączniki nr 2, 4, 5, 6, 7 będące częścią aneksu, to tzw. surowe wyniki. Nie przedstawiają one istotnej wartości merytorycznej, a jedynie wydłużają już i tak bardzo obszerną pracę doktorską.
8. Z kolei, dołączony do aneksu załącznik numer 2 jest kluczowy dla przedłożonej rozprawy i powinien zostać przedstawiony w części opisującej wyniki.

Powyższe błędy edycyjne nie umniejszają wartości merytorycznej pracy badawczej, która jest rzetelna i niewątpliwie wzbogaci wiedzę na temat oceny metod wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam że, 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 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.) i na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, o dopuszczenie Pani mgr Olgi Saran do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zakład Molekularnej  
Mikrobiologii Medycznej UJ CM  
*Monika Brzychczy-Włoch*  
prof. dr hab. Monika Brzychczy-Włoch  
kierownik

Prof. dr hab. Monika Brzychczy-Włoch

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysta 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

[www.km.cm-uj.krakow.pl](http://www.km.cm-uj.krakow.pl)