

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

Akceptuję
Elsz

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Olgi Saran pt.

„Ocena metod wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych”

Oporność drobnoustrojów, a zwłaszcza tlenowych pałeczek Gram-ujemnych stanowi w ostatnich latach jedno z ważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Najwięcej problemów diagnostycznych jak i terapeutycznych sprawiają szczepy odporne na powszechnie stosowane antybiotyki β -laktamowe, a szczególnie odporne na karbapenemy. Mnogość wytwarzanych mechanizmów oporności, łatwość rozprzestrzeniania się w środowisku szpitalnym i kolonizacji chorych powoduje, że szczepy takie wywołują ciężkie zakażenia o dużej śmiertelności. Szybka identyfikacja czynnika etiologicznego, określenie mechanizmów oporności, wdrożenie celowanego leczenia i odpowiednich działań przeciwepidemicznych ma istotne znaczenia dla uzyskania wyleczenia i ograniczenia rozprzestrzeniania się szczepów opornych.

W tym kontekście wybór tematu pracy jest ważny i wciąż aktualny.

Rozprawa doktorska jest bardzo obszerna, liczy łącznie 262 strony maszynopisu, w tym 9 rozdziałów, 87 rycin i 99 tabel. Została przygotowana z zachowaniem typowego dla takich opracowań układu. Kolejne rozdziały to: *Wstęp, Założenia i cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo, Opinia Komisji Bioetycznej* oraz *Aneks z 7 Załącznikami (tabele)*. Zawiera także *Spis rycin, Spis tabel, Wykaz stosowanych skrótów* oraz *Streszczenie w jęz. polskim i Streszczenie w jęz. angielskim*.

We *Wstępie* (49 stron) Autorka najpierw omawia pałeczki Gram-ujemne i problemy związane z występowaniem szczepów opornych oraz antybiotyki β -laktamowe, mechanizmy oporności związane z wytwarzaniem różnych β -laktamaz i nieenzymatycznych mechanizmów oporności na karbapenemy. Następnie przedstawia nowe możliwości terapeutyczne związane z pojawieniem się nowych inhibitorów β -laktamaz oraz cefiderokol. Kolejny podrozdział to omówienie obecnie stosowanych metod diagnostycznych do wykrywania oporności na karbapenemy, w tym metody opartej na spektrometrii mas. *Wstęp* kończy opisanie zasad określania czułości i swoistości testów.

Rozdział ten niewątpliwie świadczy o ogromnej wiedzy Doktorantki w zakresie poruszanych zagadnień i stanowi bazę do postawienia celu badań własnych.

Celem głównym badań było porównanie testów wykrywających mechanizmy oporności pałeczek Gram-ujemnych na karbapenemy i ocena ich wiarygodności.

Dodatkowo Doktorantka planuje także ocenić pałeczki Gram-ujemne wytwarzające β -laktamazy ESBL i karbapenemazy MBL oraz szczepy *Pseudomonas aeruginosa* z nieenzymatycznym mechanizmem oporności na karbapenemy, kolonizację badanych szczepów u pacjentów, a także określenie wrażliwości wybranych szczepów na wybrane antybiotyki.

Material i metody. Materiał do badań stanowiło 261 szczepów pałeczek Gram-ujemnych izolowanych z wymazów z odbytu w okresie 01.07.2017 – 30.09.2018 od pacjentów SP CSK WUM. Było to: 95 izolatów pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających karbapenemazy pochodzących z 4 klinik chirurgicznych i 3 zachowawczych, w tym z Kliniki Chorób Wewnętrznych, Hematologii i Onkologii. Natomiast tylko z Kliniki Chorób Wewnętrznych, Hematologii i Onkologii pochodziło 121 szczepów *Enterobacterales* wytwarzających ESBL, 22 izolaty pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* i 23 izolaty *Pseudomonas aeruginosa* z nieenzymatycznym mechanizmem oporności. Do identyfikacji szczepów stosowano technikę MALDI-TOF MS.

Zastosowane metody, zgodnie z wytycznymi EUCAST, obejmowały oznaczanie wrażliwości na różne antybiotyki, w tym określenie MIC z użyciem pasków z gradientem stężeń lub metodą rozcieńczeń w bulionie (kolistyna), wykrywanie β -laktamaz ESBL metodą dyfuzyjno-krążkową oraz karbapenemaz testami fenotypowymi, biochemicznym Carba NP, immunochromatograficznym NG Carba 5 Multiplex, molekularnym Xpert Carba-R i MBT STAR-Carba (spektrometria mas).

W analizie statystycznej zastosowano szereg testów przy użyciu pakietu IBM SPSS Statistics 25.

Przedstawienie materiału i zastosowanych metod jest bardzo szczegółowe, często z dodatkowymi opisami.

Wyniki badań (79 stron) przedstawione są w kilku podrozdziałach. Pierwsze obejmują omówienie szczepów należących do *Enterobacterales*: a/ wytwarzających enzymy ESBL, b/ wytwarzających karbapenemazy wraz z porównaniem zastosowanych metod ich wykrywania i lekowrażliwości oraz c/ opornych na karbapenemy w mechanizmie nieenzymatycznym. Następnie przedstawione są wyniki dla grupy szczepów *Pseudomonas aeruginosa* opornych na karbapenemy w mechanizmie nieenzymatycznym. Kolejne podrozdziały dotyczą wyników licznych, rozbudowanych analiz statystycznych, dokonanych w różnych kombinacjach (?).

Wyniki przedstawione są bardzo szczegółowo, w podaniu wartości bezwzględnych i procentów, na licznych rycinach i w tabelach, z odniesieniem do poszczególnych klinik. Nie sposób ich omówić.

Podobnie rozdział *Dyskusja* (22 strony) ma kilka podrozdziałów, w których na bazie licznych danych z literatury przedstawione są własne wyniki. Obejmują one szczepy wytwarzające ESBL, lekowrażliwość izolatów opornych na karbapenemy w mechanizmie nieenzymatycznym, porównanie metod wykrywania karbapenemaz, a także obszerną dyskusję lekowrażliwości badanych szczepów wytwarzających karbapenemazy na nowe/stare leki i nowe połączenia β -laktamów w kontekście możliwości terapeutycznych.

Pracę podsumowuje 12 wniosków, które odnoszą się wprawdzie do poszczególnych analizowanych i postawionych wcześniej celów, jednak w większości są właściwie przedstawieniem uzyskanych wyników. Praktycznym wnioskiem jest wniosek 9. wskazujący na ograniczone zastosowanie testu MBT STAR-Carba (z wykorzystaniem spektrometrii mas) w laboratorium – długa procedura, brak określenia typu karbapenemazy.

Piśmiennictwo jest imponujące, liczy 327 pozycji, jest starannie dobrane i 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 również obszerne (5 i 4 strony), mają charakter opisowy.

Uwagi Recenzenta:

1. Praca doktorska mgr Olgi Safran jest niewątpliwie bardzo ambitna i poświęcona ciekawej, aktualnej tematyce. Jestem pod wrażeniem ogromnej wiedzy i mrówczej pracy, jaką wykonała Doktorantka, jednakże przebrnięcie przez manuskrypt było dla mnie jako Recenzentki dużym wyzwaniem.

2. Przedstawione materiały, badania i analizy mogłyby stanowić przynajmniej dwie oddzielne dyzertacje. Różne grupy analizowanych szczepów, różne cele, różne metody i antybiotyki, ogromna liczba szczegółów, tabel czy rycin powoduje, że czytający zwyczajnie się gubi w natłoku danych.

3. Temat pracy „*Ocena metod wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych*” właściwie nie obejmuje poruszanych zagadnień. Porównanie metod dotyczyło jedynie testów wykrywających mechanizmy oporności pałeczek Gram-ujemnych na karbapenemy, gdzie 87/95 stanowiły pałeczki *Klebsiella pneumoniae* produkujące MBL, zaś 3 gatunki produkowały OXA-48, 3 - MBL, jeden KPC (str. 123).

4. Wytwarzanie β -laktamaz, rozkłady wrażliwości czy wartości MIC powinno się określać dla poszczególnych gatunków pałeczek, a nie łącznie. Również wyliczanie procentów przy pojedynczych liczbach szczepów nie jest wskazane.

5. Zestawienie wyników wykrywania karbapenemaz jest w Załączniku 3 a nie 2.

6. Tab.10. – bardzo dyskusyjna, także 11, 12, 13. Wyniki prawdziwie dodatnie, fałszywie ujemne i fałszywie dodatnie w odniesieniu do poszczególnych testów? Jedne testy służą do różnicowania karbapenemaz, inne tylko je wykrywają. Testy fenotypowe i Carba NP mają czułość i swoistość 100% - nic dziwnego, gdyż do badań zakwalifikowano szczepy wytwarzające karbapenemazy (str. 126), ale w praktyce mogą być wątpliwe i wymagają weryfikacji testami genetycznymi. Czy można porównywać testy wykonane z wymazu odbytu (Xpert Carba-R) z wykonanymi z hodowli otrzymanej wcześniej?

7. Ryc. 62A. Dotyczy izolatu 6409 *Citrobacter freundii* VIM(+) - temocylina jest zarośnięta, czyli szczep produkuje OXA-48?

8. Tab. 20 i 22. Wykonane testy są ujemne = mechanizm oporności nieenzymatyczny, a może wynik fałszywie ujemny? Czy oznaczono wrażliwość na temocylinę lub wykonano inne testy np. Xpert Carba czy test chromatograficzny.

9. Określenia:

- klasyfikacja Busha-Jacoby-ego – Bush to kobieta, Karen.

- „kliniczne szczepy” – raczej myślimy o szczepach izolowanych z zakażeń - w pracy badane szczepy pochodziły z wymazów z odbytu (badania przesiewowe). O ile rutynowo sprawdza się nosicielstwo w kierunku CPE, nie bada się nosicielstwa ESBL, jest powszechne, a wyniki nie są zaskakujące.

- „niepowtarzalne/unikatowe” izolaty – nie jest precyzyjne. Są to wprawdzie szczepy izolowane z różnych oddziałów i od różnych pacjentów, ale mogą być genetycznie spokrewnione i należeć do tych samych klonów, krążących w szpitalu.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Olgi Saran stanowi oryginalne rozwiązanie problemów naukowych i daje szereg informacji o nosicielstwie szczepów opornych, ich wykrywaniu (w tym z wykorzystaniem spektrometrii mas) i ewentualnie możliwościach terapii wywoływanych przez nie zakażeń. Praca zawiera zarówno elementy poznawcze jak i aplikacyjne. Całość świadczy o dużej wiedzy teoretycznej Doktorantki i doświadczeniu warsztatowym.

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 Olgi Saran do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 18 lipca 2023 r.

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

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

