

**Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki o zdrowiu**

Pani mgr Marty Kłos

**pt.” Zakażenia krwi o etiologii *Enterobacteriaceae* u hospitalizowanych osób
dorosłych w Polsce południowej – wybrane aspekty”**

Zakażenia nabyte w szpitalach (ang. hospital-acquired infections, HAIs) to wciąż jeden z najważniejszych problemów przed jakimi staje współczesna służba zdrowia. Według ECDC (ang. European Center for Disease Prevention and Control) każdego roku u około 4 milionów hospitalizowanych pacjentów diagnozowane są zakażenia szpitalne, w tym 11% stanowią zakażenia krwi (ang. bloodstream infection, BSI). W Polsce odsetek zakażeń krwi jest wyższy i wynosił np. 18% w badaniu punktowym PPS (ang. Point Prevalence Survey) w latach 2012-2014. Zakażenia krwi cechują się wysoką śmiertelnością, która na oddziałach intensywnej terapii (OIT) dochodzi aż do około 38%. Ponadto szpitalne zakażenia krwi wydłużają czas hospitalizacji chorego, w Polsce średnio do 29-34 dni oraz zwiększają podaż antybiotyków i koszty opieki zdrowotnej. Ze względów klinicznych i epidemiologicznych zakażenia krwi dzielimy na pierwotne i wtórne. O ile pierwotne zakażenia krwi związane są przede wszystkim z cewnikiem centralnym u pacjenta, to wtórne BSIs mają zróżnicowane źródła. Do wtórnego BSI dochodzi gdy ognisko pierwotnej infekcji znajduje się u pacjenta w innej lokalizacji niż krew. Najczęściej wtórne zakażenia krwi powiązane są z zakażeniami dróg moczowych, zakażeniami miejsca operowanego, ale także może do nich dochodzić w wyniku ciężkiego przebiegu zakażeń dolnych dróg oddechowych, zakażeń w obrębie jamy brzusznej, zakażeń skóry i tkanek miękkich, zakażeń układu rozrodczego oraz zakażeń kości lub stawów. W konsekwencji do wtórnych zakażeń krwi może dochodzić na wszystkich oddziałach szpitalnych, a w szczególności na oddziałach intensywnej opieki medycznej, oddziałach zabiegowych i oddziałach internistycznych. Trzeba jednak zauważyć, iż w oddziałach OIT zastosowanie dostępu naczyniowego jest niezbędną procedurą, konieczną do monitorowania stanu pacjenta oraz prowadzenia terapii farmakologicznej a także żywieniowej.

Drugim niezmiernie ważnym aspektem szpitalnych zakażeń krwi są czynniki etiologiczne które je wywołują. Badania przeprowadzone w ramach programu EPIC II (ang. Extended Prevalence of Infection in Intensive Care) w 75 krajach z całego świata na 1265

OIT wykazały, że najczęstszymi patogenami wywołującymi zakażenia były bakterie Gram-ujemne – 62%, następnie bakterie Gram-dodatnie – 47%, zaś 17% stanowiły infekcje grzybicze. Na istotny lub dominujący udział pałeczek Gram-ujemnych jako czynnika etiologicznego zakażeń krwi wskazują badania prowadzone w szpitalach na całym świecie. W ostatnich latach zaobserwowano wzrost BSIs wywołanych głównie przez szczepy *Escherichia coli*, a w niektórych ośrodkach także przez szczepy *Klebsiella pneumoniae*. Ponadto wciąż obserwowane jest na świecie narastanie lekooporności szczepów szpitalnych, w tym także tych odpowiedzialnych za BSIs. Niezmiernie istotna w leczeniu BSIs jest zatem szybka i precyzyjna diagnostyka czynnika etiologicznego, określenie profilu lekowrażliwości danego szczepu, prowadzenie mikrobiologicznego dochodzenia epidemiologicznego, jak i analiza retrospektywna i statystyczna przypadków zakażeń krwi. Ponadto mając na uwadze planowanie nowego postępowania terapeutycznego ważne jest pogłębianie badań nad mechanizmami oporności i czynnikami wirulencji szczepów wywołujących BSIs.

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Kłos wpisuje się w ten ważny i aktualny temat badawczy. Poświęcona jest analizie problemu w dziedzinie medycyny, w zakresie dotyczącym epidemiologii bakteryjnych zakażeń krwi i ich analizy mikrobiologicznej, w tym wybranych czynników zjadliwości oraz mechanizmu oporności typu ESBL u szczepów pałeczek Gram-ujemnych z rzędu *Enterobacterales*. Analiza ta obejmowała: (1) przeprowadzenie oceny prewalencji szczepów z rzędu *Enterobacterales* które były czynnikami etiologicznymi szpitalnych zakażeń krwi u hospitalizowanych osób dorosłych w zależności od wieku i płci pacjentów oraz w zależności od grup oddziałów szpitalnych, (2) badanie lekooporności szczepów *Enterobacterales* odpowiedzialnych za BSIs u pacjentów z poszczególnych grup oddziałów, (3) poszukiwanie szczepów pałeczek wytwarzających enzymy ESBL i badanie obecności w genomach izolatów ESBL(+) z rodziny *Enterobacteriaceae* wybranych genów wirulencji, genów kodujących β -laktamazy oraz ocenę podobieństwa genetycznego metodą PFGE. Materiał do badań stanowiło 356 izolatów pochodzących z przypadków wtórnych zakażeń krwi o etiologii *Enterobacterales* od dorosłych pacjentów hospitalizowanych w latach 2015-2018 w 13 szpitalach województwa śląskiego i małopolskiego. W pierwszej części wyników dotyczących ogólnej analizy bakteryjnych czynników etiologicznych zakażeń krwi doktorantka uwzględniła także inne grupy bakterii tj. Gram-ujemne pałeczki niefermentujące (n=40) oraz ziarenkowce Gram-dodatnie (n=161). Pozwoliło to na szerszą analizę bakteryjnych przyczyn szpitalnych zakażeń krwi w szpitalach południowej Polski. Analiza udziału pałeczek *Enterobacterales* na tle innych bakterii jako czynnika BSIs jest niezmiernie cenna.

Jak Doktorantka przedstawiła w swojej rozprawie, w Polsce podobnie jak w wielu krajach na świecie, dominujące uprzednio czynniki etiologiczne BSIs jak *Staphylococcus aureus* oraz gronkowce koagulazo-ujemne zostają wypierane przez pałeczki *Enterobacteriaceae*, głównie przez *E. coli* i coraz częściej izolowane *K. pneumoniae*. Doktoranta wykazała, że u pacjentów z OIT porównywalnie często występują zakażenia krwi wywołane zarówno przez *E. coli* (8/27 przypadków) jak i przez *K. pneumoniae* (9/27 przypadków). W odróżnieniu od OIT na oddziałach zabiegowych i internistycznych dominowały zakażenia krwi wywołane przez szczepy *E. coli* (214/530 przypadków), a szczepy *K. pneumoniae* spowodowały jedynie 80/530 zakażeń.

Rozprawa doktorska jest zwarta, liczy 103 stron druku, a jej układ jest typowy. Napisana jest w przystępny sposób a jej logiczny układ ułatwia czytelnikowi śledzenie realizacji celów postawionych w pracy oraz analizę uzyskanych wyników. Niezmiernie cenny jest załączony na początku pracy Wykaz Skrótów stosowanych w pracy.

W 25-stronnicowym Wstępie do rozprawy Doktorantka rzeczowo przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą trzech zagadnień związanych ze szpitalnymi bakteryjnymi zakażeniami krwi: (1) ogólną charakterystykę gatunków pałeczek z rzędu *Enterobacterales*, które wywołują szpitalne zakażenia krwi, uwzględniając najnowsze zmiany w systematyce pałeczek; (2) opisuje zagadnienia zakażeń krwi z podziałem na zakażenia pierwotne i wtórne, podając kryteria jakie muszą być spełnione przy diagnostyce klinicznej i laboratoryjnej aby postawić rozpoznanie BSIs, a także poświęca krótki podrozdział wstępu zagadnieniu sepsy klinicznej; (3) krótko charakteryzuje lekooporność naturalną i nabytą pałeczek *Enterobacterales* skupiając się głównie na gatunkach *E. coli* i *K. pneumoniae*, rozszerzając opis mechanizmu związanego z wytwarzaniem enzymów - β -laktamaz typu ESBL. Wstęp stanowi teoretyczne wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej, a w szczególności cenne jest opisane zagadnień dotyczących zakażeń krwi, podanie ich definicji i kryteriów. Wstęp uzasadnia wybór tematyki badawczej pracy.

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej została wykonana prawidłowo. Eksperymenty zostały zaplanowane logicznie z jasno postawionym celem. W recenzowanej pracy doktorskiej zastosowano cały szereg metod zarówno (1) mikrobiologicznych (wykonano identyfikację gatunkową bakterii przy użyciu spektroskopu masowego MALDI-TOF MS, określono profile lekooporności w zautomatyzowanym systemie BD Phenix 100 oraz metodą krążkowo-dyfuzyjną, a także przeprowadzono fenotypowe testy przesiewowe w kierunku poszukiwania szczepów ESBL-dodatnich), (2) analizy epidemiologicznej (określono współczynnik prewalencji pałeczek *Enterobacterales* jako czynnika etiologicznego BSIs,

a jako zmienne w badaniach przyjęto miejsce hospitalizacji, płeć i wiek pacjenta, zastosowano test Chi2 Pearsona, test Fishera, a analizy statystyczne opracowano za pomocą pakietu PQStat, (3) genetycznych (poszukiwano przy użyciu reakcji PCR i multipleks PCR wybranych genów wirulencji oraz genów kodujących β -laktamazy, a także wykonano analizę podobieństwa izolatów *E. coli* i *K. pneumoniae* ESBL(+) metodą PFGE). Prawidłowo przeprowadzono część badawczą rozprawy doktorskiej. Stosowanie rozmaitych, poprawnie dobranych metod świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktorantkę.

Uzyskane w pracy wyniki Doktorantka przedstawiła w 14 tabelach i na 4 rycinach. Dodatkowo w dwóch załącznikach do rozprawy doktorskiej umieszczono zdjęcia przedstawiające przykłady wyników fenotypowej metody wykrywania szczepów wytwarzających enzymy ESBL, metody krążkowo-dyfuzyjnej określania lekowrażliwości oraz elektroforetycznego rozdziału produktów reakcji PCR zastosowanej do poszukiwania genów wirulencji. Załączniki te stanowią istotne uzupełnienie pracy, nie są obszerne i według recenzenta mogłyby być włączone bezpośrednio do rozdziału Wyniki. Wszystkie tabele i ryciny zawarte w pracy są czytelne oraz pomocne w interpretacji uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Cenny jest załączony na końcu pracy Wykaz Tabel i Rycin ułatwiający szybkie znalezienie i zapoznanie się z wybranymi fragmentami wyników.

Dokładna analiza uzyskanych wyników oraz ich skondensowana dyskusja, połączona ze wskazaniem uzyskanych przez innych badaczy zbliżonych rezultatów, została przeprowadzona w sposób poprawny, z analizą dostępnego piśmiennictwa przedmiotu. Zacytowane piśmiennictwo jest obszerne i aktualne, obejmuje 176 pozycji. W tym uwzględniono adresy stron internetowych międzynarodowych organizacji, na których można znaleźć aktualne informacje dotyczące zakażeń szpitalnych, lekooporności bakterii oraz programów monitorowania tych problemów.

W rozdziale Wnioski Końcowe postawione przez Doktorantkę wnioski uważam za merytorycznie poprawne. Jednakże według recenzenta wnioski płynące z rozprawy doktorskiej powinny być zawarte w krótkich punktach, a nie w opisowym tekście.

W rozprawie doktorskiej Pani mgr Marty Kłós w wyniku wykonanych eksperymentów i przeprowadzonej analizy epidemiologicznej uzyskała szereg interesujących wyników, spośród których za najważniejsze uważam:

1. Przeprowadzenie analizy epidemiologicznej w oparciu o znaczną liczbę 558 przypadków wtórnych bakteryjnych zakażeń krwi z 13 szpitali województwa śląskiego i

małopolskiego z lat 2015-2018, co pozwoliło na retrospektywne spojrzenie na czynniki etiologiczne wywołujące wtórne BSIs na terenie południowej Polski w odniesieniu do sytuacji w Europie i na świecie. Doktorantka wykazała, że 356/558 (63,9%) szczepów bakterii powodujących BSIs u badanych pacjentów należy do rzędu *Enterobacterales*, z czego 332/356 szczepów należało do rodziny *Enterobacteriaceae*, 40/558 izolatów (7,2%) to Gram-ujemne pałeczki niefermentująca, a jedynie 161/558 (28,9%) izolatów to ziarenkowce Gram-dodatnie. Zarówno na oddziałach zabiegowych jak i na oddziałach internistycznych szczepy *E. coli* były głównymi czynnikami wtórnych zakażeń krwi, odpowiednio 46,8% i 37,6% wśród wszystkich szczepów powodujących BSIs. W przypadku OIT głównymi czynnikami BSIs były szczepy *K. pneumoniae* - 9 izolatów (33,3%) jak i szczepy *E. coli* - 8 izolatów (29,6%). Doktorantka wykazała, iż podobnie jak w innych krajach europejskich szczepy *E. coli* są głównymi czynnikami powodującymi BSIs oraz, że rośnie udział szczepów *K. pneumoniae* w zakażeniach zwłaszcza na OIT i oddziałach zabiegowych.

2. Na podstawie przeprowadzonych badań lekowrażliwości i dokonanej ich analizy w zależności od oddziałów szpitalnych, poszczególnych gatunków pałeczek z rzędu *Enterobacterales* oraz zdolności wytwarzania enzymów typu ESBL, Doktorantka wykazała, iż największy odsetek szczepów opornych na szeroką grupę β -laktamów (z wyjątkiem karbapenemów) stanowią izolaty *E. coli* ESBL(+) zarówno uzyskane z BSIs na oddziałach zabiegowych jak i na OIT. Natomiast u izolatów od pacjentów z oddziałów internistycznych oporność na antybiotyki β -laktamowe stwierdzono u około 50% szczepów *E. coli* ESBL(+) jak i *K. pneumoniae* ESBL(+). Co istotne, tylko dla 5 izolatów z *Enterobacteriaceae* stwierdzono oporność na jeden z karbapenemów (imipenem lub ertapenem), tzw. leków ostatniej szansy. Niepokojem napawa fakt wykazania przez Doktorantkę dużego odsetka szczepów opornych na cyprofloksacynę i trimetoprim-sulfametoksazol u pałeczek *Enterobacterales* niezależnie od oddziałów szpitalnych.

3. Doktorantka przeprowadziła pogłębione badania mikrobiologiczne i genetyczne dwóch głównych czynników etiologicznych wtórnych BSIs u badanych pacjentów z południa Polski, tj. izolatów *E. coli* i *K. pneumoniae*, u których uprzednio wykazała zdolność do wytwarzania enzymów typu ESBL.

3a. Badania fenotypowe przeprowadzone przez Doktorantkę uwidocznily szerokie rozpowszechnienie enzymów ESBL wśród pałeczek *Enterobacteriaceae*, głównie wśród szczepów z rodzaju *Klebsiella* z przewagą gatunku *K. pneumoniae*, a w drugiej kolejności u szczepów *E. coli*. Największy odsetek tych szczepów ESBL(+) wykazano wśród izolatów pochodzących od pacjentów z oddziałów internistycznych. Badania genetyczne pozwoliły na

stwierdzenie iż najszerszej rozpowszechnioną rodziną enzymów ESBL u badanych pałeczek jest CTX-M. Doktorantka wykazała w metodzie PFGE duże podobieństwo rzędu 95-100% dla czterech izolatów *K. pneumoniae* ESBL(+) od chorych z jednego oddziału zabiegowego.

3b. Doktorantka wykazała u większości szczepów *E. coli* ESBL(+), obecność genów odpowiedzialnych za adhezję tj. genów *fimH*, *iha*, a u izolatów z oddziałów internistycznych również obecność genów *papC* i *papEF*. Nie stwierdziła natomiast obecności genów *sfa/foc*. U badanych izolatów ze wszystkich oddziałów szpitalnych powszechnie występowały także geny związane z transportem żelaza tj. geny *iucC*, *iutA*, *fyuA*, *fepA* i *fecA*. Ponadto nie stwierdzono lub w nielicznych tylko przypadkach wykryto obecność genów związanych z patogenezą zapalenia mózgu (genów *ibeA* i *neuC*) oraz genu *hlyA* kodującego hemolizynę. Największą prevalencję genów wirulencji wśród szczepów *E. coli* ESBL(+) w zależności od oddziałów szpitalnych Doktorantka wykazała dla genów adhezji *fimH*, *papEF*, *papC* i genu związanego z transportem żelaza *iutA*, prevalencja od 0,0019 do 0,0381.

3c. Dla szczepów *K. pneumoniae* ESBL(+) Doktorantka wykazała obecność u większości z nich genów związanych z syntezą otoczki bakteryjnej tj. genów *wabG* i *uge*. Geny związane z transportem żelaza nie były u tych szczepów tak powszechne jak w przypadku szczepów *E. coli*. Wyjątkiem były szczepy *K. pneumoniae* z OIT, u których wszystkich wykazano obecność genu *kfu*. U żadnego z badanych szczepów nie stwierdzono obecności genu *allS* odpowiedzialnego za metabolizm alantoiny. Największą prevalencję genów wirulencji wśród szczepów *K. pneumoniae* ESBL(+) w zależności od oddziałów szpitalnych Doktorantka wykazała dla genu związanego z transportem żelaza *kfu*, prevalencja wynosiła 0,0081.

Moje uwagi i sugestie dotyczące rozprawy doktorskiej oraz związane z tym pytania:

1. Rozprawa doktorska zawiera liczne drobne uchybienia, nieprawidłowości stylistyczne zdań oraz niepoprawne sformułowania – skróty myślowe. Poniżej przykłady:

- zamiast słowa *Klebsiella* powinno być napisane z rodzaju *Klebsiella* lub *Klebsiella* sp.
- zamiast pałeczki *Salmonelli* powinno być pałeczki *Salmonella* sp.
- nazwy gatunkowe powinny być pisane z odstępem np. *E.coli* powinno być *E. coli*
- nie należy pisać „geny oporności na antybiotyki β -laktamowe i karbapenemy” bowiem karbapenemy są antybiotykami β -laktamowymi
- nie należy pisać „u pacjentów hospitalizowanych czy operowanych” bowiem pacjenci operowani są z reguły hospitalizowani

- str. 17 „Izolaty *S. marcescens* wykazują oporność na wiele środków drobnoustrojowych, w tym ampicylinę, cefalosporynę i karbapenemy.” Proszę aby Doktorantka podała na jaką to cefalosporynę? Ponadto powinno być - środki przeciwdrobnoustrojowe.

- str. 18 „Ponadto systemy wychwyty metali niezbędnych do wzrostu komórki czy białkowe toksyny zapewniające oporność” Proszę aby Doktorantka wyjaśniła jakie białkowe toksyny miała na myśli?

- dotyczy podrozdziału 3.1. Oporność naturalna. Proszę aby Doktorantka wyjaśniła (1) mechanizm oporności naturalnej tj. inaktywacja leku – który wymienia w rozdziale, (2) na jakie toksyny zapewnia bakteriom oporność mechanizm efflux oraz (3) jakimi „dodatkowymi elementami kodowanymi chromosomalnie” są „wspomagane” „poryny i pompy wypływowe”

- dotyczy podrozdziału 3.2. Oporność nabyta. Proszę, aby Doktorantka wyjaśniła na czy polega „enzymatyczna modyfikacja celu: oporność na wankomycynę występuje w przypadku reorganizacji ściany komórkowej”

- dotyczy podrozdziału 3.2.1. β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania. Proszę, aby Doktorantka wyjaśniła na czym polega „Tworzenie β -laktamaz jest mechanizmem oporności należącym zarówno do mechanizmu modyfikacji miejsca docelowego leku”

oraz na jakie to są enzymy ESBL z klasy B wg Amblera o których pisze na str. 29

- str. 34 i 35. Niezmiernie istotna informacja iż badane szczepy zostały wyizolowane od pacjentów z wtórnym zakażeniem krwi powinna być bardziej wyeksponowana i zamieszczona zarówno w celu pracy jak i informacjach dotyczących badanego materiału (w pierwszych zdaniach akapitu rozdziału 6).

- str. 34 W swojej rozprawie Doktorantka postawiła zbyt szeroki jeden z celów szczegółowych „Oznaczenie genów kodujących oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe”, a w pracy wykrywane są jedynie geny kodujące cztery rodziny β -laktamaz.

- str. 35 w Materiałach i Metodach – błędna liczba szczepów tj. 358 zamiast 356.

- str. 38 dlaczego interpretacji wyników wrażliwości dokonała Doktorantka na podstawie wytycznych EUCAST z 2017 roku a nie chociażby z 2020 roku?

- str. 41 podano „geny kodujące karbapenemazę *bla_{OXA}*” co nie jest zgodne z wynikami, w których geny te traktuje Doktorantka jako kodujące enzymy ESBL. Proszę o wyjaśnienie.

- str. 47 i str. 102. podpisano „przykładowe zdjęcie hodowli szczepu ...” Zdjęcie te nie przedstawiają hodowli szczepu ale wyniki wykrywania wytwarzania enzymów ESBL przez dany szczep.

- str. 50. W zdaniu „cefalosporyny bez inhibitora wykazały oporność” Moja uwaga – to szczepy wykazują oporność a nie antybiotyki.

- str. 55. W tabeli 7 niepotrzebna ostatnia kolumna „Inne n=0”.

- str. 61-62 W tabelach nr 10, 11 i 12 podano nieprawidłowe liczby szczepów ESBL+ i ESBL-, które są niezgodne z wcześniejszą tabelą 9.

Przedstawione powyżej uwagi nie wpływają na zawartość merytoryczną pracy, którą oceniam wysoko. Z obowiązku recenzenta uważam, że wskazane jest zasygnalizowanie jeszcze poniższych spraw, których wyjaśnienie może być przydatne w przygotowywaniu publikacji.

1. Pytania wypływające z niedoprecyzowania opisu metodyki badawczej podanej w rozprawie doktorskiej:

- str. 39-40. Proszę o podanie, jakich genów poszukiwano w poszczególnych reakcjach multipleks PCR.

- str. 42 dotyczy metodyki PFGE. Proszę aby Doktorantka przedstawiła procedurę przygotowania próbek DNA poddanych rozdzielaniu w zmiennym polu elektrycznym, warunki analizy w programie GelCompar i warunki/punkty odcięcia określania pokrewieństwa przy interpretacji żeli PFGE oraz jaki był zastosowany wzorzec w rozdzielaniu na żelach podczas PFGE.

2. W rozprawie Doktorantka wykrywała rodziny genów a nie geny kodujące konkretne β-laktamazy np. CTX-M-15. O ile rodzina enzymów CTX-M to zawsze enzymy typu ESBL to nie jest tak w przypadku pozostałych wykrywanych w niniejszej pracy rodzin tj. SHV, TEM, OXA. U pałeczek *Enterobacteriaceae* najczęściej wykrywanymi enzymami z rodziny TEM, SHV i OXA są enzymy o wąskim spektrum działania czyli TEM-1, SHV-1, OXA-2 lub OXA-10. Proszę aby doktorantka ustosunkowała się do tych uwag w kontekście wyników i wniosków które podała w swojej rozprawie.

Wniosek:

W oparciu o powyższą recenzję, z przekonaniem stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora i zgodnie z art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Marty Kłós do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, dnia 25.06.2021 r.