WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej

Warszawa, 25.09.2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Doroty Ochońskiej

pt. „Molecular epidemiology of clinical strains *Klebsiella pneumoniae*, population clonal structure, virulence and antibiotic resistance"
(„Epidemiologia molekularna szczepów klinicznych *Klebsiella pneumoniae*, struktura klonalna populacji, wirulencja i antybiotykooporność")

Promotor: prof. dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy bardzo istotnej tematyki szerzenia się wielolekoopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych w placówkach ochrony zdrowia. W dochodzeniu epidemiologicznym niezmiernie ważna jest szybka diagnostyka mikrobiologiczna w celu potwierdzenia, czy nastąpiła transmisja określonego szczepu bakterii. W takim przypadku konieczne jest ustalenie jego źródła, by zapobiec dalszemu szerzeniu się.

W ostatnich latach obserwuje się szybki postęp w dziedzinie molekularnej epidemiologii. Badania te pozwalają na dogłębną analizę szczepów drobnoustrojów i określenie możliwych dróg ich szerzenia się, szczególnie wśród hospitalizowanych pacjentów, często obarczonych wieloma współistniejącymi chorobami.

W literaturze naukowej coraz częściej cytowana jest analiza, którą w 2014 r. dla rządu Wielkiej Brytanii opracował ekonomista Jim O'Neill. Zgodnie z tym raportem szacuje się, że na świecie w 2050 r. liczba zgonów z powodu zakażeń wywołanych przez wielolekooporne szczepy bakterii (10 mln) przekroczy liczbę zgonów z powodu chorób nowotworowych (8,2 mln). Szczególnie dotyczy to pałeczek Gram-ujemnych wykazujących oporność na karbapenemy, gdyż opcje terapeutyczne w przypadku zakażeń o takiej etiologii są bardzo ograniczone.

Jednocześnie priorytetem w medycynie stają się badania dotyczące wytwarzania biofilmu przez drobnoustroje wywołujące zakażenia. Penetracja antybiotyków i innych leków przeciwdrobnoustrojowych do struktury biofilmów jest bardzo ograniczona, co powoduje, że eliminacja czynnika etiologicznego zakażenia jest znacznie utrudniona lub niemożliwa.

Praca doktorska Pani mgr Doroty Ochońskiej oparta jest na pracach badawczych przeprowadzonych z wykorzystaniem klinicznych szczepów Gram-ujemnych pałeczek *Klebsiella pneumoniae*. Wybór tego gatunku do badań naukowych jest istotny ze względu na szczególnie duży potencjał tych szczepów do nabywania w warunkach szpitalnych genów oporności na wiele antybiotyków i innych leków przeciwdrobnoustrojowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Doroty Ochońskiej stanowi cykl trzech tematycznie spójnych artykułów, opublikowanych w języku angielskim w 2021 r. w recenzowanych czasopismach naukowych, którym przypisano współczynnik oddziaływania (ang. Impact factor, IF) i punktację Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN). Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich trzech prac (o wkładzie procentowym wynoszącym 70%), stanowiących opracowania zbiorowe. Należy podkreślić, że wszystkie trzy publikacje wchodzące w skład cyklu są pracami oryginalnymi.

Rozprawa doktorska mgr Doroty Ochońskiej ma układ typowy dla prac doktorskich stanowiących cykl publikacji, choć jest wyjątkowo obszerna, gdyż liczy 152 strony. Rozprawa obejmuje następujące części: Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenie rozprawy w języku polskim, Streszczenie rozprawy w języku angielskim („Summary"), analizę bibliometryczną cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki (odrębne dla każdej z trzech publikacji), Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo, Załączniki zawierające kserokopie trzech publikacji stanowiących cykl będący przedmiotem rozprawy, Oświadczenia współautorów zawierające informację o wyrażeniu zgody na wykorzystanie danej publikacji w pracy doktorskiej mgr Doroty Ochońskiej oraz dwie Opinie Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Pierwsza publikacja z prezentowanego cyklu, zatytułowana „Clonal dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland." ukazała się w czasopiśmie „Polish Journal of Microbiology" w 2021 r. (IF: 1,280, punktacja MEiN: 40). Opublikowane w tej pracy wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę i współautorów wskazują, że poddany analizie szpitalny szczep *Klebsiella pneumoniae* nabył liczne geny oporności na karbapenemy (KPC-2, VIM-1 i OXA-48). Co więcej, szczep ten należał do klonu (ang. sequence type 147, ST 147; clonal complex 147, CC147), określanego jako klon wysokiego ryzyka epidemicznego szerzenia się.

Drugi wchodzący w skład cyklu artykuł pt. „Biofilm formation of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from tracheostomy tubes and their association with antimicrobial resistance, virulence and genetic diversity" jest pracą, która została opublikowana w 2021 r. w czasopiśmie „Pathogens" (IF: 3,492; punktacja MEiN: 100). W tej pracy Doktorantka i współautorzy poddali analizie 18 izolatów *Klebsiella pneumoniae*, które pochodziły z wydzielin tchawiczych z rurek tracheostomijnych, stosowanych u hospitalizowanych pacjentów. Na uwagę w tej publikacji zasługują szczegółowe badania dotyczące charakterystyki czynników wirulencji szczepów poddanych analizie oraz ich zdolności do wytwarzania biofilmu, co zostało dodatkowo zilustrowane zdjęciami ze skaningowego mikroskopu elektronowego. Wyniki badań zawarte w tej publikacji potwierdzają konieczność prowadzenia dalszych prac naukowych w celu opracowania nowych lub modyfikacji obecnie stosowanych materiałów do

wytwarzania rurek tracheotomijnych, by maksymalnie ograniczyć ryzyko adhezji drobnoustrojów do ich powierzchni, a tym samym wytwarzania przez nie biofilmów.

Publikacja nr 3 to artykuł zatytułowany „Studies on molecular epidemiology of ESβL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland", który ukazał się w czasopiśmie „Advances in Hygiene and Experimental Medicine" w 2021 r. (IF: 0,270; punktacja MEiN: 40). W pracy tej zbadano 139 izolatów *Klebsiella pneumoniae* ESBL-dodatnich (ang. extended-spectrum β-lactamase), wyhodowanych z różnych próbek klinicznych pobranych od hospitalizowanych pacjentów. W trakcie badań w analizowanych izolatach *Klebsiella pneumoniae* wykryto duże zróżnicowanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji oraz genów warunkujących oporność na antybiotyki i inne leki przeciwbakteryjne.

W obszernym wstępie rozprawy, liczącym 24 strony, Doktorantka przedstawiła aktualną taksonomię i ogólną charakterystykę pałeczek z rodzaju *Klebsiella*, a następnie szczegółowo omówiła gatunek *Klebsiella pneumoniae*, w tym czynniki wirulencji szczepów tego gatunku i wytwarzanie przez nie biofilmu. Jako recenzent mam kilka zastrzeżeń do tej części rozprawy. Na stronie 17 jest napisane, że podgrupa KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) obejmuje rodzaje „o najbliższym pokrewieństwie", jednak rodzaje te należą do odrębnych rodzin w obrębie rzędu *Enterobacterales* (*Serratia* – do rodziny *Yersiniaceae*, a pozostałe rodzaje – do rodziny *Enterobacteriaceae*). Moje wątpliwości budzi też stwierdzenie na stronie 18 rozprawy o podobieństwie w preparacie bezpośrednim *K. pneumoniae* (Gram-ujemne pałeczki) i pneumokoków (Gram-dodatnie ziarenkowce). W pracy kilkakrotnie pojawia się termin „posocznica", choć w literaturze medycznej i w wytycznych różnych towarzystw na świecie (ang. Global Sepsis Alliance) i w Polsce (np. Narodowy Program Zwalczania Sepsy) zaleca się używać słowa „sepsa". Uważam też, że pojęcie zakażeń szpitalnych (p. 1.2.4. oraz 1.2.7) powinno być rozszerzone – obecnie używa się terminu zakażenia związane z opieką zdrowotną, gdyż infekcje wywoływane przez wielolekooporne szczepy bakterii (w tym *Klebsiella pneumoniae*) są notowane nie tylko w szpitalach, ale także w innych jednostkach ochrony zdrowia. Szczególnie dotyczy to osób przebywających w placówkach opieki długoterminowej, którzy często są skolonizowani takimi szczepami. Na stronie 32 jest błąd w opisie LPS jako integralnego składnika błony komórkowej (powinno być: ściany komórkowej) bakterii Gram-ujemnych, a na stronie 33 – jest mowa o „błonie zewnętrznej gospodarza" zamiast o błonie zewnętrznej ściany komórki bakteryjnej.

Celem głównym recenzowanej pracy doktorskiej było scharakteryzowanie szczepów klinicznych *Klebsiella pneumoniae*, izolowanych do pacjentów hospitalizowanych w latach 2016 2019 w trzech szpitalach specjalistycznych (w Katowicach i w Krakowie). Doktorantka sformułowała sześć celów szczegółowych (a – f): określenie wybranych fenotypów lekooporności badanych izolatów, detekcję wybranych genów kodujących oporność na

antybiotyki β-laktamowe, określenie podobieństwa genetycznego badanych izolatów metodami REA-PFGE (ang. restriction endonuclease analysis – pulsed-field gel electrophoresis) oraz MLST (ang. multilocus sequence typing), wykrywanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji oraz ocenę zdolności badanych izolatów *Klebsiella pneumoniae* do wytwarzania biofilmu.

Rozdział „Materiały i metody" (7 stron) zawiera opis izolatów poddanych analizie w trzech opublikowanych pracach oraz metod zastosowanych w tych badaniach. Brak jest jednak informacji, czy analizowane izolaty były pierwszym izolatem od danego pacjenta, czy też mogły być zduplikowane (od tego samego pacjenta, ale z różnych materiałów klinicznych i/lub z kilku próbek pobranych od danego pacjenta podczas hospitalizacji). Szczegółowo opisana jest metoda oceny tworzenia biofilmu przez badane izolaty *K. pneumoniae* oraz obrazowania tych biofilmów na powierzchni biomateriałów. Brak jest podania kryterium wyboru izolatów „wytypowanych" do badania ich zdolności do wytwarzania biofilmu. Doktorantka uzyskała w 2019 r. dwie pozytywne opinie Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum do przeprowadzenia badań zaplanowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Analiza statystyczna jest odpowiednia, a za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p<0,05$.

Rozdział „Wyniki" podzielony jest na trzy części, odpowiadające publikacjom wchodzącym w skład cyklu stanowiącego pracę doktorską. W tej części rozprawy Doktorantka obszernie przedstawiła w języku polskim wyniki opublikowane w trzech artykułach stanowiących cykl publikacji. Należy podkreślić, że w przedłożonej do recenzji rozprawie Doktorantka zamieściła dodatkową rycinę (ryc. 8, str. 53).

Rozdział Dyskusja liczy 17 stron. Doktorantka zaznaczyła w nim, że zależnie od regionu geograficznego obecnie notuje się znaczne zróżnicowanie profili lekowrażliwości szczepów *K. pneumoniae*. W niniejszej rozprawie badania dotyczyły południowej Polski, co wskazuje na potrzebę prowadzenia dalszych badań naukowych w tym zakresie, z uwzględnieniem poszczególnych regionów naszego kraju.

Na podstawie przeprowadzonych badań, których wyniki przedstawione są w trzech oryginalnych publikacjach tworzących cykl, Pani mgr Dorota Ochońska sformułowała sześć obszernych wniosków (w wydruku rozprawy otrzymanym do recenzji ostatni wniosek oznaczony jest cyfrą 7 zamiast 6). Doktorantka wymieniła wykryte w badanych szczepach klinicznych *K. pneumoniae* różne rodzaje genów kodujących β-laktamazy typu ESBL oraz karbapenemazy. Istotne jest stwierdzenie występowania w Polsce wielolekoopornych szczepów *K. pneumoniae* ST147, o dużej wirulencji i epidemicznym potencjale, a także lokalnie występujących klonów. Doktorantka wymieniła też duże zróżnicowanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji (najczęściej siderofory) oraz zdolność badanych szczepów do wytwarzania biofilmu. Stwierdzam, że wnioski te odpowiadają założonym celom recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Bibliografia obejmuje 140 pozycji (publikacje, podręczniki i źródła internetowe), które są przedstawione według kolejności cytowania w tekście rozprawy i obejmują także trzy publikacje stanowiące cykl. Około połowa tych pozycji literatury została opublikowana w ciągu ostatnich 5 lat. Piśmiennictwo podane jest też w poszczególnych publikacjach stanowiących cykl: 27 w artykule nr 1, 41 – w publikacji nr 2 oraz 28 – w pracy nr 3.

Jako czytelnik mam zastrzeżenia co do terminologii zastosowanej w publikacji nr 1 cyklu, gdyż zamiennie były używane terminy „szczepy" i „izolaty" (str. 98 rozprawy: „Six [40%] strains .... and nine [60%] isolates ...", także str. 47-48), co ma znaczenie w pracy dotyczącej badań molekularnych mających na celu wykazanie podobieństwa genetycznego badanych izolatów *K. pneumoniae*. W istocie w tym artykule chodziło o 15 izolatów (str. 40 i 49 rozprawy), które w przeprowadzonych badaniach okazały się jednym szczepem (str. 50 i 98), szerzącym się w danej placówce ochrony zdrowia („This study showed that the *K. pneumoniae* isolates detected in the multi-profile medical centre in Katowice represented a single strain of the microorganism spreading in the hospital environment.").

Na str. 68 Doktorantka użyła określenia „średnia wrażliwość", jednak ze względu na zmianę definicji w styczniu 2019 r. przez EUCAST (ang. European Committee for the Study of Antimicrobial Susceptibility) obecnie należy używać określenia WZE (wrażliwy – zwiększona ekspozycja).

Na str. 70 Doktorantka przytacza „stosunkowo wysoki odsetek szczepów CRKP dodatkowo opornych na tigecyklinę (42,8%)". Uważam, że wymaga to komentarza, gdyż jest to odsetek znacznie wyższy niż w innych cytowanych przez Doktorantkę publikacjach. Zważywszy jednak na fakt, że te izolaty okazały się jednym szczepem, szkoda, że takich badań nie wykonano dla zróżnicowanych szczepów *K. pneumoniae* objętych publikacją nr 2 i nr 3.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zaznaczyć, że w tekście rozprawy są błędy edytorskie, które oczywiście nie mają wpływu na wysoką wartość naukową pracy, np. niektóre skróty (np. MDR, PDR i XDR) są niedokładnie przetłumaczone na język polski, brak jest ujednolicenia pisowni piśmiennictwa, w tekście występują błędy literowe i stylistyczne oraz powtarzające się braki znaków interpunkcyjnych.

Stwierdzam, że w przeprowadzonej pracy badawczej Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą w zakresie tematyki artykułów stanowiących cykl publikacji, umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a także wnikliwą analizą uzyskanych wyników. Wnioski wynikające z przeprowadzonych doświadczeń są sformułowane poprawnie. Metody badawcze zastosowane w przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentach naukowych oraz uzyskane wyniki, opublikowane w trzech artykułach stanowiących cykl publikacji, zostały pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów renomowanych czasopism naukowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Doroty Ochońskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Pod względem merytorycznym pracę tę oceniam wysoko, szczególnie w aspekcie szczegółowej analizy genów kodujących lekooporność i czynniki wirulencji badanych izolatów *K. pneumoniae*, ich zdolność do wytwarzania biofilmu, a także podobieństwo genetyczne, co ma duże znaczenie w dochodzeniu epidemiologicznym w ognisku zakażeń.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Doroty Ochońskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, nr 65, poz. 595, Dz. U. 2017, poz. 1789 z późn. zm.) oraz art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1669 z późn. zm.). Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Mikrobiologii Stomatologicznej

prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska