

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek. Magdaleny Łyckiej pt.

" Epidemiologiczne aspekty nosicielstwa *Clostridioides difficile*"

wykonana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i pisma Pani Wiceprzewodniczącej Rady z dnia 22.10.2020 r.

Bakteria *Clostridioides difficile* (*C.difficile*), zwana była do 2016 r. *Clostridium difficile*, jednak nadal w literaturze występuje pod obiema nazwami. Zainteresowanie nią w ciągu ostatnich dwudziestu latami związane jest z powszechnym stosowaniem antybiotyków oraz rosnącą częstością zakażeń *C.difficile* na całym świecie, zwłaszcza w szpitalach, co przedłuża okres hospitalizacji i istotnie podnosi jego koszty. Zakażenie *C.difficile* jest główną przyczyną biegunek poantybiotykowych, zwłaszcza u osób hospitalizowanych i należy do grupy sześciu najczęstszych zakażeń związanych z opieką zdrowotną w Europie. Choroba przebiega w postaciach od łagodnej do ciężkiej, jak np. rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego, toksyczne rozdęcie okrężnicy i groźnych dla życia powikłań, jak perforacja jelita, sepsa, czy nawet prowadzić może do zgonu. Nawroty zakażenia, po wyleczeniu choroby, są częste, sięgają ok. 25% chorych.

Bakteria jest szeroko rozpowszechniona w środowisku, może też kolonizować przewód pokarmowy bez wywoływania objawów klinicznych, co nazywamy nosicielstwem. Z uwagi na rosnącą częstość zakażenia *C.difficile*, wprowadzono kryteria jego rozpoznania. I tak zakażenie *C.difficile* rozpoznaje się, gdy występują objawy kliniczne w postaci nasilonej biegunki wodnistej u chorego z dodatnimi wynikami badań mikrobiologicznych lub jeżeli występuje toksyczne rozdęcie okrężnicy, przy wykluczeniu innych przyczyn oraz gdy spełnione jest co najmniej jedno z trzech kryteriów: 1) obecność toksyn A i/lub B w stolcu, lub szczepu toksynotwórczego w posiewie kału, lub przy zastosowaniu innych metod np. PCR, 2) rozpoznanie rzekomobłoniastego zapalenia jelita badaniem endoskopowym lub w trakcie zabiegu i 3) stwierdzenie rzekomobłoniastego zapalenia jelita w badaniu histopatologicznym.

Zakażenie *C.difficile* podlega obowiązkowej rejestracji, stąd wiadomo, że zapadalność w Polsce przekracza 30 przyp. na 100 000 mieszkańców. Ostatnio podkreśla się, iż nie tylko antybiotyki o szerokim spektrum działania stanowią czynniki ryzyka zachorowania na zakażenie *C.difficile*. Do innych, ważnych,

należą powszechnie i w nadmiarze stosowane inhibitory pompy protonowej, które zmniejszając wydzielanie żołądkowe oddziałują na skład mikrobioty jelitowej, a także glikokortykosteroidy, czy kwas acetylosalicylowy. Ponadto ryzyko zakażenia jest większe u osób w starszym wieku, z przewlekłymi chorobami, jak np. cukrzyca, nieswoiste zapalenia jelit, czy nowotwory. Występowanie bakterii w przewodzie pokarmowym bez objawów klinicznych, tj. biegunki, zwane nosicielstwem/kolonizacją, jest częste u noworodków i małych dzieci (25-90%), u kilku-kilkunastu procent dorosłych i częste u pensjonariuszy ośrodków opieki długoterminowej.

Przesłana do recenzji rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lek. Magdaleny Łyckiej jest oryginalną pracą badawczą i ma charakter monografii. Promotorem jest prof. dr hab. n. med. Jacek Muszyński, a rozprawa została wykonana w Klinice Gastroenterologii i Chorób Przemiany Materii oraz Klinice Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Lek. Magdalena Łycka zamierzała zbadać szereg istotnych aspektów epidemiologicznych nosicielstwa *C.difficile*, jak częstość nosicielstwa u pacjentów przyjmowanych i wypisywanych z oddziału, występowanie czynników ryzyka w okresie przedszpitalnym i w trakcie pobytu w oddziale, a także poznanie odległych jego skutków z potencjalnymi konsekwencjami dla rodziny chorego. Ponadto zamierzała sprawdzić, czy u pracowników medycznych oddziału występuje nosicielstwo przewodu pokarmowego *C.difficile*, jako potencjalne źródło transmisji bakterii na chorych.

Rozprawa zawiera 114 stron, podzielona została na typowe rozdziały. Poprzedzona jest spisem treści, spisem 14 wykresów i 18 tabel, wykazem skrótów, streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim.

W wstępie Autorka wprowadza czytającego w problematykę zakażenia *C.difficile* i występowanie jej w środowisku, a w dwóch kolejnych podrozdziałach bardzo szczegółowo przedstawiła zakażenie i nosicielstwo *C.difficile*. I tak w podrozdziale zatytułowanym „zakażenie *C.difficile*” lek. Magdalena Łycka szczegółowo przedstawiła: definicję zakażenia, manifestację kliniczną, epidemiologię zakażeń, którą zilustrowała wykresem zakażeń w latach 2013-2018, czynniki ryzyka zakażenia i czynniki patogenności. W kolejnym podrozdziale pt. „nosicielstwo *C.difficile*” Doktorantka przedstawiła: definicję nosicielstwa *C.difficile*, konsekwencje jego dla pacjenta, mechanizm nosicielstwa, epidemiologię nosicielstwa, czas kolonizacji, diagnostykę mikrobiologiczną, którą zilustrowała w Tabeli 1 zestawem metod, postępowanie z nosicielami i nosicielstwo *C.difficile*, jako zagrożenie dla innych osób, leczenie nosicielstwa i na końcu wstępu - występowanie *C.difficile* w środowisku szpitalnym. Doktorantka podkreśliła, że zakażenie *C. difficile* jest główną przyczyną biegunek poantybiotykowych i po innych

lekach, szczególnie u osób hospitalizowanych i z obniżoną odpornością. Choroba może manifestować się w postaci łagodnej lub ciężkiej biegunki, jako rzekomobłoniaste zapalenie jelit, toksyczne rozdęcie okrężnicy i może prowadzić do wielu powikłań zagrażających życiu pacjenta, takich jak perforacja jelita, sepsa, czy śmierć. Doktorantka we wstępie słusznie podała, że coraz większą uwagę zwraca się w ostatnich latach na nosicielstwo *C.difficile*, czyli obecność bakterii w przewodzie pokarmowym bez objawów klinicznych. Zrozumienie bowiem problemów epidemiologicznych nosicielstwa może przyczynić się do lepszej kontroli i zapobiegania zakażeniom związanym z opieką medyczną.

Recenzent podkreśla, że wstępny rozdział pracy doktorskiej został opracowany szczegółowo, a zarazem niezwykle przejrzystie, ułatwiając czytającemu zapoznanie się z problemem epidemiologicznym i klinicznym niezwykle ważnego i najczęstszego zagrożenia w środowisku szpitalnym, jakim jest zakażenie *C.difficile* i jego następstwa. W tej części rozprawy Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością podjętego tematu, a rozdział ten napisany został bardzo skrupulatnie w oparciu o liczne i poprawnie dobrane najnowsze piśmiennictwo.

W kolejnym rozdziale lek. Magdalena Łżycka przedstawiła cel pracy (str.38). I tak, głównym celem rozprawy doktorskiej była analiza retrospektywna i prospektywna narażenia pacjentów na występowanie nosicielstwa *C.difficile*, zaś celami szczegółowymi: (1) określenie czynników ryzyka nabycia nosicielstwa przed hospitalizacją, (2) analiza wpływu warunków szpitalnych i przebiegu hospitalizacji na możliwość nabycia nosicielstwa, (3) ocena odległych skutków nosicielstwa i (4) analiza nosicielstwa wśród personelu lekarskiego i pielęgniarskiego w oddziale chorób wewnętrznych.

W rozdziale zatytułowanym Metodologia (str. 39-43) lek. Magdalena Łżycka przedstawiła szczegółowo charakterystykę badanego materiału klinicznego i metodykę badań. Badanie było prowadzone w dwóch oddziałach szpitala uniwersyteckiego w latach 2014-2017, po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Do badania kwalifikowano kolejno przyjmowanych chorych, u których stwierdzono kolonizację przewodu pokarmowego *C.difficile*, zaś grupę kontrolną stanowiły osoby bez kolonizacji. Osoby włączane do badania wypełniały formularz zawierający kilka pytań ważnych przy analizie epidemiologicznej. Ponadto badano personel lekarski i pielęgniarski pod kątem nosicielstwa. Pobierano dwie próbki stolca - do 48 godz. od rozpoczęcia hospitalizacji i w dniu wypisu. Stosowano jałowe pałeczki do wymazów i podłoże transportowe typu AMIES. Posiewy wykonywano do 48 godzin na selektywnym podłożu agarowym CLO firmy bioMérieux i inkubowano w warunkach beztlenowych. Obecność kolonii *C. difficile* potwierdzano na podstawie charakterystycznego zapachu i wyglądu kolonii, a w wątpliwych sytuacjach stosowano metodą spektrometrii masowej w systemie MALDI TOF MS . W dodatknych posiewach z próbki kału pobranego w dniu wypisu oznaczano toksynotwórczość metodą RT-PCR na aparacie Gen Xpert firmy Cepheid. Na

końcu tego rozdziału Autorka przedstawiła odpowiednio dobrane do analizy danych metody statystyczne.

Kolejny rozdział zawiera Wyniki (str. 44-73), które lek. Magdalena Izycka przedstawiła w postaci opisowej, a szczegółowe dane liczbowe i wyniki analiz statystycznych zamieściła w 17 tabelach i na 13 wykresach. Materiał graficzny jest bardzo starannie wykonany i ilustruje wyniki badań.

Czynniki ryzyka występowania nosicielstwa przed hospitalizacją Doktorantka badała u 131 osób, z tym że pełne dane kliniczne i mikrobiologiczne uzyskała od 115 osób i na podstawie tych danych analizowała czynniki ryzyka nabywania nosicielstwa w oddziale i dalsze konsekwencji po wypisie ze szpitala. Doktorantka wykazała, że 16,6% pacjentów włączonych do badania było skolonizowanych *C.difficile* przy przyjęciu, a u 9,4% stwierdzono nosicielstwo nabyte w trakcie hospitalizacji. W kolejnych badanych okresach, obserwowano narastanie odsetka nosicieli z 8,8% do 38,7%. Stwierdziła, że ważnymi czynnikami ryzyka nabycia nosicielstwa *C.difficile* przed hospitalizacją były choroby układu oddechowego, zespół zależności alkoholowej, marskość wątroby. Ryzyko nosicielstwa zwiększało się przy leczeniu przeciwdrobnoustrojowym, glikokortykosteroidami, czy probiotykami. Doktorantka obserwowała zwiększoną szansę nabycia nosicielstwa przy przyjmowaniu leków przeciwdrobnoustrojowych. Ciekawym spostrzeżeniem było wykazanie, jak ważne są warunki lokalowo-sanitarne w szpitalu, gdyż hospitalizacja w salach co najmniej 3-osobowych zwiększała ryzyko nabycia nosicielstwa. Istotna w nabywaniu nosicielstwa była też liczba leków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych przed przyjęciem do szpitala, natomiast przyjmowanie metronidazolu istotnie statystycznie zwiększało szansę nosicielstwa. Oznaczając toksynotwórczość szczepów *C. difficile*, Doktorantka wykazała 3-krotnie większą liczbę szczepów toksynotwórczych do nietoksynotwórczych, a przeważały szczepy produkujące toksynę B (75%), u tylko 2 osób stwierdzono kolonizację szczepem hiperepidemicznym. Doktorantka kontaktowała się z pacjentami, u których stwierdzono nosicielstwo *C. difficile* po zakończeniu hospitalizacji i u tych osób oraz członków ich rodzin nie występowały objawy świadczące o zakażeniu. Doktorantka zbadała także łącznie 40 lekarzy i pielęgniarek, którzy pracowali na oddziałach, gdzie przebywali objęci tym badaniem pacjenci, lecz nie stwierdzono u nich kolonizacji przewodu pokarmowego *C.difficile*.

W rozdziale Dyskusja (str. 74-98), lek. Magdalena Izycka omówiła wyniki własnych badań i porównała je z wynikami innych autorów. Problematykę zakażenia *C.difficile* i nosicielstwa tej bakterii Doktorantka omówiła na podstawie dostępnego piśmiennictwa z podkreśleniem badań własnych, niezwykle szczegółowo, a zarazem przejrzysto w dwóch podrozdziałach zatytułowanych: (1) nosicielstwo *C.difficile* wśród pacjentów i (2) nosicielstwo *C.difficile* wśród pracowników.

Przedstawiając nosicielstwo wśród pacjentów Doktorantka omówiła częstość jego występowania i czynniki ryzyka, jak: hospitalizacje, leki przeciwdrobnoustrojowe, probiotyki, glikokortykosteroidy, choroby przewlekłe oraz uprzednie zakażenie *C.difficile*, mobilność chorego, konsekwencje nosicielstwa dla pacjenta, wpływ leków, czynniki demograficzne, choroby przewlekłe, konsekwencje nosicielstwa dla rodzin nosicieli, środki zapobiegawcze, jak m.in. izolacja nosicieli i profilaktyka pierwotna nosicielstwa. Omawiając nosicielstwo *C.difficile* wśród pracowników zwróciła też uwagę na zanieczyszczenie dłoni tą bakterią wśród pracowników. Następnie Doktorantka przedyskutowała zanieczyszczenie *C.difficile* w szpitalu, zwracając uwagę na udział w tym odzieży ochronnej, sprzętu i aparatury medycznej oraz zanieczyszczeń pomieszczeń.

Po tym rozdziale lek. Magdalena Łżycka zamieściła kilka rzetelnych informacji dotyczących pewnych ograniczeń badania oraz bardzo ważne – moim zdaniem – podsumowanie. W podsumowaniu rozprawy Doktorantka przedstawiła zalecenia dotyczące konkretnego postępowania w poszukiwaniu nosicieli i wdrażania procedur mających za zadanie zminimalizowanie ryzyka transmisji bakterii w obrębie szpitala. W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka wykazała bardzo dobrą znajomość tematu i opanowanie piśmiennictwa. Należy podkreślić, że zarówno w obszernym wstępie, jak także w Dyskusji, wykazała swobodną umiejętność posługiwania się danymi z piśmiennictwa i konfrontacji własnych wyników badań z wynikami innych autorów.

Lek. Magdalena Łżycka kończy pracę 7 wnioskami (str. 100), które znajdują potwierdzenie w przeprowadzonych badaniach i zawierają odpowiedź na założone cele pracy. I tak, Autorka wnioskuje, że: (1) podstawowym czynnikiem nabycia nosicielstwa *C.difficile* w okresie przed przyjęciem do szpitala jest przyjmowanie antybiotyków i glikokortykosteroidów, (2) stosowanie metronidazolu i karbapenemów zwiększa ryzyko wystąpienia kolonizacji, (3) probiotyki mogą zwiększać ryzyko nosicielstwa, (4) przewlekłe choroby układu oddechowego i zespół zależności alkoholowej są czynnikami ryzyka predysponującymi do wystąpienia kolonizacji przewodu pokarmowego *C.difficile*, a do chorób mogących mieć również wpływ należy marskość wątroby, (5) w trakcie hospitalizacji nie wyodrębniono istotnych czynników ryzyka występowania kolonizacji, (6) wśród nosicieli i członków rodzin mieszkających we wspólnym gospodarstwie domowym nie stwierdzono podwyższonego ryzyka wystąpienia objawów świadczących o zakażeniu *C.difficile* i (7) personel medyczny (lekarze i pielęgniarki) nie należą do grupy podwyższonego ryzyka nabywania nosicielstwa *C.difficile*.

Na końcu pracy Doktorantka zamieściła piśmiennictwo (str. 101-113), które zawiera 170 pozycji głównie pochodzenia zagranicznego, opublikowanych w latach 1935 (poz. 2) do 2020 r., z których większość stanowią pozycje z ostatnich 15 lat. Piśmiennictwo jest bardzo starannie opracowane, cytowane jest w pracy doktorskiej według kolejności omawianego problemu. Dostrzegłem jedną pozycję, która wymaga korekty: poz. 59 – powinno być: Theriot CM, Bowman AA, Young VB. Antibiotic-

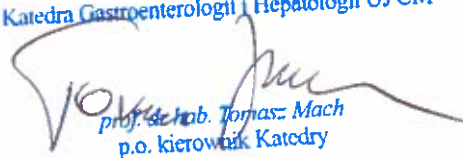
Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for Clostridium difficile Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. mSphere 2016;1(1):e00045-15.doi: 10.1128/mSphere.00045-15.

Oceniana praca doktorska lek. Magdaleny Iżyckiej jest oryginalną pracą badawczą i dotyczy ważnego zagadnienia naukowego, jakim jest zakażenie C.difficile i problematyka epidemiologiczna i kliniczna nosicielstwa tej bakterii. W tej bardzo dobrze, poprawnie zaplanowanej i starannie przeprowadzonej pracy naukowej, Doktorantka przedstawiła dotąd nie badane w warunkach polskich w takim zakresie szeroko zakrojone badania nad nosicielstwem C.difficile. Ten interesujący problem naukowy jest zarazem niezwykle ważny z punktu widzenia poznawczego i klinicznego, a ponadto spostrzeżenia poczynione przez Doktorantkę mają znaczenie aplikacyjne. Doktorantka przedstawiła jasno cel swoich badań, które w pełni zrealizowała, zastosowała w pracy właściwie dobrane współczesne techniki badawcze i poprawnie dobrane testy analizy statystycznej. Praca napisana jest pięknym językiem polskim i czyta się ją z przyjemnością, a wyniki badań są udokumentowane i przedstawione w postaci bardzo dobrze opracowanych tabel i wykresów. Praca doktorska lek. Magdaleny Iżyckiej dowodzi dojrzałości Doktorantki i jej zdolności i umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Po szczegółowym zapoznaniu się z przedstawioną Pracą Doktorską lek. Magdaleny Iżyckiej stwierdzam, że nie wnoszę uwag krytycznych.

Z uwagi na fakt, iż Doktorantka przedstawiła jasno założenia i cel pracy, zastosowała stosowne do tematyki metody badawcze, starannie przeanalizowała wyniki, które poprawnie przedyskutowała z uwzględnieniem licznego i aktualnego piśmiennictwa, a przede wszystkim podkreślając, że badania mają charakter nowatorski i ważne znaczenie aplikacyjne, wnoszą nowe fakty do problematyki epidemiologii nosicielstwa C.difficile, stąd wnioskuje o wyróżnienie Pracy Doktorskiej lek. Magdaleny Iżyckiej

W podsumowaniu uważam, że Rozprawa Doktorska lek. Magdaleny Iżyckiej 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 w związku z powyższym przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Magdaleny Iżyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Gastroenterologii i Hepatologii UJ CM



prof. dr hab. Tomasz Mach
p.o. kierownik Katedry