



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-093 Lublin - ul. W. Chodźki 1
tel./fax: 81 44-86-400, mikrobiologia.lekarska@umlub.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Karpíńskiego

**pt. „ Charakterystyka wybranych cech fenotypowych i genotypowych szczepów
Clostridium difficile izolowanych z ognisk epidemicznych w Polsce”**

**wykonanej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

**pod kierunkiem promotora - prof. dr hab. n. med. Hanny Pituch
promotora pomocniczego – dr n. med. Piotra Obuch-Woszczatyńskiego**

Clostridium difficile, obecnie w wyniku reklasyfikacji określany jako *Clostridioides difficile* jest ważnym ludzkim patogenem biegunek poantybiotykowych, których dynamiczny wzrost przypadków obserwuje się w ostatnich latach. To zwiększające się znaczenie patogene C. *difficile* ma bezpośredni związek ze stosowaną powszechnie antybiotykoterapią oraz wzrostem populacji osób w podeszłym wieku, z obniżoną odpornością, obarczonych chorobami współistniejącymi, co ma szczególne znaczenie w niebezpiecznym przebiegu zakażenia, zagrażającym życiu. Ważną rolę w patogenezie zakażeń mają szczególnie szczepy hiperwirulentne, którym przypisuje się główną rolę w ciężkim przebiegu zakażenia, a ich rozprzestrzenianie się w środowisku szpitalnym stanowi bardzo poważne zagrożenie epidemiczne dla pacjentów hospitalizowanych. Analiza występujących cech wirulencji powiązanych z patomechanizmem zakażenia oraz korelacji właściwości, które mają znaczenie w trudnej eradykacji tych przetrwalnikujących beztlenowych laseczek są obecnie niestety ważnym elementem badań, które mogą przyczynić się do szerszej charakterystyki występujących w Polsce szczepów hiperwirulentnych. Powiązanie przy tym nowoczesnych

metod analizy molekularnej umożliwiającą identyfikację klonów hiperwirulentnych z szerokim zakresem badań cech fenotypowych analizowanych szczepów daje bardzo ciekawy obraz nowatorskiej analizy izolowanych od chorych szczepów, pochodzących z kilkunastu ośrodków w Polsce.

Temat rozprawy podjęty przez pana mgr Pawła Karpińskiego: „ Charakterystyka wybranych cech fenotypowych i genotypowych szczepów *Clostridium difficile* izolowanych z ognisk epidemicznych w Polsce” jest niezwykle ważny, o dużym znaczeniu epidemiologicznym i klinicznym, a uzyskane wyniki mają charakter nowatorskiego opracowania dotyczącego aktualnej charakterystyki i analizy korelacji cech molekularnych i fenotypowych szczepów hiperwirulentnych występujących w Polsce w różnych ogniskach zakażeń. Okres izolacji badanych szczepów (2011 – 2013) był przełomowy do podjęcia badań izolowanych od chorych *C. difficile* należących do PCR-rybotypów 027 (RT027) i 176 (RT176) dominujących w ogniskach epidemicznych w Polsce. Przeprowadzone analizy mogą być wykorzystane w dalszych badaniach porównawczych w kolejnych latach obejmując nowe pojawiające się w ogniskach zakażeń przez szczepy hiperwirulentnych.

Autor bardzo dobrze przedstawił założenia i cel pracy adekwatnie do podjętej tematyki rozprawy doktorskiej. Rozprawa ma klasyczny układ pracy eksperymentalnej. Składa się z 9 rozdziałów, które zawierają Wstęp, Założenia i Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Aneks, Piśmiennictwo, z dołączoną kopią Zgody Komisji Bioetycznej oraz Spisem tabel i rycin, Streszczenie w języku polskim i angielskim. Autor umieścił również wykaz użytych skrótów w pracy. Praca liczy 134 strony. Piśmiennictwo (187 pozycji) obejmuje szeroki zakres publikacji, bardzo dobrze korelujących w rozprawie z tematyką badań poddawanych analizie, uwzględniające najnowsze teksty źródłowe z ostatnich lat.

Już na wstępie Autor wykazała się bardzo szeroką wiedzą w zakresie podjętego tematu rozprawy i charakterystyki szczepów *C. difficile*. Wprowadza w teoretyczne podstawy zakresu zaplanowanych badań realizowanych w części doświadczalnej. Opisane czynniki wirulencji *C. difficile*, ryzyka i epidemiologia zakażeń, są bardzo dobrym logicznym wprowadzeniem w konieczność analizy cech fenotypowych oraz typowania szczepów metodami biologii molekularnej.

Rozdział Materiały i Metody został przedstawiony w sposób jasny z zachowaniem dokładnego opisy wszystkich etapów przeprowadzonych analiz. Badania obejmowały szczepy pochodzące z 12 zakładów opieki zdrowotnej z pięciu województwach w Polsce. Autor przedstawił dokładnie liczby szczepów klinicznych z uwzględnieniem ich PCR-rybotypu, które były wykorzystywane w różnych etapach części doświadczalnej pracy. I w zależności od zakresu doświadczeń użyte były odpowiednio 85, 66, 58, 50, 46 czy 12 (w badaniu wpływu subinhibicyjnych stężeń metroimidazolu) czy wybrane 4 szczepy w analizie z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. W pracy zostały też wykorzystane szczepy wzorcowe i kontrolne. Opis stosowanych w rozprawie metod badawczych wskazuje na szerokie możliwości praktyczne Doktoranta. Są bardzo dokładnie opisanymi etapami badań z uwzględnieniem warunków ich przeprowadzenia, szczegółowych danych (tabele i ryciny), popartych źródłami z piśmiennictwa, co daje możliwość odtworzenia metodycznego w kontynuowaniu dalszych badań porównawczych.

Również bardzo pozytywnie oceniam otrzymane przez Doktoranta Wyniki badań. Ich uzyskanie wymagało ogromnej pracy, bardzo dobrej organizacji wykonywania kolejnych etapów doświadczeń, opanowanego warsztatu badawczego i głębokiej wiedzy umożliwiającej ich prawidłową analizę, do której również zostały wykorzystane metody statystyczne. Już w pierwszej części przedstawionych wyników badań, Autor potwierdza ustalenie Toksynotypu izolatów pochodzących od chorych, należących do szczepów hiperwirulentnych (RT027 oraz RT176). Przetrwalniki tych szczepów oraz RT023 wykazywały oporność na podwyższoną temperaturę. Dopiero temperatura 90°C eliminowała skutecznie formy przetrwalne, co jest cenną informacją wobec potencjalnej możliwości niewłaściwej obróbki termicznej żywności, która spożywana jako skontaminowana przez *C. difficile* może stać się przyczyną zakażeń. Duża ruchliwość szczepów (obecność wici) jako jedna z cech wirulencji bakterii została zaobserwowana również w przypadku (RT027 i RT176) i RT023, co może mieć bezpośredni wpływ na patomechanizm zakażenia wynikający z możliwości aktywnego penetrowania środowiska w organizmie chorego w obrębie ogniska zakażenia. Cecha ta została przeanalizowana wobec determinant genowych, które wskazują na jej powiązanie z genem *fliC*. W rozprawie został po raz pierwszy opisany wzór restrykcyjny genu *fliC* polskich szczepów epidemicznych i RT023. Natomiast w przypadku genu *fliD* w polskich szczepach Autor stwierdził prawdopodobieństwo występowania zmiany w sekwencji genu kodującego białko FliD, co nie ma wpływu na ruchliwość szczepów.

Ciekawym zakresem wykonanych badań było określenie pokrewieństwa i klonalności badanych szczepów metodą MLVA. W wyniku analizy stwierdzono występowanie 5 kompleksów klonalnych RT027 pochodzące z różnych szpitali i co jest istotne, z różnych rejonów geograficznych. Dwa kompleksy klonalne zostały wykryte w wyniku analizy RT176. Równie ciekawym wynikiem badań było stwierdzenie braku całego locus A6Cd dla 7 szczepów RT023, co jak wskazuje autor wymaga dalszych analiz na szerszej grupie szczepów również z innych krajów. RT023 pochodzące z ośrodków polskich posiadają jeden kompleks klonalny. Analizę uzupełniono o graficzne opracowanie w postaci drzew rozpinających (MST). W ramach metody RFLP powiązано również klony szczepów z odpowiednią grupą, co w rezultacie pozwoliło na zakwalifikowanie czterech klonów RT027 i dwóch klonów RT176 do grupy VII RTFLP i jeden klon RT023 do grupy XI.

W patogenezie zakażenia *C. difficile* istotne znaczenie ma zdolność wytwarzania biofilmu przez szczepy szczególnie hiperwirulentne. W przeprowadzonych badaniach Autor stwierdził tę cechę na najwyższym poziomie w przypadkach RT027. W efekcie terapeutycznym antybiotykoterapii analiza wpływu na wytworzony biofilm dawek subinhibicyjnych metronidazolu ($\frac{1}{4}$ i $\frac{1}{2}$ MIC) jest kluczowa w ocenie jej skutków. Wprawdzie wszystkie badane szczepy wytwarzały większy biofilm, ale niepokojącym rezultatem badań było stwierdzenie działania stymulującego $\frac{1}{2}$ dawki MIC metronidazolu na RT027 prowadząc do zwiększenia produkcji biofilmu. Jest to bardzo ważna informacja, która może tłumaczyć niepowodzenia terapeutyczne w stosowaniu subinhibicyjnych dawek podczas antybiotykoterapii, co może skutkować poprzez zwiększenie masy biofilmu potencjalnym zaostreniem się infekcji. Ciekawym rozszerzeniem badań w tym zakresie była analiza obrazu powstającego biofilmu i wpływu dawek subinhibicyjnych na podstawie analizy obrazu w mikroskopie konfokalnym jako rzutu trójwymiarowego i przestrzennego ukośnego jego obrazu. W pracy po raz pierwszy opisano cechy biofilmu wytwarzanego aż przez 50 szczepów *C. difficile* zawierających hiperwirulentne, należące do różnych PCR-rybotypów.

Przedstawiona dyskusja i wnioski bardzo dobrze korelują z uzyskanymi wynikami badań. Rozprawa doktorska jest bardzo wartościowym opracowaniem, które jest wynikiem nowatorskich badań szczepów izolowanych w Polsce od chorych z zakażeń *C. difficile*, z różnych ośrodków ZOZ.

W przedstawionych siedmiu kluczowych wnioskach, Doktorant podkreślił wykrytą wyższą termorezystencję przetrwalników hiperwirulentnych RT027, RT176 i RT023, co w

powiązaniu z większą ruchliwością stwarza większe możliwości rozprzestrzeniania się epidemicznego i ekspansji w postaci rozwijającej się infekcji w organizmie człowieka. Cechy te w połączeniu z działaniem indukcyjnym na tworzenie biofilmu subinhibicyjnych dawek metronidazolu dają bardzo ważny aspekt analizy niepowodzeń terapeutycznych w leczeniu zakażenia *C. difficile*. Badań takich nie przeprowadzono wcześniej. Również ważnym elementem badań jest analiza molekularna izolatów, stwierdzenie ich klonalnego rozprzestrzeniania się, a uzyskanie po raz pierwszy wzorów restrykcyjnych genów *fliC* (RT027) wskazało na ich większą różnorodność genetyczną.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, iż przedstawiona mi do oceny Rozprawa doktorska pana mgr Pawła Karpińskiego jest oryginalną pracą o ważnych aspektach naukowych i praktycznych, obejmującą nowatorskie badania, które mogą być pomocne w przeprowadzeniu dalszych analiz innych izolatów *C. difficile* pochodzących z zakażeń u ludzi, dając możliwość zastosowania do szerszych badań porównawczych np. innych antybiotyków (ich dawek subterapeutycznych) w analizie przypadków niepowodzeń terapeutycznych.

Doktorant zaprezentował szeroką wiedzę w zakresie podjętego tematu rozprawy, wykazał się ogromnym wkładem pracy podczas wykonywania badań, i to ramach badań molekularne (z zastosowaniem nowoczesnych technik badawczych) i fenotypowych, które wymagały również bardzo dobrego przygotowania praktycznego oraz wiedzy umożliwiającej właściwą ich interpretację. W mojej opinii ważne jest również widoczne bardzo duże zaangażowanie Doktoranta do dalszego prowadzenia badań, które będą podstawą nowych tematów badawczych i opracowania manuskryptów, jak zapowiada. Ciekawa jestem - jaki zakres dalszych badań dotyczących *C. difficile* planuje doktorant kontynuować?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji, - mgr Pawła Karpińskiego - „Charakterystyka wybranych cech fenotypowych i genotypowych szczepów *Clostridium difficile* izolowanych z ognisk epidemicznych w Polsce”,

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).

- w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Pawła Karpińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Jednocześnie ze względu na wagę podjętego tematu oraz szeroki zakres przeprowadzonych badań i ich nowatorski charakter w ważnym aspekcie epidemiologicznym, klinicznym i poznawczym - zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Alina M. Olender

Lublin 20.11.2020