

Warszawa 2.11.2020

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Pawła Karpińskiego

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Pawła Karpińskiego została wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem i opieką naukową Pani prof. dr hab. Hanny Pituch. Promotorem pomocniczym rozprawy był dr n. med. Piotr Obuch-Woszczatyński.

Tematyka rozprawy doktorskiej Pana mgr. Pawła Karpińskiego jest kontynuacją badań realizowanych od wielu lat przez zespół Pani prof. Hanny Pituch, między innymi w projekcie NCN „Ocena sytuacji epidemiologicznej zakażeń *Clostridium difficile* w Polsce na podstawie dystrybucji PCR-rybotypów oraz wzorów lekowrażliwości szczepów izolowanych w latach 2010-2013”.

*Clostridium difficile* jest przyczyną poantybiotykowego, rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego (CDI). Na początku XXI wieku za wzrost zapadalności na tę chorobę odpowiadało między innymi pojawienie się i szybkie rozprzestrzenianie epidemicznego szczepu NAP1 (North American Pulsed Field Type 1) - inaczej PCR rybotypu 027 (B1/NAP1/027), powodującego zarówno szpitalne ogniska epidemiczne jak i regionalny wzrost zachorowalności. Szczep epidemiczny, hiperwirulentny BI/NAP1/027 ze względu na liczne mutacje w obrębie genomu charakteryzuje się zwiększonym wytwarzaniem toksyn A i B, produkcją dodatkowej binarnej toksyny, większą zdolnością do tworzenia spor, wysoką opornością na fluorochinolony, szybszym rozprzestrzenianiem się w środowisku szpitalnym i powodowaniem zakażeń o

znacznie cięższym przebiegu klinicznym. Epidemiczne rozprzestrzenianie się szczepu NAP1 początkowo opisano w 2002 roku w Kanadzie i USA, następnie w Wielkiej Brytanii, Francji, Holandii, Belgii co spowodowało w niektórych szpitalach w tych krajach kilkakrotne zwiększenie zapadalności na CDI. W Polsce pierwszy szczep RT027 wyizolowano w 2005 roku. W latach 2012-2013 wskaźnik zapadalności na CDI w Polsce był wyższy niż średnia europejska i wynosił 8,3/10.000 osobodni. Badania przeprowadzone w Europie w ramach projektu o akronimie *ClosER* (*Clostridium difficile* European Resistance) wykazały, że Polska znajduje się w grupie krajów z najwyższym procentowym udziałem wielolekoopornych szczepów *C. difficile*. Szczepy wyizolowane w czasie trwania ognisk epidemicznych w Polsce nie były jednak jak dotąd szczegółowo scharakteryzowane pod względem cech fenotypowych i genotypowych. Tego ważnego zadania podjął się Pan mgr Paweł Karpiński w swojej pracy doktorskiej.

Przedstawiona do oceny praca doktorska ma klasyczny, typowy układ dla tego typu rozpraw. Tytuł rozprawy prawidłowo oddaje poruszaną tematykę badawczą. Rozprawa ma formę liczącą 134 strony maszynopisu. Rozpoczyna się spisem 22 tabel oraz 31 rycin, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

W rozdziale zatytułowanym WSTĘP doktorant przedstawił czynniki wirulencji *C. difficile*, czynniki ryzyka wystąpienia choroby, epidemiologię zakażeń, krótką charakterystykę szczepów *C. difficile* o określonym rybotypie występujących w Polsce, metody typowania szczepów z zastosowaniem różnych metod biologii molekularnej oraz diagnostykę zakażeń, leczenie i profilaktykę zakażeń *C. difficile*. Wstęp jest napisany bardzo dobrze w oparciu o aktualne źródła piśmiennictwa z tej dziedziny.

W następnym rozdziale doktorant zaprezentował założenia oraz szczegółowe cele swojej pracy. Nie mam wątpliwości, że cele zostały postawione prawidłowo i miały na celu scharakteryzowane pod względem cech fenotypowych i genotypowych szczepów *C. difficile* wyizolowanych w Polsce. Na uwagę zasługuje fakt, że oprócz „hiperwirulentnych” szczepów należących do PCR-rybotypów 027 (RT027) i 176 (RT176) badaniami objęte zostały również szczepy należące do PCR-rybotypu RT023, których status jako „hiperwirulentny” nie do końca jest ustalony, z powodu niekompletnych danych klinicznych. Jak napisał doktorant, „Polskie szczepy nie zostały opracowane pod względem cech ułatwiających kolonizację przewodu

pokarmowego, jak też przetrwanie w środowisku szpitalnym, takich jak odporność spor na temperaturę, ruchliwość oraz tworzenie biofilmu pod wpływem leków przeciw CDI”. Trzeba podkreślić, że w pracy podjęto się określenia zmienności tych szczepów, w oparciu o inne cele niż tylko region wysokiej zmienności tzw. PaLoc tj. badanie genów kodujących białka rzęsek (flagelina) oraz genu białka powierzchniowego *slpA* warunkującego adhezję. Zastosowanie metody MLVA umożliwiło z kolei określenie podobieństwa genetycznego „hiperwirulentnych” szczepów występujących w Polsce.

W rozdziale Materiały i Metody doktorant precyzyjnie opisał metodologię przeprowadzenia badań. Materiałem do badań były szczepy *C. difficile* zgromadzone w trakcie trwania przeglądu epidemiologicznego przeprowadzonego w Polsce w latach 2011-2013. Badaniami objęto w szczególności szczepy określane jako epidemiczne („hiperwirulentne”), należące do RT027 i blisko spokrewnionego z RT027 – RT176, izolowane w trakcie trwania ognisk epidemicznych oraz „prawdopodobnie hiperwirulentne” RT023. Należy tylko żałować, że w badaniach nie uwzględniono szczepów wyizolowanych w późniejszym okresie. Dodanie do kolekcji nowszych izolatów pozwoliło by nadać pracy bardziej aktualny charakter. Należy także zauważyć, że szczepy pochodziły tylko z pięciu województw i niekoniecznie muszą charakteryzować wszystkie szczepy *C. difficile* wywołujące ogniska epidemiczne w kraju. Na pochwałę zasługuje dokładność opisu szczepów, użytych metod, podłoży czy też nawet wykorzystanej aparatury. Mam jednak kilka pytań odnośnie tej części rozprawy. Badanie ruchliwości i wrażliwości na temperaturę zostało przeprowadzone na stosunkowo dużej liczbie 85 szczepów klinicznych, badanie zdolności wytwarzania biofilmu na 50 szczepach a badanie wpływu subinhibicyjnych stężeń metronidazolu na tworzenie biofilmu tylko na 12 szczepach klinicznych. Nasuwa się pytanie z czego wynikają tak duże różnice w liczbie użytych szczepów i jakie było kryterium doboru szczepów do badania poszczególnych cech fenotypowych. Kolejne pytanie dotyczy badania zdolności wytwarzania biofilmu przez szczepy *C. difficile* w którym zastosowano pomiar absorbancji przy użyciu czytnika mikroplitek przy długości fali 620 nm. Czy podane przedziały wartości absorbancji charakteryzujące zdolność do wytwarzania biofilmu zostały dobrane arbitralnie czy też wynikają z innych przesłanek ewentualnie z danych podanych w piśmiennictwie? W pracy zbadano również wpływ

subinhibicyjnych stężeń metronidazolu na biofilm wybranych szczepów *C. difficile* należących do różnych PCR-rybotypów. Czy nie byłoby wskazane, oprócz metronidazolu, zbadać także wpływ wankomycyny na tworzenie biofilmu przez te szczepy? W końcu, jak podaje sam Doktorant, metoda MLVA według niektórych badaczy nie jest wystarczająca do różnicowania szczepów *C. difficile*. Dlaczego więc wybrano tę metodę a nie zastosowano innych technik takich chociażby jak PFGE? Sporym ograniczeniem pracy jest również mała liczebnie grupa szczepów RT027 z niektórych szpitali co niewątpliwie utrudniło badanie klonalności.

Uzyskane wyniki przedstawiono bardzo starannie i obszernie zarówno opisowo jak też przy użyciu licznych tabel i rycin. Na uwagę zasługuje duża dokładność i rzetelność prezentacji świadczącej o dużym wkładzie pracy doktoranta w przeprowadzenie analizy wyników. W swojej pracy mgr. Paweł Karpiński wykazał, że najbardziej odporne na wysoką temperaturę były przetrwalniki szczepów RT027, RT176 oraz RT023. Największą ruchliwość w obydwu metodach wykazywały szczepy RT023 a szczepy RT17 i RT046 były mniej ruchliwe lub stwierdzono brak ruchu. W przypadku badania szczepów RT027 stwierdzono nie tylko wytwarzanie największej masy biofilmu ale również zaobserwowano wzrost biofilmu w obecności 1/2 MIC metronidazolu. Co ciekawe, w przypadku pozostałych rybotypów metronidazol w stężeniu 1/2MIC i 1/4MIC hamował wzrost biofilmu. W dalszych badaniach wykazano dwie grupy RFLP genu *fliC* szczepów RT027 tj. VII i X (do tej pory nieopisaną) oraz jeden wzór dla RT176 (VII) oraz jeden wzór (XI) dla szczepów RT023. W przypadku genu *slpA* wykazano jedną grupę RFLP (szczepy RT027 i RT176). Na koniec, stwierdzono klonalne szerzenie się szczepów epidemicznych. Wykryto pięć klonów szczepów RT027, dwa klony RT176 oraz jeden klon RT023. Ciekawym spostrzeżeniem jest brak w epidemicznych szczepach RT 027 i RT176 wyizolowanych w Polsce fragmentu genu *fliD* kodującego białko czapeczki FliD, strukturalnego białka niezbędnego do pełnego funkcjonowania flagelli. Według niektórych autorów białko to jest konieczne aby szczepy *C. difficile* posiadały zdolność ruchu. Doktorant sugeruje, że prawdopodobnie w polskich szczepach występuje zmieniona sekwencja fragmentu genu kodującego to białko. Spostrzeżenie to jest niewątpliwie warte dalszych badań a uzyskane wyniki na pewno wzbogacą wiedzę o szczepach wywołujących w Polsce ogniska epidemiczne.

Nie mam większych zastrzeżeń dotyczących przedstawionych w tej części pracy wyników. Wszystkie opisane rezultaty mają charakter doniesień oryginalnych a ich dokumentacja nie budzi zastrzeżeń. Mam jednak szczegółowe pytanie dotyczące dwóch szczepów rybotypu 027 oznaczonych w tabeli 21 jako nr 1 i 2, które charakteryzowały się zdecydowanie największą, ocenioną na cztery plusy, zdolnością wytwarzania biofilmu. Czy te konkretne dwa szczepy charakteryzowała także istotnie wyższa, niż innych szczepów tego samego rybotypu, podatność na subinhibicyjne stężenia metronidazolu na tworzenie biofilmu oraz wyższa ruchliwość? Jeśli tak czy szczepy te według Doktoranta mogą różnić się także pod względem genetycznym od innych szczepów rybotypu 027?

Przedstawione w rozprawie wyniki zostały szczegółowo omówione oraz porównane z wynikami innych autorów w rozdziale DYSKUSJA. Rozdział ten został przedstawiony inteligentnie i logicznie co świadczy o dużej dojrzałości naukowej Pana mgr. Pawła Karpińskiego oraz dobrej znajomości omawianej problematyki. Dyskusja podparta jest bardzo bogatym przeglądem piśmiennictwa, który należy uznać za aktualny i reprezentatywny dla tematyki badawczej.

Na zakończenie swojej rozprawy Doktorant sformułował 7 wniosków. Wnioski, aczkolwiek bardzo ogólne, należy uznać za uprawnione i poparte wynikami badań.

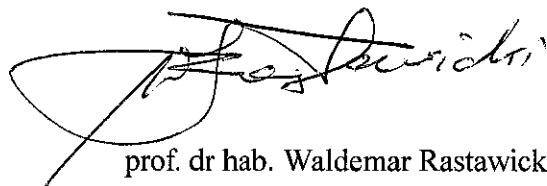
W podsumowaniu należy stwierdzić, że praca Doktoranta pod merytoryczną opieką Pani prof. Hanny Pituch oraz możliwość korzystania z jej doświadczenia oraz bogatego warsztatu badawczego, zaowocowały rozprawą doktorską o wysokim poziomie naukowym i o dużych walorach poznawczych. Przedstawiona do oceny rozprawa na stopień naukowy doktora, autorstwa Pana mgr. Pawła Karpińskiego, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dotyczącego ważnej kwestii jaką jest charakterystyka pod względem cech fenotypowych i genotypowych szczepów *C. difficile* wyizolowanych w Polsce.

Uważam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003. 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 roku. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.) i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk

medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr. Pawła Karpińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę zakres prowadzonych badań oraz wartość naukową uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Warszawa 2.11.2020



prof. dr hab. Waldemar Rastawicki