

**mgr Paweł Karpiński**

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

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Hanna Pituch

Promotor pomocniczy: dr n. med. Piotr Obuch-Woszczatyński

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

 

## STRESZCZENIE

### Charakterystyka wybranych cech fenotypowych i genotypowych szczepów *Clostridium difficile* izolowanych z ognisk epidemicznych w Polsce

**Wprowadzenie.** *Clostridium difficile* należy do najważniejszych patogenów szpitalnych XXI wieku. Jedną z przyczyn wzrostu zakażeń *C. difficile* było pojawienie się szczepów „hiperwirulentnych” (inaczej epidemicznych; określenia używane zamiennie) PCR-rybotyp 027 (RT027) i bliskospokrewniony RT176. Dodatkowo w Polsce występuje RT023 „prawdopodobnie” hiperwirulentny. Polskie szczepy epidemiczne były w małym stopniu scharakteryzowane.

**Cele pracy:** Głównym celem było scharakteryzowanie wybranych cech fenotypowych i genotypowych szczepów *C. difficile* izolowanych w czasie trwania ognisk epidemicznych w Polsce. Celami szczegółowymi były: 1. Ocena wrażliwości spor na wysoką temperaturę i zdolności ruchu szczepów epidemicznych i porównanie z innymi PCR-rybotypami (RT). 2. Ocena zdolności wytwarzania biofilmu przez szczepy epidemiczne i porównanie z innymi RT. 3. Wykazanie wpływu subinhibicyjnych stężeń metronidazolu (subMIC) na wzrost biofilmu *C. difficile*. 4. Ustalenie wzorów restrykcyjnych wybranych genów warunkujących adhezję i ruch bakterii szczepów epidemicznych. 5. Ocena pokrewieństwa i klonalnego szerzenia się szczepów epidemicznych.

**Nowatorski aspekt pracy.** Wykazanie, że szczepy epidemiczne RT027, RT176 oraz RT023 wykazują podobieństwo pod względem wysokiej termorezystencji i ruchliwości. Opisanie po raz pierwszy wzorów restrykcyjnych genu *fliC* polskich szczepów epidemicznych i RT023. Wykrycie nowego typu restrykcyjnego RFLP w szczepach RT027 oraz RT023, nie opisanych wcześniej. Wykazanie po raz pierwszy w Polsce klonalnego szerzenia się szczepów epidemicznych. Opracowanie dużej grupy szczepów o różnym RT pod względem zdolności wytwarzania biofilmu oraz wykazanie wpływu subinhibicyjnych stężeń metronidazolu na zwiększenie masy biofilmu zarówno przez szczepy epidemiczne jak i inne RT.

**Material i metody.** Do badań użyto szczepów: RT027 (n=41), RT176 (n=17) oraz RT023 (n=8), a do celów porównawczych o innym PCR-rybotypie: RT017 (n=9) i RT046 (n=10). PCR-toksynotyp RT027 i RT176 określono metodą RFLP-PCR-toksynotypowanie (RFLP-PCR-toxinotyping). Zbadano wpływ wysokiej temperatury (w zakresie 60°C-100°C) na przeżywalność przetrwalników *C. difficile*, ogrzewając je w danej temperaturze, a następnie posiewając na pożywkę. Ruchliwość szczepów *C. difficile* badano z zastosowaniem dwóch metod tj. wkłucia bakterii w słupek agaru półpłynnego i posiewu bakterii miarową eżą na

AW  
Dawid

pożywkę półstałą. Wzory restrykcyjne genów *fliC* i *slpA* szczepów *C. difficile* określono na podstawie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP-restriction fragments length polymorphism). Ocenę klonalnego szczyżenia się szczepów RT027, RT176 i RT023 zbadano metodą Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). Zdolność tworzenia biofilmu zbadano u 50 losowo wybranych szczepów. Założono hodowlę w jałowych, polistyrenowych, 96-studzienkowych, płytkach titracyjnych i inkubowano w temp. 37°C przez 48 godz. Wytworzony biofilm wybarwiono z użyciem 1% roztworu fioletu krystalicznego. Po ekstrakcji 96% alkoholem etylowym, dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 620 nm. Istotność statystyczną różnic w wielkości wytworzonego biofilmu ustalono testem ANOVA Kruskala-Wallisa ( $p < 0,01$ ). Wpływ subinhibicyjnych stężeń metronidazolu (1/4MIC i 1/2MIC) na wzrost biofilmu losowo wybranych szczepów: RT027 (n=3), RT176 (n=4), RT023 (n=2) i dla porównania RT017 (n=3) zbadano zakładając hodowlę biofilmu bez metronidazolu i z metronidazolem metodą opisaną powyżej. Wpływ subMIC metronidazolu na biofilm wybranych szczepów oceniono z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej laserowej.

**Wyniki.** Wykazano, że najbardziej odporne na wysoką temperaturę były przetrwalniki szczepów należących do RT027 i RT176 oraz RT023, z których odpowiednio 6,6%, 21,1% i 11,1% przeżywała temperaturę 85°C i ginęła dopiero w temp. 90°C. Stwierdzono, że 100% szczepów RT027, RT176 i RT023 była ruchliwa. Szczepy RT023 wykazywały największą ruchliwość ( $p < 0,01$ ). Szczepy RT17 i RT046 były mniej ruchliwe lub stwierdzono brak ruchu. Szczepy RT027 wytwarzały większą masę biofilmu niż inne RT ( $p < 0,05$ ). Tylko w przypadku szczepu RT027 nastąpił wzrost biofilmu w obecności 1/2MIC metronidazolu, co zaobserwowano zakładając biofilm na płytkach titracyjnych. W przypadku pozostałych RT metronidazol w stężeniu 1/2MIC i 1/4MIC hamował wzrost biofilmu. Natomiast masa biofilmu zarówno szczepów RT027, RT176, RT023 jak i RT017 zwiększyła się pod wpływem 1/2MIC i 1/4MIC jeśli zastosowano metodę hodowli na szklanych szalkach. Szczep RT027 wytworzył największą masę biofilmu. Biofilm w porównaniu do RT176, RT023 i RT017 był grubszy, z nieregularną warstwą biologiczną, o wysokiej architekturze 3D, zawierający liczne mikroagregaty. Wykazano dwie grupy RFLP genu *fliC* szczepów RT027 tj. VII i X (do tej pory nieopisaną) oraz jeden wzór dla RT176 (VII) oraz 1 wzór (XI) dla szczepów RT023 (również do tej pory nieopisany). W przypadku genu *slpA* wykazano jedną grupę RFLP (szczepy RT027 i RT176). Stwierdzono klonalne szerzenie się szczepów epidemicznych. Wykryto pięć klonów szczepów RT027, dwa klony RT176 oraz jeden klon RT023.



**Sformulowano następujące wnioski:** 1. Wyższa termorezystencja przetrwalników szczepów RT027, RT176 i RT023 *C. difficile* niż innych RT, może mieć wpływ na większą ich przeżywalność i transmisję w środowisku szpitalnym; 2. Obróbka termiczna może być nieskuteczna w niszczeniu przetrwalników *C. difficile*, co wskazuje na potrzebę zintensyfikowania badań mających na celu wyjaśnienie znaczenia tego zjawiska w rozprzestrzenianiu się szczepów *C. difficile*. 3. Większa ruchliwość szczepów RT027, RT176 i RT023 w porównaniu do innych RT, może ułatwiać im ekspansję w środowisku przewodu pokarmowego; 4. Wytwarzanie większego biofilmu *in vitro* przez szczepy RT027, w porównaniu do innych RT, może utrudniać eradykację w trakcie leczenia, ale wymaga to potwierdzenia *in vivo*; 5. Wzrost biofilmu, wykazany na przykładzie wybranych szczepów *C. difficile* pod wpływem działania sub-inhibicyjnych stężeń metronidazolu (MZT), może być jednym z powodów niepowodzeń terapeutycznych w leczeniu pacjentów z CDI z użyciem MZT; 6. Obecność dwóch wzorów restrykcyjnych genów *fliC* wskazuje na większą różnorodność genetyczną polskich szczepów RT027 w porównaniu do RT176 i RT023 w obrębie badanej grupy; 7. Szczepy epidemiczne mogą szerzyć się w Polsce klonalnie.

**Podsumowanie.** Szczepy epidemiczne („hiperwirulentne”) cechują się szczególnymi właściwościami fenotypowymi i genotypowymi, ułatwiającymi im przeżywalność w środowisku szpitalnym. Uzyskane wyniki mają znaczenie praktyczne i mogą być wykorzystane do skutecznej walki z CDI w Polsce.

Prof. Hanna Jitka

akceptuję

15.09.2020

Włoszczyńska

Korpiński