

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Prof. dr hab. n. med. Hanna M. Pituch
hanna.pituch@wum.edu.pl

Warszawa, dn. 05. 03. 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Edyty Waker

**pt. „Analiza zmienności genetycznej toksynotwórczych szczepów *Clostridioides difficile*
w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego na przestrzeni 10 lat”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu Pani mgr Edyty Waker pt. „Analiza zmienności genetycznej toksynotwórczych szczepów *Clostridioides difficile* w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego na przestrzeni 10 lat” powstała w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej i Zakładzie Genetyki, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie, pod kierunkiem Pana Profesora dr hab. n. med. Jerzego Ostrowskiego.

Rozprawa doktorska dotyczy zmienności genetycznej beztlenowej laseczki *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) którą odkryto 85 lat temu. Ten niezwykle patogen w ciągu kilkudziesięciu lat ewoluował z poziomu bakterii o niskim potencjale patogenności do superbakterii, która w dobie pandemii COVID-19 stała się jeszcze większym obciążeniem szpitali i wyzwaniem dla klinicystów i diagnostów laboratoryjnych.

Od 2003 roku wzrost przypadków CDI wiązany jest z pojawieniem się nowej odmiany genetycznej szczepów tzw. NAP1/BI/027, określanych jako „hiperwirulentne”. Szczepy te posiadają znacznie podwyższony potencjał toksynotwórczości i wykazują wielolekooporność, w tym oporność na fluorochinolony, makrolidy i karbapenemy oraz mogą mieć obniżoną wrażliwość na metronidazol. Wyniki ostatnich badań (projekt COMBACTE-CDI) na obszarze Unii Europejskiej potwierdzają, że Polska nadal należy do krajów (obok Rumunii i Słowacji) o najwyższym wskaźniku zapadalności z powodu CDI. Jednocześnie stosunkowo rzadko podejmowana jest diagnostyka mikrobiologiczna, w porównaniu do innych krajów europejskich, co prawdopodobnie wpływa na rozprzestrzenianie się i wysoki odsetek szczepów „hiperwirulentnych” występujących w naszym kraju.

WARSZAWSKI UNIwersYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej była ocena zmienności genetycznej toksynotwórczych szczepów *C. difficile* izolowanych od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie, na przestrzeni 10 lat z użyciem całogenomowego sekwencjonowania. Klinika ta miała najwyższy odsetek zakażeń *C. difficile* w badanym okresie, co uzasadnia jej wybór przez Doktorantkę.

Praca doktorska napisana została w języku polskim i obejmuje 70 stron tekstu komputerowego, w tym zawiera 5 rycin i 7 tabel, w tym dwie tabele (ponumerowane jako tab. 1 i tab. 2) Doktorantka zamieściła w części stanowiącej „Suplement”.

Uwaga: Tabela 4 jest wg kolejności w pracy Tabelą 3 a Tabela 7 jest Tabelą 5.

Praca w swojej konstrukcji posiada typowy układ. Rozprawa składa się z następujących rozdziałów: *Wstęp, Cel pracy, Metodyka, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Suplement*. Praca ponadto zawiera *Streszczenia* w języku polskim i angielskim. Natomiast brakuje *Wykazu stosowanych skrótów, Spisu rycin i Spisu tabel*, co zazwyczaj wchodzi w zakres tego typu publikacji. Pracę poprzedza *Spis treści*. Całość zakończona jest *Spisem piśmiennictwa* w liczbie 229 pozycji literaturowych. Natomiast praca nie zawiera kopii zgody *Komisji Bioetycznej*.

Wstęp rozprawy doktorskiej obejmuje 10 stron i podzielono go na osiem podrozdziałów zatytułowanych: „Ogólna charakterystyka szczepów *C. difficile*”, „Budowa genetyczna szczepów *C. difficile*”, „Toksynotypy *C. difficile*”, „Elementy mobilne *C. difficile*”, „Epidemiologia *C. difficile*”, „Główne czynniki odpowiedzialne za wystąpienie zakażenia *C. difficile*, niepowodzenia terapeutyczne i nawroty”, „Leczenie zakażeń powodowanych przez *C. difficile*” oraz „Analizy pokrewieństwa filogenetycznego między badanymi szczepami *C. difficile*”. W moim przekonaniu dodatkowy podrozdział poświęcony opisaniu lekowrażliwości populacji szczepów *C. difficile* występujących na świecie oraz podstaw genetycznych wzbogaciłby *Wstęp*. Tym bardziej, że Doktorantka przeprowadziła badanie lekowrażliwości szczepów *C. difficile*, w tym ustaliła podstawy genetycznej oporności.

W oparciu o właściwą literaturę, cytowaną we *Wstępie*, Doktorantka przedstawiła charakterystykę gatunku *C. difficile*, problem nosicielstwa *C. difficile* u ludzi i zwierząt oraz występowanie drobnoustroju w środowisku szpitalnym. Podaje odsetek skolonizowanych zdrowych dorosłych i rezydentów domów opieki długoterminowej. Natomiast nie uwzględniła w tym podrozdziale nosicielstwa u dzieci. W moim przekonaniu część dotycząca epidemiologii powinna być zamieszczona w części zatytułowanej „Epidemiologia *C. difficile*”.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisała budowę genetyczną szczepów *C. difficile*, wskazując na dużą zmienność i plastyczność genomu, co zapewne ma wpływ na zdolności adaptacyjne gatunku i zwiększa wirulencję. Omówiła budowę genetyczną locus patogenności (PaLoc) oraz region kodowania toksyny binarnej. Doktorantka przeanalizowała zjawisko zmienności w regionie PaLoc *C. difficile* i wynikające z tego konsekwencje w postaci zróżnicowanej toksynotwórczości szczepów. Stało się to podstawą do podziału szczepów na 34 toksynotypy.

Pani mgr Edyta Waker podkreśliła znaczenie zjawiska transferu międzygatunkowego regionu PaLoc. W dalszej części zwróciła uwagę na mobilne elementy *C. difficile*, które stanowią aż 11% pangenu *C. difficile*. W szczególności obecność transpozonów jest zjawiskiem niezwykle i ma prawdopodobnie wpływ na sukces *C. difficile* jako patogenu oportunistycznego. W przeciwieństwie do innych laseczek beztlenowych, *C. difficile* posiada nieliczne plazmidy, w tym nowo odkryty plazmid warunkujący oporność na metronidazol, o czym pisze Doktorantka w dalszej części pracy. Ważnym elementem genetycznym *C. difficile* są bakteriofagi, które mogą pośredniczyć w przenoszeniu np. transpozonu Tn6215 (geny oporności na makrolidy, linkozamidy) między szczepami *C. difficile*.

W kolejności Doktorantka w ograniczony sposób opisała epidemiologię CDI, odnosząc się głównie do występowania szczepów „hiperwirulentnych”, a także wymieniła inne źródła pochodzenia *C. difficile* (zwierzęta i produkty żywnościowe pochodzenia zwierzęcego). Zabrakło tutaj istotnych informacji na temat zapadalności z powodu CDI.

W dalszej części *Wstępu* Doktorantka opisała czynniki ryzyka rozwoju CDI oraz przyczyny niepowodzeń terapeutycznych i zjawisko nawrotowości. W podrozdziale dotyczącym postępowania terapeutycznego u chorych z rozpoznaniem CDI, Doktorantka wymieniła leki stosowane w zwalczaniu CDI, zgodnie z rekomendacjami amerykańskich towarzystw Infectious Diseases Society of America (IDSA) i Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Omówiła ponadto metody niekonwencjonalne stosowane do leczenia pacjentów z CDI, jak transfer mikroflory jelitowej od zdrowego dawcy oraz preparaty mające zastosowanie u chorych z grup ryzyka nawrotowości. Ważnym aspektem, o którym pisze Doktorantka, jest opracowanie szczepionki przeciw CDI.

W podrozdziale pt. „Analizy pokrewieństwa filogenetycznego między badanymi szczepami *C. difficile*” Doktorantka poświęciła dużo uwagi technice PFGE, która to technika ma ograniczone zastosowanie do typowania szczepów *C. difficile*, ze względu na problemy techniczne polegające na szybko zachodzącej degradacji DNA i kosztownej procedurze. Opisała metodę szeroko stosowaną w Europie czyli PCR-rybotypowanie i inne jak sekwencjonowanie całego genomu.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Uwagi do Wstępu:

1. podrozdziały „Toksynotypy *C. difficile*” i „Elementy mobilne *C. difficile*” powinny znaleźć się w części pt. „Budowa genetyczna szczepów *C. difficile*”.
2. część dotycząca niepowodzeń terapeutycznych powinna znaleźć się w podrozdziale „Leczenie zakażeń powodowanych przez *C. difficile*”, co logicznie kończyłoby tę część wstępu.
3. Strona 10 - wielkość składowych białek toksyny binarnej to odpowiednio: część enzymatyczna CDTa- 53 kDa i część wiążąca CDTb - 98.8 kDa (zgodnie z danymi Gerding i wsp. poz literaturowa 39).
4. strona 13: Doktorantka pisze, że „wśród szczepów NAP1/BI/027/ST1 częścicj zdarzają się przypadki oporności na ciprofloksacynę i moksyflokscynę.

Komentarz: szczepy izolowane w Polsce bez względu na PCR-rybotyp charakteryzuje zazwyczaj wysoka oporność na ciprofloksacynę (nawet 100% szczepów), natomiast do tej pory wszystkie zbadane szczepy RT027 pochodzące z różnych szpitali w Polsce cechowała również oporność wysokiego stopnia na moksyflokscynę (Lachowicz 2020) a zatem oporność na moksyflokscynę może stanowić wskaźnik wystąpienia szczepu hiperwirulentnego, o czym Doktorantka pisze w dalszej części pracy.

5. Strona 15: dotyczy cytowania [89] w aspekcie wykrycia nowego plazmidu pCD-METRO. Powinna być pozycja literaturowa [72]
6. Strona 16: dotyczy zdania „z powodu mniejszej skuteczności od wankomycyny, fidaksoamycyna itd.a nawet metronidazolu (kwas fusydowy) - co Doktorantka miała na myśli pisząc w nawiasie obok metronidazolu (kwas fusydowy)?

W części „Metodyka”, Doktorantka wymieniła metody stosowane w diagnostyce biegunk wywołanych przez *C. difficile*, w tym testy immunoenzymatyczne, testy molekularne jak GeneXpert oraz FilmArray. Od 2000 roku, jak podaje Doktorantka, w laboratorium mikrobiologicznym Narodowego Instytutu Onkologii, stosowana jest hodowla *C. difficile*. Wyhodowane szczepy identyfikowano na przestrzeni lat, różnymi metodami, między innymi z zastosowaniem spektrometrii mas. Doktorantka opisała sposób kolekcjonowania szczepów użytych do badań, podała ich liczbę a także uwzględniła szczepy wzorcowe, które zastosowała do kontroli oznaczania lekowrażliwości.

Mam uwagę odnośnie podanych kryteriów ustalania oporności na ciprofloksacynę i erytromycynę, gdzie Doktorantka powinna powołać się na kryteria ośrodków referencyjnych (w tym przypadku kryteria CLSI).

Godne podkreślenia jest to, że Doktorantka bardzo szczegółowo opisała metodykę dotyczącą badań molekularnych, w tym metodę izolacji genomowego DNA, przygotowanie biblioteki DNA do sekwencjonowania, metodę analiz sekwencji genomów badanych izolatów.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Tak szczegółowy opis metod umożliwia badaczowi powtórzenie doświadczenia, co jest zgodne z zaleceniami dotyczącymi pisania publikacji naukowych i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki.

Wyniki uzyskane w trakcie prowadzonych badań zostały opisane na 10 stronach, w 5 podrozdziałach. Jak podaje Doktorantka w latach 2008-2018 w laboratorium mikrobiologicznym NIO-PIB, zbadano w kierunku *C. difficile* łącznie 2077 próbek kału, a odsetek dodatnich wyników wyniósł w określonym przedziale czasowym 48,8% (2008-2010), 30,3% (2011-2014) i 10,5% (2015-2018), co wskazuje na spadek liczby zakażeń. Uwaga: tabela 1, zamieszczona w części zatytułowanej „Metodyka” powinna znaleźć się w wynikach.

W pierwszym podrozdziale doktorantka zamieściła częściowe dane demograficzne, jak zakres oraz średni wiek chorych, płeć oraz odsetek chorych z poszczególnymi typami chłoniaków. Na uwagę zasługuje analiza dotycząca zakażeń nawrotowych, które to zakażenia zdefiniowane zostały zgodnie z rekomendacjami. U 46 chorych wystąpiły wielokrotne nawroty, z czego u 14 obserwowano więcej niż dwa epizody zakażenia. U 38 z 46 chorych z wielokrotnymi epizodami CDI, ponowna infekcja wystąpiła poniżej 8 tygodnia, co zgodnie z definicją, należy traktować jako nawrót. Natomiast u 3 pacjentów stwierdzono zarówno zakażenie nawrotowe jak i nowe zakażenie. Podczas jednej hospitalizacji trwającej od 21 dni do 263 dni, nawroty obserwowano nawet kilkakrotnie, co wskazuje na wysokie ryzyko zakażeń nawrotowych w grupie chorych z nowotworami układu chłonnego.

W ciągu 10 lat wyhodowano 285 szczepów. Do dalszych badań Doktorantka wybrała losowo tylko 140 szczepów pochodzących z Kliniki Nowotworów Układu Chłonnego, co jak wyjaśniła, podyktowane było wysokimi kosztami badań. Wśród tych szczepów były szczepy wyhodowane z próbek kału pacjentów z wielokrotnymi zakażeniami oraz szczepy pochodzące od pacjentów z pojedynczym epizodem CDI. Wszystkie te zakażenia zakwalifikowano jako zakażenia szpitalne, ze względu na to, że do rozwoju biegunki dochodziło w okresie powyżej 3 doby pobytu w szpitalu.

*Zdefiniowanie na wstępie zakażeń jako „zakażenia szpitalne” jest tutaj niezwykle istotne ponieważ celem Doktorantki była analiza zmienności szczepów w konkretnej klinice tj. Klinice Nowotworów Układu Chłonnego. Zgodnie z definicją „zakażenia szpitalnego” możemy zatem przyjąć, że do zakażenia dochodziło podczas hospitalizacji. Jednocześnie badania w kierunku *C. difficile*, w tym hodowla, prowadzone były w ramach rutynowej diagnostyki i nie prowadzono badań na obecność szczepów toksynotwórczych u przyjmowanych chorych, co mogłoby doprowadzić do ustalenia innego źródła (pozaszpitalnego) pochodzenia szczepów. Być może miałyby to wpływ na interpretację wyników badań i ustaleń jeśli chodzi o zmienność szczepów pacjentów kliniki na przestrzeni 10 lat. Podkreślenie tego*

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

faktu ma znaczenie ponieważ sugerowane jest pochodzenie szczepów w Tytule pracy oraz Celi pracy. Ten problem został przedyskutowany w końcowej części pracy („ Dyskusja”).

*Trzeba podkreślić, że badania przesiewowe w kierunku *C. difficile* u nowoprzyjętych chorych nie są zalecane w ramach rutynowych działań (rekomendacje amerykańskie i europejskie).*

Do badania genetycznego szczepów Doktorantka wybrała metodę MLST (ang. Multilocus sequence typing), która polega na badaniu zmian sekwencji w zestawie wybranych genów i przypisanie typu allelicznego dla każdego genu, co pozwala ustalić profil alleliczny. Technika MLST bazuje na analizie wysoce konserwowanych sekwencji genów metabolizmu podstawowego i odgrywa istotną rolę w szerszych analizach populacji.

Doktorantka dokonała analizy sekwencji badanych izolatów i ustaliła, że mediana długości całogenomowych sekwencji powstałych ze złożenia poszczególnych odczytów sekwencjonowania wyniosła 4,34 Mb. Zestawienie wyników sekwencjonowania szczepów pochodzących od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego, NIO-PIB przedstawiła w tabeli 1 suplementu.

Doktorantka w swojej pracy zidentyfikowała 23 wcześniej opisane typy sekwencyjne (ST) oraz dwa nowe typy. Najczęściej występował typ sekwencyjny ST1 tj. 31,4% oraz ST42 tj 30,1% szczepów spośród 140 badanych. Interesujące jest to, że szczepy ST42 wykryto tylko w latach 2009-2011. Zidentyfikowane typy sekwencyjne przypisano do 3 gałęzi filogenetycznych, z których pierwsza zawierała ST42 i mniej liczne ST13, ST2, ST49, ST36, ST325, ST6, ST8 i ST17. Druga linia zawierała ST1, ST417, ST5, ST37, ST11 i ST15 a trzecia ST46, ST3, ST45 i ST9. Analiza filogenetyczna wykazała związki między ST1 i ST417, co wskazuje na ich wspólne pochodzenie. Doktorantka przedstawiła drzewo filogenetyczne analizowanych szczepów, opracowane na podstawie macierzy liczby polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz liczbę różnicujących alleli między typami sekwencyjnymi (ryc. 3) a także typy sekwencyjne szczepów, wywołujące wielokrotne nawroty oraz czas jaki upłynął między kolejnymi przypadkami zakażeń. **Jest to niezwykle interesująca analiza, z której między innymi wynika, że nowe przypadki po długim czasie (60 dni, 99 dni, 165 dni) mogą powodować te same typy ST, co może wskazywać na duże prawdopodobieństwo zakażenia tym samym szczepem, występującym w środowisku szpitalnym.**

W kolejnym podrozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki badania profilu toksynotwórczości w wyniku całogenomowego sekwencjonowania i ustaliła, że dominującym typem był typ *tcdA+tcdB+cdtA+/cdtB+*, czyli szczepy posiadające geny trzech toksyn (122 izolaty), a pozostałe toksynotwórcze należały do typu: *tcdA+tcdB+cdtA-/cdtB-*. Co ciekawe 9 izolatów było szczepami nietoksynotwórczymi, co może wskazywać na mieszaną infekcję *C. difficile* (szczepy *tox+* i *tox-*) ponieważ w próbkach kału od chorych z biegunką wykryto toksyny *C. difficile*. Natomiast interesujące

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

jest to, że Doktorantka nie wykryła typu toksynotwórczości *tedA-tedB+cdtA-/cdtB-* czyli szczepów wytwarzających tylko toksynę B. Są to szczepy zaliczane do typu sekwencyjnego ST37, który został wykryty na terenie Kliniki. Ustalenie PCR-rybotypu tych szczepów byłoby niezwykle ciekawe, bo jak do tej pory typ ST37 zawierał szczepy wytwarzające tylko toksynę B a nie wytwarzające toksyny A (ale posiadające zredukowany gen toksyny A). Ten typ sekwencyjny koresponduje głównie z PCR-rybotypem RT017 (*tedA-tedB+cdtA-/cdtB-*).

W podrozdziale dotyczącym badania lekowrażliwości, z zastosowaniem metody gradientowo-dyfuzyjnej (E-test), Doktorantka stwierdziła, że żaden z izolatów nie wykazał oporności na metronidazol i wankomycynę, natomiast wszystkie szczepy były oporne na ciprofloksacynę, co potwierdza wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych w Polsce przez Lachowicz i wsp. (2020), gdzie 100% szczepów polskich było opornych na ciprofloksacynę. Oporność na erytromycynę, klindamycynę i moksyflokscynę Doktorantka wykazała u odpowiednio: 72,9%, 42,9% i 72,9% izolatów.

Badanie genetycznych determinant oporności wykonano, porównując sekwencje izolatów z sekwencjami zdeponowanymi w dwóch bazach danych (ARG-ANNOT, wersja 3 i The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)). Wszystkie badane szczepy o wysokiej oporności fenotypowej ($MIC > 256$ mg/L) na erytromycynę i klindamycynę posiadały gen *erm* (31 szczepów niesło gen *ermB* a 3 szczepy *ermG*). Spośród szczepów posiadających gen *ermB* 19 należało do typu ST1, 4 do typu ST37, 3 do typu ST15, 2 do typu ST26, 1 do typu ST13 i 1 do typu ST36 i jeden szczep o nieustalonym typie sekwencyjnym. Gen *ermG* wykryto tylko w trzech izolatach typu ST3, ST27 i ST45. Najczęściej występującą mutacją, powodującą oporność na fluorochinolony (FQ) była mutacja powodująca zamianę treoniny w izoleucynę, jak podaje Doktorantka (Thr8 na Ile) w podjednostce *gyrA*, i wystąpiła ona u 68,1% szczepów (*Uwaga: prawdopodobnie chodziło o mutację powodującą zamianę Thr82 na Ile, co jest zgodne z literaturą*).

Taką mutację posiadało 100% szczepów typu ST1, ST37, ST42 i ST417 oraz część szczepów typu ST29 i ST36, opornych na FQ. Dodatkowo wykryto dodatkowo 3 mutacje w genach *gyrB*, pochodzących z różnych szczepów.

Na koniec tej analizy Doktorantka przedstawia wnioski, z których ten dotyczący obniżenia ryzyka nawrotu w obecności oporności MLS_B jest nieuprawniony. Trudno taki wniosek wyciągnąć, nie biorąc pod uwagę innych czynników ryzyka rozwoju nawrotu.

W rozdziale pt. „Analiza polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz pokrewieństwa badanych genotypów (ST) Doktorantka wykazała, bardzo duże zróżnicowanie w obrębie SNP, nawet do 28 dla typu sekwencyjnego ST1 i do 34 dla typu ST42. W przypadku zakażeń nawrotowych te różnice wahały się od 0 do 22 (mediana 10) dla ST1 i od 0 do 26 (mediana 12) w przypadku ST42. Jak podaje Doktorantka liczby różnicujących SNP dla wszystkich izolatów wyniosły od 3 do 5369 co potwierdza wysoką zmienność sekwencji genomów *C. difficile*.

WARSZAWSKI UNIwersYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Dyskusja zawarta na 8 stronach rozprawy, została bardzo dobrze przeprowadzona i świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Jak podkreśla Pani mgr Edyta Waker u 14% pacjentów leczonych z powodu choroby nowotworowej układu krwiotwórczego wystąpi zakażenie *C. difficile*, co wskazuje na wagę problemu.

W prezentowanej pracy zastosowano między innymi metodę MLST znaną od 2004 roku kiedy Lemee i wsp. przeprowadzili pierwszą analizę izolatów *C. difficile* i zidentyfikowali trzy różne linie filogenetyczne. W 2006 roku Stabler i współpracownicy, przy użyciu mikromacierzy DNA, wykazali, że populacja *C. difficile* jest bardziej zróżnicowana niż sądzono, ponieważ zidentyfikowano cztery filogenetyczne tzw. kłady. Większość typów sekwencyjnych ST skupiła się w jednej heterogenicznej linii, ale pozostałe trzy reprezentowały wylaniające się wirulentne linie: RT017 (ST37), RT027 (ST1) i bardziej odległe tj. RT078 (ST11). Później ci sami autorzy przeprowadzili analizę filogenetyczną danych za pomocą WGS i potwierdzili znaną wówczas topologię linii (cztery kłady). Obecnie wyróżnia się 6 kładów.

Jak wskazuje Doktorantka, nie ma bezpośredniego przełożenia rybotypów na genotypy (ST) i niektóre genotypy odpowiadają pojedynczemu rybotypowi, inne zaś przypisywane są do wielu rybotypów. Natomiast całogenomowe sekwencjonowanie pozwala na bardziej szczegółowe genotypowanie bakterii i umożliwia lepsze różnicowanie w sytuacji nawrotów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka wykryła dwa nowe, nieopisane dotąd typy ST. Zgodnie z analizą GoeBURST tylko 4 genotypy ST różniły się od innych więcej niż 2 allelami, co sugeruje ściśle pokrewieństwo między większością badanych izolatów.

Doktorantka zauważyła, że metoda MLST oferuje raczej niski poziom rozdzielczości w porównaniu do metody cgMLST. Jednak ze względu na niskie pokrycie sekwencjonowania i możliwe błędy związane z technologią Torrent, analiza z wykorzystaniem programu MentaLiST nie mogła być użyta w tym badaniu. W dyskusji Doktorantka omówiła szeroko aspekt występowania szczepów „hiperwirulentnych” na świecie wykazując się dużą znajomością tematu, choć nie ustrzegła się pomyłki (poniżej).

Mój komentarz: Doktorantka stwierdziła, że przed rokiem 2008 nie obserwowano występowania hiperwirulentnego szczepu RT027 w Polsce. Dla przypomnienia pierwszy opisany szczep w Polsce pochodził z 2005 roku (praca jest cytowana w Spisie piśmiennictwa (Pol J Microbiol. 2008; 57(3):267-8). (pozycja literaturowa 194).

Doktorantka nie wykryła szczepów opornych na metronidazol i wankomycynę, poza jednym szczepem o obniżonym MIC metronidazolu (1,5 mg/L). Problem oporności na leki stosowane w leczeniu pacjentów z CDI został bardzo dobrze przedyskutowany przez Doktorantkę.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Pani mgr Edyta Waker zwróciła uwagę na zjawisko spadku wartości minimalnego stężenia hamującego w wyniku pasażowania szczepów *C. difficile*, ich zamrażania i rozmrażania, w stosunku do wartości ustalonej bezpośrednio po wyhodowaniu szczepu, co jest zgodne z obserwacjami innych badaczy. Fenotypowa oporność lub obniżona wrażliwość *C. difficile* na metronidazol jest ważnym spostrzeżeniem, ponieważ szczepy wyhodowane od chorych mogą fenotypowo wykazywać obniżoną wrażliwość na metronidazol i podwyższony MIC, którego wartość po pasażu czy mrożeniu spada i nie jest to powiązane z opornością uwarunkowaną genetycznie. Innym problemem opisanym przez Doktorantkę jest problem oporności na fluorochinolony (FQ). Doktorantka dyskutuje zjawisko oporności w odniesieniu do literatury i zauważa, że jest to związane z nadużywaniem FQ. Taki związek jest prawdopodobny również w analizowanej Klinice, z której pochodziły szczepy. Jednak jak zauważa Doktorantka nie można tego stwierdzić jednoznacznie ze względu na brak informacji na ten temat w dokumentacji klinicznej.

Interesująca jest analiza nawrotowości. Spośród 41 pacjentów, od których wyhodowano szczepy *C. difficile* z każdego epizodu CDI w przypadku 12 pacjentów izolaty z pierwszego i kolejnych epizodów były genetycznie niezwiązane, co wskazywać może na reinfekcję.

W badaniu zaprezentowanym w recenzowanej rozprawie doktorskiej większość szczepów wykazywała wysoki poziom pokrewieństwa genetycznego, co wskazywać może na szpitalne zakażenie, ale brak próbek środowiskowych z Kliniki nie pozwala na potwierdzenie źródła zakażenia.

Godne podkreślenia jest to, że Doktorantka wskazuje w dyskusji na pewne ograniczenia pracy, co świadczy o krytycznym spojrzeniu na uzyskane wyniki i świadomości pewnych niedostatków, które mogą zdarzać się w sytuacji badań retrospektywnych, a takie badanie przeprowadziła Doktorantka. Do tych ograniczeń zaliczyła: wykonywanie badań w kierunku CDI w ramach rutynowej diagnostyki, brak kompletnych danych klinicznych w odniesieniu do danych epidemiologicznych i klinicznych, co mogło mieć wpływ na powstanie błędów jak chociażby we właściwym doborze chorych. Również ograniczenie w postaci zbadania tylko 140 izolatów może mieć wpływ na ryzyko powstałego błędu jak też ograniczenie w postaci jednośrodkowego badania ponieważ dotyczy jednej kliniki.

Piśmiennictwo cytowane przez Doktorantkę zarówno we Wstępie jak i Dyskusji jest odpowiednie i aktualne i ogólnie nie budzi zastrzeżeń.

Na koniec Doktorantka sformułowała 4 wnioski, które wynikają wprawdzie z przeprowadzonych badań, ale zabrakło mi głównego wniosku wynikającego z zasadniczego badania, a mianowicie dotyczącego zmienności szczepów *C. difficile* na przestrzeni 10 lat. Taki wniosek korespondowałby z podanym tytułem pracy jak i celem pracy.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Uwagi końcowe:

Praca doktorska p. mgr Edyty Waker stanowi oryginalne opracowanie problemu i wnosi nowe aspekty w zakresie różnorodności genetycznej szczepów zasiedlających przewód pokarmowy pacjentów z nowotworami krwi. **Badania przeprowadzone przez Doktorantkę są bardzo ważnym elementem toczącej się dyskusji w środowisku międzynarodowym nad zmiennością gatunku *C. difficile* i problemem nawrotowości.** Na koniec chcę podkreślić, że Doktorantka zrealizowała swój cel badawczy i prześledziła genotypy szczepów w okresie 10 lat. Natomiast uwagi poczynione przez Recenzenta, nie obniżają wartości naukowej rozprawy doktorskiej i należy je uwzględnić w przygotowywanej, jak przypuszczam publikacji.

Jestem przekonana, że oceniana rozprawa doktorska p. mgr Edyty Waker pt...**Analiza zmienności genetycznej toksynotwórczych szczepów *Clostridioides difficile* w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego na przestrzeni 10 lat**” 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.

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie, o dopuszczenie Pani mgr Edyty Waker do dalszych etapów przewodu doktorskiego na stopień dr nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Jednocześnie pomimo pewnych niedoskonałości w pisaniu pracy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na bardzo istotny problem podniesiony i dogłębnie zbadany przez Doktorantkę, jak analiza zmienności szczepów *C. difficile* u ciężko chorych pacjentów z nowotworami krwi i etiologię zakażeń nawrotowych (typy ST). Jednocześnie chcę podkreślić wysoki potencjał badawczy Doktorantki.

01709 Prof. dr hab. n. med. Hanna Pituch
DIAGNOSTA LABORATORYJNY
Specjalista II^o z mikrobiologii