

Prof. dr hab. med. Barbara Skrzydło-Radomańska
Katedra i Klinika Gastroenterologii
Uniwersytet Medyczny
w Lublinie

Lublin 02.04.2021

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Edyty Waker

zatytułowanej:

„Analiza zmienności genetycznej toksynotwórczych szczepów
Clostridoides difficile w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego
na przestrzeni 10 lat”

W medycynie XXI wieku bardzo wyraźnie zaznacza się zmiana charakterystyki demograficznej chorych. Pacjenci żyją dłużej, lecz nie zawsze z dobrą jakością życia, co spowodowane jest występowaniem chorób przewlekłych, niekiedy kilku współistniejących, zwiększona jest liczba pacjentów z grup ryzyka: w podeszłym wieku, leczonych terapią immunosupresyjną lub antybiotykami, z koniecznością przewlekłej hospitalizacji lub pozostawiania w zakładach opieki zamkniętej. Zwiększa to znacznie ryzyko zakażeń *Clostridoides difficile*, ich liczba wzrasta, przebieg jest różnie nasilony, często ciężki, a także niestety rośnie liczba nawrotów infekcji, bardziej opornych na leczenie i pogarszających dalsze rokowanie u tych pacjentów. Aktualnie *C. difficile* uważana jest za najważniejszy czynnik etiologiczny biegunek szpitalnych. Wzrost częstości zakażeń szpitalnych w ostatnich dekadach można wiązać z pojawieniem się szczepu 027 (BI/NAP-1) w Europie Zachodniej i Ameryce Północnej, bardziej wirulentnego, wywołującego zakażenia głównie osób starszych, produkującego toksynę binarną i obdarzonego większą zdolnością do sporulacji. Jednakże obserwujemy także w młodszej grupie pacjentów wzrost częstości infekcji, a odpowiedzialne za ich wystąpienie okazały się szczepy należące do rybotypu 078

(ST 11) coraz częściej izolowane w europejskich środowiskach szpitalnych. Zakażenia z udziałem tych szczepów (zwłaszcza 027) mają cięższy przebieg, większą śmiertelność i więcej nawrotów. Narasta też oporność bakterii na stosowane antybiotyki (metronidazol !) co odpowiada za brak sukcesu terapeutycznego.

W ostatnich dekadach znacznie zwiększyła się także wiedza na temat mikrobioty zasiedlającej organizm człowieka, tak licznej i o tak istotnym znaczeniu, że określa się ją mianem „organu bakteryjnego”, a dwukierunkową stałą komunikację między ośrodkowym układem nerwowym i przewodem pokarmowym z jej udziałem określono mianem „oś mózg-jelito-mikrobiota”. Zaburzenia funkcji tej osi skutkują występowaniem chorób czynnościowych – udowodniono że zespół jelita nadwrażliwego (ang. IBS-irritable bowel syndrome) występuje siedmiokrotnie częściej u osób po przebytej infekcji przewodu pokarmowego, w tym po zakażeniu *C. difficile*, co ma istotne następstwa kliniczne i ekonomiczne.

Dlatego podjęcie przez Panią mgr Edytę Waker tematu zmierzającego do oceny zmienności genetycznej toksynotwórczych szczepów *C. difficile* izolowanych od pacjentów z nowotworami układu chłonnego na przestrzeni dziesięciu lat jest dążeniem nie tylko uzasadnionym, ale wręcz wkomponowuje się w nurt najnowszych badań dążących do strategii zapobiegania tym infekcjom i identyfikacji osób o zwiększonym ryzyku wystąpienia zakażenia.

Pani mgr Edyta Waker sformułowała główny cel swojej pracy jako ocenę 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, techniki umożliwiającej między innymi rozróżnienia reinfekcji od nawrotu czy całkowicie nowego nowego zakażenia, jak też mapowanie transmisji zakażenia.

Autorka przeprowadziła pracochłonne, bardzo interesujące, retrospektywne lecz z użyciem nowoczesnej metody całogenomowego sekwencjonowania, obejmujące dziesięcioletni okres (2008-2018) badanie, którego rezultatem jest oceniana dziś przeze mnie rozprawa doktorska.

Praca zawarta na 70 stronach wydruku komputerowego posiada typowy układ: składa się z 10 rozdziałów i ich podrozdziałów obejmujących: streszczenia polskie i angielskie, wstęp, cel pracy, metodykę badań, ich wyniki oraz dyskusję, wnioski, suplement i piśmiennictwo

obejmujące 229 pozycji światowej i rodzimej literatury w większości z ostatnich lat, prawidłowo w tekście przytoczonych. Suplement obejmuje dwie tabele: z zestawieniem wyników sekwencjonowania analizowanych szczepów oraz z wykazem obecności genów warunkujących oporność typu MSLb oraz genów powodujących oporność na chinolony wśród badanych szczepów wyizolowanych w przebiegu pierwszego zakażenia. W tekst wkomponowane są tabele w liczbie 7 i ryciny w liczbie 5.

We wstępie Autorka daje dowód doskonałego przygotowania teoretycznego i głębokiego zainteresowania graniczącego z pasją wobec podjętej tematyki badawczej. Najnowsze informacje w nim zawarte dotyczą charakterystyki i budowy genetycznej szczepów *C. difficile*, ich toksynotypów, epidemiologii, rozpatrywane są główne czynniki odpowiedzialne za wystąpienie zakażenia, braku sukcesu terapeutycznego i nawroty – informacje bardzo cenne z klinicznego punktu widzenia, jak też dotychczasowe metody leczenia tej infekcji.

Wstęp może stanowić nawet osobną monografię także dla klinicystów z racji wartościowych i nowych doniesień w nim zawartych.

Rozdziały dalszej części pracy zawierają informacje na temat materiału do badań i zastosowanej metodyki. W dziesięcioletnim okresie 2008-2018 wśród pacjentów Kliniki Nowotworów Układu Chłonnego NIO-POB w Warszawie przebadano 2077 próbek kału pod kątem zakażenia CD z obecnością toksyn A i B, uzyskując wynik dodatni w 618 przypadkach. Zwraca uwagę malejąca z czasem wartość średniego odsetka wyników dodatnich: z prawie 50% w latach 2008-2010 do 10,5% w latach 2015-2018. W tym miejscu chcę do Doktorantki skierować pytanie czym można tłumaczyć to zjawisko przy narastającej częstości zakażeń w skali globalnej i wciąż tej samej charakterystyce pacjentów Kliniki? Spośród 285 izolatów z hodowli *C. difficile* 140 Autorka wybrała do sekwencjonowania całogenomowego, spośród nich 104 izolaty pochodziły od pacjentów z przynajmniej jednym nawrotem i 36 od chorych z pojedynczym zakażeniem. Przeprowadzając genotypowanie metodą MLST (Multilocus Sequence Typing) opartą na porównywaniu sekwencji 7 genów metaolizmu podstawowego, Doktorantka zidentyfikowała 23 typy sekwencyjne (ST) oraz dwa wcześniej nieopisane szczepy. Najczęstszymi typami sekwencyjnymi były ST1 i ST42, ale co ciekawe, podczas gdy częstotliwość pierwszego była względnie stała w okresie obserwacji, typ ST42 występował tylko w latach 2009-2011 i był on wówczas identyfikowany jako najczęstszy.

W omawianym badaniu wykazano, że z wyjątkiem czterech nietoksynotwórczych szczepów (ST15, 26, 27 i 29) oraz pojedynczego szczepu ST3, wszystkie izolaty były toksynotwórcze, a

87% spośród 140 szczepów miało typ toksynotwórczy obejmujący toksyny A/B i toksynę binarną.

Wykazano również, że większość izolatów posiadała wysoki poziom pokrewieństwa genetycznego, co wskazuje raczej na zakażenie szpitalne oraz że większość zakażeń powtórnych powodowana była przez ten sam szczep który wywołał poprzednią infekcję. Bardzo ważnym jest, że jak stwierdzono, obecność mutacji w podjednostce *gyrA* *C. difficile* zwiększa ryzyko ponownej infekcji.

Dokonano oceny wrażliwości badanych izolatów *C. difficile* na wybrane leki. Analiza wykazała, że 100% przebadanych szczepów posiadało wysoki stopień oporności na ciprofloksacynę i 73% na moksifloksacynę (zgodnie z innymi doniesieniami epidemiologicznymi w Polsce i Europie), a u 68% szczepów z tą opornością występowała właśnie mutacja w podjednostce *gyrA*. Jest to ważne w świetle danych literaturowych, iż długotrwałe podawanie fluorochinolonów uważane jest za czynnik ryzyka zakażenia hiperwirulentnym szczepem NAP1/BI/027/ST1. Wszystkie przebadane szczepy ST1 i ST42 były także odporne na erytromycynę, zaś oporność na klindamycynę dotyczyła 57% szczepów ST1 oraz 30% ST42. Nie wykryto żadnego szczepu opornego na wankomycynę, co jest pozytywne ale także na metronidazol, który tak dalece stracił swoje miejsce w wytycznych dotyczących postępowania w zakażeniu *C. difficile*.

Autorka omawia szeroko uzyskane wyniki we wnikliwej, rzeczowej i bardzo dojrzałej dyskusji, zestawiając je z licznymi doniesieniami innych badaczy, nie waha się także na koniec z rezerwą omówić ograniczeń pracy (jednoośrodkowa kohorta, retrospektywny dostęp do danych klinicznych i epidemiologicznych), które w niczym nie ujmują jej wartości.

Wnioski podsumowujące wyniki i realizację celów przedstawione na końcu dysertacji w pełni wynikają z przeprowadzonych badań.

W świetle tych wszystkich informacji omawiana dysertacja przedstawia się jako bardzo cenne praktycznie opracowanie, gdzie z użyciem najczęściej stosowanej w genetycznej charakterystyce izolatów bakteryjnych (z sekwencjonowaniem) metody oceniono zmienność genetyczną toksynotwórczych szczepów *C. difficile*.

Uważam, że Pani mgr Edyta Waker w swojej pracy na stopień doktora nauk medycznych zrealizowała wyznaczone sobie cele badawcze uzyskując odpowiedzi na postawione pytania i potwierdzając umiejętność samodzielnego kreowania i wykorzystania warsztatu badawczego dla potrzeb naukowych i ich możliwej implikacji klinicznej. Doskonały ośrodek naukowy w

którym praca powstała i perfekcyjność Promotora o szerokich i wielostronnych horyzontach naukowej wyobraźni niewątpliwie do tego zobowiązywały.

Podsumowanie

Przedstawioną mi do recenzji, bardzo wartościową poznawczo i cenną z punktu widzenia praktycznego pracę mgr Edyty Waker oceniam bardzo wysoko. Budzi ona nawet poczucie wdzięczności ze strony klinicysty gastroenterologa. Rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn.zm.), wnoszę więc do Wysockiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadania stopnia doktora nauk.

Barbara Skrzydło-Radomańska

