

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Dr hab. n. med. Hanna Pituch  
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
02-004 Warszawa  
ul. Chałubińskiego 5  
hanna.pituch@wum.edu.pl

Warszawa, dnia 30 sierpnia 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Alessandro Negri  
pt. „Spore based vaccine against pseudomembranous colitis”  
(Szczepionka przeciwko rzekomobłoniastemu zapaleniu jelita grubego  
bazująca na przetrwalnikach)

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Alessandro Negri pt. „Spore based vaccine against pseudomembranous colitis” dotyczy niezwykle ważnego i aktualnego tematu, jakim jest szczepionka przeciwko rzekomobłoniastemu zapaleniu jelita grubego. Praca powstała w Zakładzie Bakteriologii Molekularnej, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem Profesora dr hab. Michała Obuchowskiego - promotora i dr hab. Krzysztofa Hince - promotora pomocniczego.

*C. difficile* jest współcześnie najczęstszą przyczyną ognisk epidemicznych w zakładach opieki zdrowotnej. Zakażenie *C. difficile* (*C. difficile* infection -- CDI) może powodować poważne komplikacje jak: ciężka biegunka, zapalenie jelita grubego, a w najgorszym przypadku zespół toksycznej okrężnicy (toxic megacolon). Zakażenia te cechują się nawrotowością i stosunkowo wysoką śmiertelnością. Pomimo dostępności standardowych kuracji antybiotykowych, dane z wielu krajowych programów nadzoru wskazują, że częstość występowania CDI stale wzrasta. Stanowi to duże obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej. Testowane są nowe strategie postępowania w przypadku zakażenia *C. difficile*, które mogą w przyszłości zastąpić lub rozszerzyć metody standardowej antybiotykoterapii.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Metody zapobiegania zakażeniom CDI, pomimo ogromnego zaangażowania zespołów epidemiologicznych, są jednak nieskuteczne ze względu na powszechność występowania *C. difficile* w środowisku szpitalnym. Szereg elementów składa się na profilaktykę CDI: wielodyscyplinarna kontrola zakażeń, racjonalna antybiotykoterapia oraz zastosowanie środków wzmagających obronę immunologiczną pacjenta.

Najlepszym sposobem zapobiegania CDI u osób z grup ryzyka, może być szczepionka przeciw *C. difficile*, a ze względu na charakter infekcji, szczepionka doustna, która chroniłaby przed kolonizacją. Niestety z powodu trudności związanych z dostarczeniem antygeny do miejsca docelowego immunizacji, dotychczas opracowano niewiele tego typu szczepionek. Żadna jednak nie została wprowadzona do użytku.

Celem przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pana mgr Alessandro Negri, jak Doktorant podaje w streszczeniu pracy, było skonstruowanie doustnej szczepionki przeciwko rzekomobłoniastemu zapaleniu okrężnicy wywołanemu przez *C. difficile*, z wykorzystaniem spor *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), eksponujących na swojej powierzchni antygen FliD (cap protein) *C. difficile*.

Doktorant skonstruował różne warianty genetyczne *Bacillus subtilis* oraz przeprowadził badanie oceniające skuteczność szczepionki na modelu zwierzęcym.

Badania te uzyskały wsparcie finansowe w ramach badania LIDER (LIDER/14/21/L 2/10/ NCBiR/2011) Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

Rozprawa doktorska Pana mgr Alessandro Negri, została napisana w języku angielskim i obejmuje 107 stron tekstu komputerowego, w tym 28 rycin i 8 tabel. Praca w swojej konstrukcji przypomina typową dysertację, chociaż przy bliższym zapoznaniu się z treścią, nie zawiera wszystkich, typowych elementów składowych (poniżej).

Rozprawa składa się z następujących rozdziałów: *Wstęp (Introduction) z przeglądem literatury, Plan pracy (Work plan), Materiały, Metody, Wyniki i Dyskusja*. Praca ponadto zawiera *Streszczenie w języku polskim i angielskim*. Pracę poprzedza *Spis treści*, natomiast brak jest wykazu skrótów, tabel i rycin, części typowych dla takiej formy pracy doktorskiej. Całość zakończona jest *Spisem piśmiennictwa* w liczbie 192 pozycji literaturowych. Cel pracy nie został zwyczajowo wyodrębniony i zastępuje go „Work plan”.

Wstęp rozprawy doktorskiej (Introduction), który obejmuje 29 stron, podzielony został na trzy różne tematycznie podrozdziały zatytułowane: „*Clostridium difficile*”, „Vaccination” i „*Bacillus subtilis*”, logicznie łączące się jednak w spójną całość, ze względu na tematykę podjętych badań.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

W oparciu o generalnie właściwą literaturę, cytowaną we Wstępie, Doktorant przedstawił rys historyczny odkrycia *C. difficile*, patogenezę zakażenia *C. difficile*, proces kolonizacji i rolę flagelli w tym procesie. W kolejnym podrozdziale Pan Alessandro Negri opisał raczej toksyny *C. difficile* niż proces wytwarzania toksyn (jak wynikałoby to z tytułu podrozdziału). W kolejnym podrozdziale przedstawił zarys epidemiologii CDI, podając wskaźniki zapadalności na CDI w Europie, a także liczbę przypadków w Stanach Zjednoczonych. Doktorant uzasadnia wzrost przypadków CDI, powołując się między innymi, na prace dotyczące pojawienia się szczepów hiperepidemicznych *C. difficile* (NAP1/BI/027), które dominują w Ameryce Północnej. Natomiast nie mogę zgodzić się z Doktorantem, że w Europie dominuje PCR-rybotyp 001 (strona 9). Obecne dane, pochodzące z przeglądów europejskich wskazują, że najczęściej występującym PCR-rybotypem w krajach europejskich (Niemcy, Węgry, Rumunia, Czechy a także Polska i inne ) jest PCR-rybotyp 027 (Davies i wsp. 2014, Pituch i wsp. 2015, van Dorp, 2016). PCR-rybotyp 027 praktycznie nie występuje tylko w krajach skandynawskich. Natomiast we Włoszech występuje najczęściej PCR-rybotyp 018 (Spigaglia i wsp. 2010, Wasels i wsp. 2016).

W kolejnych podrozdziałach Doktorant przedstawił aspekt kliniczny zakażenia *C. difficile*, w tym postaci kliniczne, czynniki ryzyka rozwoju CDI, a także aspekt diagnostyczny oraz metody stosowane w terapii CDI. Na koniec opisał odpowiedź immunologiczną na zakażenie *C. difficile* oraz modele stosowane w badaniach CDI.

W podrozdziale „*Vaccination*” Doktorant opisał pierwsze szczepionki i ich zastosowanie. W podrozdziale przedstawione zostały technologie stosowane w opracowaniu szczepionek, sposoby produkcji antygenów jak też metody szczepienia. W dalszej części „Wstępu” Doktorant opisał komponenty systemu odpornościowego przewodu pokarmowego.

Pan mgr Alessandro Negri przedstawił również stan wiedzy na temat szczepionki przeciw CDI. Doktorant opisuje biwalentną szczepionkę ACAM-DIFF (Sanofi-Pasteur) oraz szczepionkę IC84 (Valneva, Austria). Warto natomiast uzupełnić ten wykaz o szczepionkę PF-06425090 (Pfizer) (Pfizer website. PF-06425090 vaccine product. <http://pfizer.com>). W kontekście badań klinicznych III fazy nad szczepionką ACAM-DIFF, Doktorant powołuje się na pracę Mizrahi i wsp. z 2014. III faza badań klinicznych szczepionki ACAM-DIFF, pod nazwą CDIFFENSE, rozpoczęła się w 2015 roku, rekrutując osoby dorosłe w wieku 50–85 lat z grup ryzyka, docelowo z 200 ośrodków, w 20 krajach (cyt. Clinical trials website. [http:// clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)).

W kolejnym podrozdziale Doktorant scharakteryzował tlenową laseczkę *Bacillus subtilis*. Szczegółowy opis drobnoustroju jak cykl życiowy, właściwości spor i ich struktura, jest uzasadniony ze względu na wybór przez Doktoranta tego drobnoustroju jako nośnika antygeny *C. difficile*.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Dodatkowe uwagi:

Komentując treści zawarte we „Wstępie” należy zwrócić uwagę na pewne nieścisłości:

- 1.) str. 9: w podrozdziale „Dane epidemiologiczne”: Doktorant cytuje świetną, ale mniej aktualną publikację Bauer i wsp. z 2011 roku, opartą na wynikach przeglądu europejskiego CDI z 2008 roku, natomiast nie uwzględnia najnowszej pracy Davies K. i wsp. „Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID)”. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(12):1208-19.
- 2.) str. 12: Doktorant pisze, że nie ma testów uznawanych jako „złoty standard” w diagnostyce laboratoryjnej CDI. W moim przekonaniu nadal hodowla toksynotwórczego szczepu „toxigenic culture” i test cytotoksyczności stanowią „złoty standard” i wobec tych testów ustala się standardy.
- 3.) str. 14: kwestia dotycząca terapii przeciw CDI: zgodnie z najnowszymi rekomendacjami ESCMID (Debast i wsp. 2014) leki wymienione przez Doktoranta jak nitazoxanid, rifaximina, bacytracyna, kwas fusydowy czy teikoplanina nie są rekomendowane do leczenia pacjentów z nawrotami.

Prezentowany projekt, zgodnie z tym co podaje Doktorant, składał się z następujących 4 etapów (celów):

1. utworzenie systemu wektorów do prezentacji białka FliD *C. difficile* na powierzchni spor *B. subtilis* w wyniku fuzji z białkami płaszczu,
2. utworzenie systemu wektorów do produkcji białka FliD *C. difficile* podczas fazy wegetatywnej wzrostu *B. subtilis*,
3. utworzenie rekombinantów szczepów *B. subtilis* wytwarzających białko FliD *C. difficile* uzyskanych w wyniku fuzji,
4. immunizacja zwierząt laboratoryjnych za pomocą białka FliD obecnego na powierzchni spor *B. subtilis* i zbadanie profilu odpowiedzi immunologicznej.

Doktorant w swojej pracy doktorskiej właściwie realizuje plan projektu, opierając swój śmiały zamiar stworzenia szczepionki doustnej przeciw CDI, na następujących faktach:

1. wysokiej immunogenności antygeny białka FliD *C. difficile* i wybraniu go jako antygeny szczepionkowy przeciw rzekomobłoniastemu zapaleniu jelit.
2. udokumentowanych badaniach potwierdzających, że przetrwalniki *B. subtilis* stanowią doskonałe narzędzie do powierzchniowej ekspozycji antygenów
3. wysokiej odporności przetrwalników na kwas żołądkowy, co chroni ekspozowany antygen przed niekorzystnymi warunkami panującymi w żołądku.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

W części poświęconej materiałom stosowanym w pracy laboratoryjnej, Doktorant zamieścił wykaz plazmidów i szczepów *E. coli* użytych jako wektory, a także podał charakterystykę dzikiego szczepu *B. subtilis* (*B.subtilis* 148) oraz wariantów genetycznych skonstruowanych jako nośniki białka FliD *C. difficile*. Natomiast nie uwzględnił w materiałach szczepu *C. difficile* (numer szczepu, pochodzenie, charakterystyka), który był źródłem genów kodujących białko FliD, o którym dowiadujemy się dopiero w trakcie lektury części „Metody”.

W wykazie materiałów wymienione zostały dwa wsobne szczepy myszy użyte do doświadczeń: BALB/c i C57BL/6L. Kolejno podano enzymy stosowane w doświadczeniach, primery wraz z miejscami restrykcyjnymi. Szczegółowo przedstawiono skład pożywek, buforów, roztworów i antybiotyki oraz stosowane przeciwciała. Doktorant uwzględnił ponad to gotowe testy, między innymi testy do izolacji plazmidów, genomowego DNA i inne. Doktorant w trakcie opisywania wyników powołuje się na przyjętą, na potrzeby pracy, numerację odczynników i innych materiałów, co ułatwia śledzenie zastosowania tychże w poszczególnych etapach badań.

Podrozdział dotyczący stosowanych metod zawiera szczegółowe opisy metod izolacji plazmidów, izolacji chromosomalnego DNA, amplifikacji DNA, oczyszczanie DNA po cięciu enzymami. W tabeli Doktorant podaje kolejny opis primerów stosowanych w reakcji PCR, metodykę klonowania, transformacji komórek *E. coli* i *B. subtilis*, preparatykę oczyszczania spor *B. subtilis* oraz ekstrakcję białek płaszcza spor. Doktorant podaje metodykę uzyskania białek i ich oczyszczania oraz wykrywania za pomocą stosownych metod jak: IMAC, SDS-PAGE, Western blot. Kolejno opisuje techniki immunodetekcji, ocenę jakościową białek z zastosowaniem metody dot blot oraz metodę immunofluorescencji.

*Szczegółowy opis materiałów i metod sprawia, że można by powtórzyć doświadczenia Doktoranta. Taki sposób opisywania materiałów i metod jest zgodny z dobrą praktyką pisania publikacji.*

*Należy podkreślić, że prezentacja białka FliD na powierzchni spor wymagała zastosowania przez Pana mgr Alessandro Negri wielu narzędzi molekularnych, które Doktorant perfekcyjnie opanował.*

W kolejnych podrozdziałach Doktorant opisuje szczegółowo technikę immunizacji myszy, sposób uzyskania surowic oraz pozyskania przeciwciał z GIT, próbek kału zwierząt immunizowanych, a także izolację limfocytów ze śledziony myszy. Dalej znajdziemy opis badania poziomu cytokin w limfocytach izolowanych ze śledziony myszy za pomocą technik: ELISpot, cytometrii przepływowej i metody ELISA. Na koniec opisana została metodyka badania przeciwciał anty- FliD IgG w surowicy i anty- FliD IgA w próbkach kału i GIT.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Uwagi, które nasuwają się w trakcie lektury tej części pracy doktorskiej, dotyczą strony edytorskiej tj. braku tytułów i numeracji części tabel („Materiały” i „Metody”).

Wyniki doświadczeń zostały opisane na 27 stronach i składają się na tę część wyników uzyskane w dwóch zasadniczych etapach:

1. przygotowanie szczepionki w wielu wariantach, opartej na rekombinowanych sporach *B. subtilis* niosących białko FliD *C. difficile* lub FliD i fragment IL-1 $\beta$  i IL-2,
2. ocena odpowiedzi immunologicznej wywołanej przez spory prezentujące białko FliD na modelu zwierzęcym.

Wyniki opisano w 8 podrozdziałach zawierających: 1.) konstrukcję wektorów stosowanych do produkcji białek FliD i CgeA, 2.) wyniki oczyszczenia białek FliD i CgeA oraz uzyskanie surowic anty-FliD i anty-CgeA, 3.) preparatyka spor *B. subtilis* prezentujących na swojej powierzchni antygen FliD, 4.) wykrywanie białka FliD produkowanego przez *B. subtilis* podczas fazy wegetatywnej wzrostu, 5.) wykrywanie fuzji białkowej z różnymi białkami płaszczka spor *B. subtilis*, 6.) określenie wydajności procesu fuzji białkowej w sporach *B. subtilis*, 7.) wykrycie fuzji białkowej na powierzchni spor *B. subtilis* za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, 8.) immunizacja zwierząt laboratoryjnych i ocena odpowiedzi immunologicznej.

W celu uzyskania nadprodukcji białek FliD *C. difficile* oraz CgeA *B. subtilis* Doktorant skonstruował dwa ekspresyjne wektory w szczepie *E. coli* BL21. Źródłem genu *fliD* był szczep o znanym, zsekwencjonowanym całkowicie genomie tj. szczep referencyjny *C. difficile* 630, a źródłem genu *cgeA* był szczep *B. subtilis* 148. Cała procedura została opisana na stronach 61 i 62. Mapy wektorów ekspresyjnych pKH126 i pAN17 przedstawiono na rycinie 8. W celu uzyskania produkcji białka FliD w szczepie *B. subtilis* (fuzja z białkiem płaszczka spor *B. subtilis* lub produkcja białka FliD podczas fazy wegetatywnej wzrostu), Doktorant skonstruował 11 wektorów. Mapy zintegrowanych wektorów Doktorant przedstawił na rycinach 9, 10 i 11. W oparciu o wiedzę dotyczącą budowy i immunogenności białka FliD *C. difficile*, wybrano określony fragment genu *fliD* (86 amino acid residues) (EMBOSS Antigen Program). Jest to najbardziej immunogenny fragment białka FliD. Jak wskazują dane literaturowe wysoki poziom przeciwciał przeciw białku FliD koreluje z bezobjawowym nosicielstwem (Pechine i wsp. 2005). Białka FliD i Cge zostały użyte jako antygeny do immunizacji myszy.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

W kolejnym etapie Doktorant uzyskał prawidłowo eksponowany fragment białka *C. difficile* FliD na powierzchni spor *B. subtilis*, jako wynik fuzji białkowej z białkami płaszczu *B. subtilis*: CotB, CotC, CotG i CotZ. Doktorant zweryfikował obecność białek fuzyjnych w płaszczu spor wariantów BAN01, BAN02, BAN03, BAN04, BAN05 i BAN06 oraz ich lokalizację, ekstrahując białka płaszczu i prowadząc analizy z zastosowaniem właściwych metod. Stosowny schemat przedstawiający warianty fuzji białek płaszczu spor *B. subtilis* z białkiem FLiD *C.difficile* ułatwia czytelnikowi orientację w tak skomplikowanej procedurze (rycina 16 b). Obecność białka FliD w płaszczu rekombinowanych spor (BAN01, BAN02, BAN03, BAN04 i BAN05) potwierdzono stosując metodę immunofluorescencji, ze znakowanymi przeciwciałami anty-FliD. Najsilniejszy sygnał w mikroskopie fluorescencyjnym zaobserwowano w przypadku spor BAN05, chociaż odnotowano fluorescencję wszystkich spor. (rycina 17). Ilość rekombinowanego białka oceniano z zastosowaniem techniki dot-blot.

Dodatkowo Doktorant skonstruował mutanty *B. subtilis*, które mogły produkować białko FliD podczas fazy wegetatywnej wzrostu, co jest istotne ze względu na możliwość kiełkowania spor po podaniu szczepionki dożołądkowo. Doktorant uwzględnił cykl życiowy *B. subtilis* i możliwość wykorzystania ekspozycji FliD na dwa sposoby: na powierzchni spor i podczas fazy wegetatywnej wzrostu. Dodatkowo zostały spreparowane spory niosące podwójną fuzję białkową złożoną z białka płaszczu spor, białka FliD i fragmentu IL-1 $\beta$  (BAN07, BAN08, BAN09 i BAN10).

Na potrzeby eksperymentu badania immunogennych właściwości skonstruowanej szczepionki, przeprowadzono pięć serii śluzówkowej immunizacji myszy BALB/c rekombinowanymi sporami. Jak wyjaśnia Doktorant, część przeprowadzonych immunizacji została zaprojektowana tak, aby można było porównać odpowiedź immunologiczną indukowaną przez rekombinowane spory niosące białko FliD z lub bez dodatku spor eksponujących na powierzchni immunomodulatory (IL-1 $\beta$  i IL-2 (spory BKH121). Doktorant dodatkowo poddał analizie odpowiedź immunologiczną wywołaną przez białko FliD produkowane w fazie wegetatywnej wzrostu *B. subtilis*. Zbadał też czy występują różnice indukcji układu immunologicznego myszy w zależności od sposobu podania szczepionki: dożołądkowo i donosowo. Pan mgr Alessandro Negri analizował ponadto wynik indukcji układu immunologicznego myszy w odpowiedzi na białko FliD w fuzji białkowej płaszczu spor (rekombinantów) i nierekombinowanych spor.

Opis wyników zajął się z metodyką, która jest cytowana w trakcie opisu. Na uwagę zasługuje graficzny obraz przedstawienia wyników badań w postaci licznych rycin.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Dyskusja została zawarta na 8 stronach dysertacji. Jak zauważa Doktorant większość szczepionek, które wcześniej skonstruowano, opiera się na odzjadliwionych białkach toksyn A i B. Chociaż należy uzupełnić, że inne warianty szczepionki również brane są pod uwagę, jak chociażby polisacharyd PS-2 *C. difficile* skoniugowany z toksoidem błoniczym.

Jak zauważa Doktorant stworzenie szczepionki immunizującej dośluzówkowo byłoby optymalnym rozwiązaniem chroniącym przed kolonizacją *C. difficile*. Przemawiają za tym przesłanki: udział białka FliD w procesie kolonizacji, wysoka immunogenność tego białka potwierdzona w różnych badaniach, wysoki stopień konserwacji białka FliD, co jest ważnym atutem brany pod uwagę w wyborze tego antygeny przez Doktoranta.

Wybór białka immunogennego FliD podyktowany został również wiedzą na temat heterogenności populacji szczepów *C. difficile*, o czym pisze Doktorant w Dyskusji. Obserwuje się duże różnice w budowie regionu tzw. Pathogenicity Locus (Paloc) kodującego białka toksyn A i B, co w konsekwencji może prowadzić do różnic w budowie antygenowej toksyn A i B *C. difficile* pochodzących z różnych szczepów należących do różnych toksynotypów.

Doktorant w pierwszym etapie badań nad szczepionką doustną skonstruował sześć różnych wektorów niosących gen *fliD*. Chimery powstały na skutek fuzji sekwencji kodującej większy fragment immunogeny białka FliD z sekwencją białek płaszcza spor. Integracja genów w komórkach *B. subtilis* doprowadziła do uzyskania 6 różnych wariantów szczepów *B. subtilis*: BAN01 (CptB-FliD), BAN02 (CotC-FliD), BAN03 (CotG-FliD), BAN04 (CotZ-FliD), BAN05 (CotB-linker FliD) i BAN06 (Cge-FliD). Szczep BAN05 wykazał bardziej efektywną prezentację powierzchniową antygeny FliD w porównaniu do wszystkich pozostałych wariantów spor *B. subtilis*. Jak zauważa Doktorant wprowadzenie różnych dodatkowych sekwencji nie skutkowało niekorzystnymi zmianami, jak obniżenie procesu sporulacji i germinacji w stosunku do szczepu *B. subtilis* 148.

Należy zauważyć, że część wyników badań nad szczepionką przeciw *C. difficile* (uzyskanie rekombinowanych spor BAN01, BAN02, BAN03, BAN04 i BAN05) Doktorant opublikował w pracy pt. „Expression and display of *Clostridium difficile* protein FliD on the surface of *Bacillus subtilis* spores” autorów Negri A, Potocki W, Iwanicki A, Obuchowski M, Hinc K. J Med Microbiol. 2013;62:1379-85. doi: 10.1099/jmm.0.057372. Doktorant jest pierwszym autorem tej pracy.

W kolejnym etapie spory szczepów BAN02 i BAN05 podano dożołądkowo grupie myszy. Wybór szczepów związany był z dobrą ekspozycją białka FLiD (BAN05) na powierzchni spor i najwyższą efektywnością (BAN02). Obserwacje poczyniono w kierunku INT- $\gamma$  i IL-4. Doktorant zaobserwował





WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

znaczący wzrost INT- $\gamma$  po podaniu myszom spor rekombinowanych BAN05 w porównaniu do grupy kontrolnej, immunizowanej dzikim szczepem. Doktorant nie zaobserwował podobnego efektu po podaniu szczepu BAN02. Nie wykrył przeciwciał anti-FliD IgG w surowicy u myszy immunizowanych po podaniu rekombinantów, co może sugerować aktywację odpowiedzi komórkowej. Ponadto brak IL-4 wskazuje na odpowiedź komórkową. IL-4 odgrywa znaczącą rolę w odpowiedzi humoralnej. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy wskazując na stymulację odpowiedzi komórkowej przez rekombinanty *B. subtilis*.

Podczas drugiej immunizacji Doktorant zastosował dwa inne warianty genetyczne *B. subtilis* tj. BAN03 i BAN06 i uzyskał inny wzór cytokin niż w poprzednim doświadczeniu, a mianowicie spadek INT- $\gamma$  i IL-10 a wzrost IL-17i IL-6. Uzyskane wyniki Doktorant sprawnie dyskutuje i stwierdza, że taki profil cytokin wskazuje na przesunięcie w kierunku Th17, co może świadczyć o aktywacji odpowiedzi zapalnej.

Doktorant immunizował myszy również donosowo. Przeprowadzone analizy wskazują na większą skuteczność immunizacji donosowej w stosunku do dożołądkowej, szczególnie w przypadku podania zwierzętom spor nierekombinowanych.

W niniejszej pracy potwierdziły się wyniki badań innych autorów, że spory eksponujące na swojej powierzchni białko FliD mogą być potencjalnie wykorzystane w przyszłości jako szczepionka przeciwko CDI. Jak zauważa Doktorant, szczepy *B. subtilis* mają właściwości probiotyczne. A zatem można by zastosować rekombinanty szczepu probiotycznego z antygenem FliD, co dawałoby podwójną ochronę. Jak zauważa Doktorant niezbędna jest optymalizacja potencjału immunogennego takich preparatów.

Warto dodać, że przeciwciała ukierunkowane na elementy powierzchniowe komórek *C. difficile*, biorących udział w kolonizacji i przyleganiu do błony śluzowej jelita grubego (białka powierzchniowe SLPs, białka flagelli (FliC i FliD) i białko ściany komórkowej (Cwp) jak proteaza Cwp84, są obiecującym uzupełnieniem profilaktyki jak i potencjalnym narzędziem terapeutycznym. Zauważyć należy, że wyniki szeregu doświadczeń, w tym w badania *in vivo* na zwierzętach, sugerują, że np. skierowanie przeciwciał przeciw białkom powierzchniowym SLPs *C. difficile* jest racjonalną strategią terapeutyczną przeciwko CDI, a dodatkowo swoiste przeciwciała przeciw SLPs hamują ruchliwość komórek bakterii *C. difficile* w testach *in vitro*. W kilku badaniach potwierdzono, że wici mogą stanowić cel terapeutyczny. W jednym badaniu szczepione myszy białkiem FliC (również rzęskowe) i białkiem FliD wykazały znaczące zmniejszenie kolonizacji przez *C. difficile*.

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Z drugiej strony należy jednak brać pod uwagę to, że nie wszystkie patogenne (czyli toksynotwórcze) szczepy *C. difficile* mają zdolność ruchu czyli nie posiadają wykształconych rzęsek jak np. bezrzęskowe szczepy w obrębie PCR-rybotypu 078 (o dużym potencjale epidemicznym, które są czynnikiem zakażeń u zwierząt i ludzi) czy szczepy hiperepidemiczne 027, które mogą posiadać jedną rzęskę (należy dodać, że szczep referencyjny *C. difficile* 630, użyty do powyższych doświadczeń posiada rzęski ułożone peritrichalnie).

Wyniki opisane w pracy doktorskiej Pana mgr Alessandro Negri wskazują na większą efektywność szczepionki, którą stanowiły spory niosące na powierzchni białko FliD. Po pierwsze, jak zauważa Doktorant, te spory posiadały 8 krotnie więcej białka FliD na swojej powierzchni niż rekombinowane spory *B. subtilis* (fuzja z białkiem CotG). Po drugie na powierzchni spor eksponowane było kompletne białko FliD a nie jego fragmenty.

Podsumowując przebieg Dyskusji uważam, że jest ona poprowadzona w sposób prawidłowy i rzetelny,

Oceniając dokonania Pana mgr Alessandro Negri w obszarze nauki (na podstawie uzyskanych informacji dotyczących osiągnięć naukowych), stwierdzam, że Doktorant aktywnie uczestniczy w życiu naukowym. Świadczy o tym fakt, że jest współautorem dwóch publikacji (w jednej jest pierwszym autorem) i wielu doniesień zjazdowych. Doktorant brał udział w licznych konferencjach i zjazdach krajowych i zagranicznych. Pan mgr Alessandro Negri otrzymał dwukrotnie nagrodę za najlepszy plakat. Jest współautorem patentu "Doustna kompozycja immunogenna przeciwko zakażeniom *Clostridium difficile*, zastosowanie przetrwalników *Bacillus subtilis* jako nośników antygenów oraz wyodrębnione rekombinowane geny kodujące białka płaszczka i antygeny FliD i FdpA", number P. 402193 admitted in date 21.12.2012.

*Na koniec chcę jeszcze raz podkreślić, że Doktorant sprawnie zaplanował i zrealizował swoje zadania badawcze. Posiada bardzo dobry warsztat pracy, posługując się wieloma skomplikowanymi technikami z zakresu biologii molekularnej. Natomiast pewne uwagi poczynione przez Recenzenta nie obniżają wartości naukowej rozprawy doktorskiej.*

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

---

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Rozprawa doktorska Pana mgr Alessandro Negri pt., „Spore based vaccine against pseudomembranous colitis” spełnia wymogi pracy doktorskiej określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14.03.2013 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuk (Dz.U.z 2003 roku., nr 65, poz. 595, Dz.U. z 2005 r., nr 164, poz.1365, Dz.U. z 2011 r., nr 84, poz.455 z późniejszymi zmianami). Uważam, że rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie ze względu na wybór tematu pracy doktorskiej, bardzo dobry warsztat pracy Doktoranta, a także znaczenie poznawcze i praktyczne doświadczeń w zakresie konstrukcji szczepionki przeciw *C. difficile*.

Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (UG i GUMed), o dopuszczenie mgr Alessandro Negri do dalszych etapów przewodu doktorskiego na stopień dr nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

