

Prof. dr hab. Adam Jaworski

Łódź, 29. 02. 2016

Emerytowany profesor zw. Uniwersytetu Łódzkiego

obecnie

Profesor zw. Społecznej Akademii Nauk w Łodzi

90-113 Łódź, ul. Sienkiewicza 9

mobile phone: 607-356-577

e-mail: adam@biol.uni.lodz.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Weroniki. M. Ilczyszyn zatytułowanej:

Genetic diversity of human and animal-associated *Staphylococcus aureus* isolates

based on spa typing and DNA microarray analysis

1. Formalna ocena pracy .

Praca doktorska mgr Weroniki Ilczyszyn została zrealizowana na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Międzobrockiego. Część doświadczeń została wykonana w laboratoriach University of Groningen pod kierunkiem dr Artura Sabata, pełniącego w tym przewodzie obowiązki promotora pomocniczego. Praca została starannie opracowana w formie zwartej monografii (129 stron), napisanej w języku angielskim, w układzie typowym dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych. Na pierwszych kilku stronach monografii Doktorantka zamieściła, w uporządkowany sposób, listę zawartych w pracy rysunków, wykresów, tabel oraz użytych skrótów naukowego słownictwa i nazewnictwa. Zwięźle, aczkolwiek treściwe streszczenia, opracowane w języku angielskim (*Summary*) i polskim, bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w podjęty temat, a podsumowane w nich najważniejsze wyniki zachęcają do głębszej analizy treści kolejnych rozdziałów monografii zatytułowanych: Wstęp (*Introduction*), Cele (*Objectives*), Materiały i Metody (*Materials and Methods*), Wyniki (*Results*), Dyskusja (*Discussion*), Wnioski (*Conclusions*). Za bardzo dobry zabieg uznaję przygotowanie sześciu bardzo dobrze opracowanych, zbiorczych tabel w rozdziale pt. *Supplementary Materials*, w których w uporządkowany i klarowny sposób przedstawiono zróżnicowanie genetyczne zbadanej, bardzo dużej kolekcji szczepów *Staphylococcus aureus* MRSA i MSSA izolowanych od ludzi i zwierząt, które zostało wykryte na poziomie: genotypów *spa*, genów lekooporności oraz genów kodujących czynniki chorobotwórczości. Monografię zamyka spis obficie cytowanych pozycji literatury światowej (*References*), w zdecydowanej większości prac doświadczalnych opublikowanych w ostatnich lat.

1. Ocena części teoretycznej pracy.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałem część teoretyczną monografii skonstruowaną przez Doktorantkę w postaci 5 logicznie uporządkowanych, zwartych rozdziałów. Mogę stwierdzić, że treści kolejnych rozdziałów zostały ściśle podporządkowane tematowi i sformułowanym celom pracy doktorskiej. I tak, w pierwszym rozdziale Doktorantka ogólnie scharakteryzowała bakterie *Staphylococcus aureus* jako jeden ze składników normalnego

mikrobiomu ludzi i zwierząt, z drugiej zaś strony jako oportunistyczne, patogenne bakterie odpowiedzialnego na całym świecie za bardzo częste i groźne infekcje ludzi i zwierząt. Drugi rozdział jest podsumowaniem obecnej wiedzy na temat mobilnych elementów genetycznych *Staphylococcus aureus* (ang. *MGE*) i mechanizmów odpowiedzialnych za horyzontalny transfer genów (ang. *HGT*), z podkreśleniem roli w tym procesie bakteriofagów i zjawiska transdukcji fagowej. W dwóch kolejnych rozdziałach z dużym znawstwem opisano, odpowiednio, czynniki chorobotwórczości bakterii oraz geny i mechanizmy oporności gronkowców na antybiotyki.

Można zatem powiedzieć, że w wymienionych wyżej 4 rozdziałach części teoretycznej pracy doktorskiej mgr Weronika Ilczyszyn w oparciu o najnowsze prace literatury światowej scharakteryzowała obiekt swoich badań, bakterie Staphylococcus aureus. Przedstawione dane dotyczące: problemu i skali zakażeń ludzi i zwierząt, czynników i mechanizmów chorobotwórczości szczepów, narastającego problemu oporności na antybiotyki, dużej zmienności adaptacyjnej szczepów i zjawiska selekcji - stanowią silne uzasadnienie podjętego w pracy doktorskiej tematu jako poważnego wyzwania naukowego

W stosunkowo obszernym, piątym rozdziale części teoretycznej pracy Doktorantka bardzo skrupulatnie opisała nowoczesne, różnorodne metody i techniki molekularne, stosowane w specjalistycznych laboratoriach do genotypowania izolatów *Staphylococcus aureus* dla potrzeb szybkiej i pewnej diagnostyki, taksonomii i epidemiologii. Szczególną uwagę Doktorantka poświęciła technice genotypowania (ang. *spa typing*), z wykorzystaniem regionu genu *spa* kodującego powierzchniowe białko A *Staphylococcus aureus* (ang. *surface protein A*) jako docelowej tarczy w reakcji PCR oraz technice z wykorzystaniem mikromacierzy (ang. *DNA-microarray based typing*), z wykorzystaniem komercyjnej mikromaciwerzy (ang. *Staphy Type, Alere Technologies*). Obie wymienione wyżej techniki Doktorantka zastosowała z bardzo dużym powodzeniem w realizacji nakreślonych celów pracy, to jest głębokiego różnicowania genomów badanej kolekcji szczepów *Staphylococcus aureus*. W ostatnich podrozdziałach tej części *Wstępu* mgr Weronika Ilczyszyn przedstawiła, po pierwsze, bardzo interesujące dane literaturowe, z ostatnich 2-3 lat, na temat klonalnego zróżnicowania genetycznego szczepów MRSA i MSSA oraz udziału określonych klonów w epidemicznych i pandemicznych zakażeniach w Europie, USA i w Azji. Po drugie, opisała znane różnice oraz podobieństwa w strukturze klonalnej pomiędzy szczepami izolowanymi od ludzi i zwierząt, z podkreśleniem nabytych zdolności adaptacyjnych określonych klonów w stosunku do nosicieli.

W moim przekonaniu to bardzo istotna część Wstępu, bowiem dyskutowane w tej części dane literatury światowej opisane stały się ważnym odniesieniem dla analizy własnych rezultatów oraz dla sformułowania końcowych wniosków na temat zróżnicowania struktury klonalnej szczepów Staphylococcus aureus krążących w Polsce oraz epidemiologii zakażeń tym groźnym patogenem ludzi i zwierząt w naszym kraju.

2. Cele pracy.

Na stronie 23 mgr Weronika Ilczyszyn pisze, że kierunkowym celem pracy doktorskiej były badania profili genetycznych oraz zróżnicowania genetycznego 337 szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych w latach 2008-2014 od ludzi, zwierząt oraz ze środowiska szpitalnego. Analizie poddano 178 ludzkich, 144 zwierzęcych i 11 środowiskowych izolatów pochodzących głównie z Polski oraz 4 szczepy referencyjne. Analizy zdecydowano się przeprowadzić w podgrupach, a) MRSA i MSSA (odpowiednio, obecność lub brak genu *mecA*), b) ze względu na pochodzenie izolatów (izolaty ludzkie vs izolaty zwierzęce). Sformułowany cel pracy należy uznać za bardzo ambitny, a zgodnie z moją wiedzą także za unikatowy w Polsce - ze względu, po pierwsze, na dużą liczbę szczepów *Staphylococcus aureus* poddanych analizie, pod drugie, ich pochodzenia z różnych

środowisk, i po trzeciej, z uwagi na zastosowanie dwóch bardzo nowoczesnych technik molekularnych. I tak, technika genotypowania *spa* umożliwiła bardzo głębokie genotypowanie szczepów w oparciu o amplifikację, a następnie sekwencjonowanie repetytywnej, polimorficznej sekwencji genu kodującego syntezę białka A, zaś oprogramowanie *Ridom Staph Type* pozwoliło na pewną identyfikację genotypów *spa* w całej badanej kolekcji. Natomiast zastosowanie mikromacierzy, to jest specyficznego systemu hybrydacyjnego (*Staphy Type system*), umożliwiło detekcję w genomach badanych izolatów genów lekooporności na antybiotyki oraz genów kodujących wiele białek komórkowych, enzymatycznych, toksyn, składników ściany komórkowej; w sumie jednoczesną detekcję ponad 330 markerów. Stad, uzyskane wyniki hybrydacji, analizowane przy pomocy specjalistycznego oprogramowania i analizy statystycznej (test Fisher'a), pozwoliły na identyfikację nie tylko określonych klonów i kompleksów klonalnych, ale także na ustalenie różnic i podobieństw w rozpowszechnieniu genów lekooporności oraz bardzo wielu innych genów, w tym markerów wirulencji, w grupie szczepów ludzkich, zwierzęcych i środowiskowych

Zrodziło się w tym miejscu moje pytanie o rolę biologiczną sekwencji repetytywnej, zlokalizowanej w regionie genu spa kodującego syntezę białka powierzchniowego A Staphylococcus aureus, użytej w ocenianej pracy doktorskiej jako sekwencji bardzo przydatnej w głębokim genotypowaniu izolatów Staphylococcus aureus.

3. Materiały i Metody. Materiały i Metody.

Nie mam żadnych zastrzeżeń i uwag do metodycznej części monografii. Użyte dla realizacji celów pracy materiały, w tym zgromadzona bardzo duża i różnorodna kolekcja izolatów *Staphylococcus aureus* z Polski i innych krajów europejskich, a także zastosowane metody molekularne i techniki oraz komputerowe programy obliczeniowe i testy statystyczne zostały wystarczająco dokładnie opisane na 20 stronach tej części monografii, co pozwala zainteresowanym czytelnikom monografii analizować w szczegółach całą metodykę przeprowadzonych badań, w celu zaadaptowania jej ewentualnie dla realizacji własnych celów badawczych.

4. Wyniki.

Znakomicie opracowany rozdział na 40 stronach monografii obejmuje zwięzłe omówienie oraz pełną dokumentację uzyskanych wyników, przedstawioną w postaci bardzo dobrze przemyślanych tabel i dendrogramów filogenetycznego pokrewieństwa, które obrazują zróżnicowanie genetyczne poszczególnych grup badanych szczepów *Staphylococcus aureus*. Nie dostrzegam potrzeby szczegółowego oceniania „morza” wyników przedstawionych przez Doktorantkę w tym rozdziale. Wyniki te zostały poddane następnie krytycznej analizie, na tle danych literatury światowej, w profesjonalnie napisanej *Dyskusji* oraz umiejętnie podsumowanych w końcowych podrozdziałach monografii zatytułowanych: *Limitation and Summary*. Ponadto wiem, że najważniejsze wyniki opisane w monografii są przesłane do druku w postaci zespołowej pracy pt. „*Clonal structure and characterization of Staphylococcus aureus strains from invasive infections in pediatric patients from South of Poland: association between age, spa types, clonal complexess, and genetic markers*”, w której mgr Weronika Ilcyszyn jest pierwszym autorem. W tej sytuacji chciałbym skomentować jedynie niektóre sformułowane w pracy ogólne wnioski, które dla mnie wydają się interesujące z racji poznawczych. I tak, za bardzo interesujący wniosek uznaję stwierdzenie, że izolaty *Staphylococcus aureus* zakwalifikowane jako MSSA charakteryzują się znacznie większym zróżnicowaniem genetycznym niż izolaty grupy MRSA, odznaczające się bardzo wysoką klonalnością. Co więcej, okazało się, że szczepy zwierzęce są bardziej

zróżnicowane genetycznie niż szczepy ludzkie. W ludzkich szczepach MRSA zaobserwowano natomiast znacznie wyższą częstość występowania genów odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki oraz genów wirulencji niż w szczepach izolowanych od zwierząt. Komentowane wyniki wskazują na istnienie silnego związku pomiędzy profilem genetycznym szczepów a mechanizmami kolonizacji i zakażenia określonego gospodarza (człowieka lub zwierzęcia). Za bardzo interesujący i ważny z racji epidemiologii zakażeń uznaję wyniki wskazujące jednoznacznie na możliwość transmisji ludzkich epidemicznych szczepów do zwierząt. W jednym z wniosków mgr Weronika Ilczyszyn stwierdza: *“The associations between strains genetic profile and host specificity (human vs animal) were identified emphasizing necessity of research on mechanisms of hosts and microbe matching”*. Chciałbym prosić Doktorantkę o zaproponowanie w czasie obrony pracy doktorskiej ogólnej strategii takich, moim zdaniem, bardzo interesujących badań poznawczych. W ostatnim zaś wniosku pisze natomiast *“The current findings should be further verified on combined on clinical and veterinary populations”* Proszę o bliższe wyjaśnienie wyrażonej myśli.

Reasumując, bardzo dobrze zaplanowane badania, zrealizowane przez mgr Weronikę Ilczyszyn przy zastosowaniu nowoczesnych „narzędzi” molekularnych, przyniosły mnóstwo bardzo wiarygodnych wyników poznawczych, ważnych dla:

Po pierwsze, epidemiologicznych dochodzeń zakażeń ludzi i zwierząt w Polsce określonymi genotypami/klonami Staphylococcus aureus,

Po drugie, ustalania stopnia zróżnicowania genetycznego szczepów i udziału w tym procesie mechanizmów horyzontalnej transmisji genów oraz rozpowszechnienia w niej genów lekooporności i wirulencji.

Po trzecie, analizy powiązań i wzajemnych zależności patogen-gospodarz.

Podzielam więc opinię mgr Weroniki Ilczyszyn, wyrażoną w ostatnim zdaniu w Streszczeniach: „Wyniki otrzymane w zrealizowanym projekcie mają dużą wartość, gdyż wnoszą poważny wkład do wiedzy o zróżnicowaniu genetycznym gronkowców oraz o mechanizmach zakażeń oportunistycznych u ludzi i zwierząt”.

Wniosek końcowy

Uważna analiza całej monografii doktorskiej, w tym szczególnie tematu i celów pracy doktorskiej, upoważnia mnie do stwierdzenia, że mgr Weronika M Ilczyszyn podjęła bardzo aktualny, ważny temat o charakterze poznawczym, a sformułowane cele pracy należy uznać za poważne wyzwanie naukowe. Wyniki, uzyskane przy zastosowaniu nowoczesnych „narzędzi” molekularnych i genetycznych, zaliczam do bardzo wartościowych i w pełni wiarygodnych. W znacznej części odczytuję je jako oryginalne, unikatowe w Polsce osiągnięcie naukowe Doktorantki i Promotorów tej bardzo dobrej pracy doktorskiej. Z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Weroniki M Ilczyszyn do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także do Wysokiej Rady Wydziału o rozważenie możliwości stosownego wyróżnienia pracy doktorskiej mgr Weroniki Ilczyszyn uwagi na jej wartość naukową potwierdzoną publikacjami w czasopismach naukowych z listy JCR, w tym w PlosOne.

