



UNIwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Miecznikowa 1, 02-945 Warszawa



Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Warszawa, 14. 02. 2016 r.

Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Ocena pracy doktorskiej mgr Weroniki Ilczyszyn pt. "Zróżnicowanie genetyczne ludzkich i zwierzęcych izolatów *Staphylococcus aureus* na podstawie typowania spa oraz analizy mikromacierzy DNA"

Praca doktorska Pani mgr Weroniki Ilczyszyn została w większości wykonana w pracowniach Zakładu Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ pod kierunkiem Pana Profesora dr. hab. Jacka Międzobrodzkiego. Część wyników doktorantka uzyskała podczas stażu naukowego w laboratorium kierowanym przez prof. Alexa Friedricha w University Medical Center w Groningen w Holandii. Z tego powodu bezpośredni opiekun tej części pracy, Dr Artur Sabat został powołany na promotora pomocniczego w dysertacji, a praca doktorska napisana została w języku angielskim. Współpraca obydwu ośrodków naukowych w zakresie badań nad molekularnymi podstawami patogenezы i patomechanizmem zakażeń oportunistycznych wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* pozwoliło na realizację programu badawczego prowadzącego do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej. Podjęty przez Panią mgr Ilczyszyn temat jest ważny i aktualny, albowiem szczepy *S. aureus*, zwykle odporne na antybiotyki, są obecnie ważnym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych o przebiegu lokalnym lub systemowym. Dlatego też niezwykle istotnym staje się zasadniczy cel pracy prowadzący do szczegółowej analizy zróżnicowania genetycznego kolekcji gronkowca złocistego typu MRSA oraz ustalenia źródła pochodzenia tych niezwykle groźnych dla zdrowia i życia drobnoustrojów. Osiągnięcie postawionego celu wymagało zastosowania przez Doktorantkę zastosowania dwóch molekularnych metod oceny pokrewieństwa: typowanie spa oraz analizę mikromacierzy DNA. Okazało się, że typowanie spa pozwoliło na zsekwencjonowanie odcinków repetytywnych DNA polimorficznego regionu genu X kodującego białko A. Odpowiedni program (Ridom, GmbH) pozwolił

na identyfikację typów regionu spa. Natomiast użycie mikromacierzy DNA wraz z zestawem diagnostycznym StaphyType pozwoliło na wnioski natury epidemiologicznej jak i diagnostycznej, ponieważ użycie zestawu dało możliwość jednoczesnej analizy 330 istotnych dla patogena markerów (odpowiednik ponad 180 genów i ich form allelicznych, genów istotnych determinant patogenezы i wirulencji gronkowca).

Zastosowany program analityczny pozwolił na ocenę statystyczną i wykazanie różnic w występowaniu wybranych genów wirulencji i oporności w podgrupach badanych szczepów: z obecnością lub brakiem genu *mecA* (MRSA vs MSSA) oraz pochodzących od ludzi i zwierząt (human-associated vs animal-associated).

Podsumowując uzyskane wyniki należy wskazać, iż największe osiągnięcia pracy to wykazanie obecności ponad 100 różnych typów spa i wykrycie 11 nowych oraz identyfikacja 66 izolatów niosących kasetę SCCmec zawierającą gen *mecA*, który warunkuje oporność gronkowców na metycylinę i prawie wszystkie antybiotyki β -laktamowe. Bardzo istotnym efektem wykonanych badań była ocena występowania kombinacji spa z kasetami opornościowymi typu SCCmec, szczególnie w aspekcie pochodzenia szczepu zwierzęcego czy ludzkiego. Niezwykle ważne z punktu widzenia epidemiologicznego było wykazanie, iż wśród izolatów ludzkich znacząco częściej występują geny warunkujące oporność na antybiotyki m.in. *mecA*, *blaZ/R/I* i *erm(A)*, jednakże w obrębie całej kolekcji zawartość determinant antybiotykooporności była stosunkowo niska. Wielolekowa oporność charakteryzowała również częściej izolaty zaklasyfikowane jako MRSA. Istotną informacją o dużym znaczeniu poznawczym jest też to, że w grupie MRSA znacznie częściej występowały markery wirulencji w postaci genów kodujących enterotoksyny gronkowcowe (*sea*, *sed*, *sej*, *ser*, klaster *egc*) oraz czynniki zaburzające odpowiedź immunologiczną (*scn*, *sak*, *chp*), toksyna szoku toksycznego 1 (TSST-1, *tst1*) oraz proteazy serynowe (*splA*, *splB*, *splE*). Doktorantka opisała i skomentowała cały szereg innych znaczących różnic między szczepami pochodzącymi od różnych gospodarzy. Zastosowanie pewnych i potwierdzonych metod badawczych pozwoliło na wyciągnięcie uprawnionych wniosków. Wszystkie dane uzyskane w tej pracy wnoszą nowe wartości do wiedzy o gronkowcu złocistym. Do ogólnych wniosków o wielkim znaczeniu dla wiedzy o *Staphylococcus* należy wykazanie, iż zbadała kolekcja szczepów bakteryjnych posiada zarówno duże zróżnicowanie jak i istnienie dominujących genotypów *S. aureus*. Izolaty zaklasyfikowane jako MRSA cechowała

wysoka klonalność, natomiast izolaty MSSA wykazywały duże zróżnicowanie genetyczne. Również w stosunku do nosicieli, szczepy zwierzęce były dużo bardziej zróżnicowane w porównaniu do izolatów ludzkich. Zaobserwowane w niniejszej pracy częstości genotypów oraz zawartości determinant antybiotykooporności wskazują na istnienie różnic pomiędzy izolatami ludzkimi a zwierzęcymi, aczkolwiek zwierzęta domowe i hodowlane wykazują podatność na infekcje epidemicznymi szczepami MRSA. Wyniki otrzymane w zrealizowanym projekcie badawczym mają dużą wartość, gdyż wnoszą poważny wkład w badaniach nad zróżnicowaniem genetycznym gronkowców oraz poznawaniu mechanizmów zakażeń oportunistycznych u ludzi i zwierząt. Należy w tym momencie dodać, iż praca nad biologią i patogenezą zakażeń gronkowcami ma ją już dużą tradycję w Zakładzie Mikrobiologii, gdzie pod kierunkiem Pna Profesora Międzobrodzkiego od wielu lat realizowane są projekty badawcze ściśle związane z tą tematyką. Dlatego też wybór tematu i jakość prowadzonych prac przez doktorantkę nie pozostawia wątpliwości, iż prowadzone są one w doskonałym, światowej klasy ośrodku naukowym. Również ścisła współpraca z ośrodkiem holenderskim pozwoliła na uzupełnienie tez rozprawy doktorskiej o najnowsze rozwiązania z zakresu diagnostyki i biologii molekularnej. Pani mgr Ilczyszyn jako doktorantka od początku studiów doktoranckich bierze czynny udział jako wykonawca w projektach badawczych, jest też kierownikiem i głównym wykonawcą grantu MNiSW w ramach badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich. Należy podkreślić, iż Doktorantka w pełni wykorzystała możliwości dane Jej przez Uczelnię i współpracujące z nią ośrodki naukowe.

Rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, t.j. w skład jej wchodzi kolejno: streszczenie, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja i spis cytowanej literatury oraz wnioski końcowe. Ze względu na pochodzenie promotora pomocniczego praca napisana jest w języku angielskim. Część eksperymentalna pracy jest poprzedzona obszernym wstępem, który został opracowany na podstawie bogatego piśmiennictwa. Bardzo obszerne w pracy są też części: metodyczna oraz wynikowa, co wynika między innymi z faktu, iż dla rozwiązania problemów z konieczności zastosowano szereg wypróbowanych i znanych metod z zakresu biologii molekularnej i mikrobiologii. Dane eksperymentalne udokumentowane są za pomocą 15 rycin i 22 tabel. Otrzymane wyniki wnikliwie omówiono w dyskusji. Spis literatury jest także obszerny, obejmuje ponad 200 pozycji. Oceniana rozprawa doktorska nie zawiera

błędów merytorycznych. Jej ocena wydaje się nie być sprawą trudną, skoro część wcześniej uzyskanych przez doktorantkę wyników weszło w skład prac oryginalnych opublikowanych w renomowanych czasopiśmie z listy filadelfijskiej, takich jak Nature Co., FEMS Microbiol. Lett., Plos One, J.Vet.Sci. czy JAC. Doktorantka jest też współautorem wniosku patentowego dotyczącego typowania i identyfikacji bakterii z rodzaju Staphylococcus. Wyniki badań Doktorantki były też przedstawiane na 6 krajowych i międzynarodowych zjazdach naukowych, a także 2 razy prezentowane ustnie na konferencji Diagnmol w Warszawie. Zaprojektowanie eksperymentów i uzyskanie w wyniku ich realizacji tak wielu wartościowych rezultatów na pewno świadczy o dojrzałości badawczej doktorantki. Wykonanie większości eksperymentów wymagało opanowania skomplikowanych metod badawczych, a także stworzenia wielu układów badawczych oraz dobrego przygotowania w zakresie mikrobiologii i biologii molekularnej. Część eksperymentalna rozprawy pozwoliła na weryfikację wcześniej zakładanych hipotez badawczych. Do największych osiągnięć pracy, o dużym znaczeniu aplikacyjnym w zakresie opracowania skutecznej diagnostyki zakażeń gronkowcowych należy zaliczyć udaną próbę zastosowania mikromacierzy do oceny funkcjonowania patogenu podczas procesu infekcji bakteryjnej. Wykorzystanie i potwierdzenie metody, która pozwala na jednoznaczną ocenę groźnej i lekoopornej bakterii patogennej otwiera nowe możliwości badawcze i wyznacza nowe kierunki badań w zakresie diagnostyki groźnych patogenów bakteryjnych. Mocną stroną ocenianej rozprawy jest też świetnie przeprowadzona wielowątkowa dyskusja wyników, podczas której autorka na podstawie uzyskanych wyników sugeruje dobrze podparte pozycjami literatury wnioski prowadzące do wyjaśnienia nowych danych dotyczących oceny lekoopornych szczepów gronkowca prosty opis wielu skomplikowanych procedur, a także proste i logiczne wyjaśnienia. Powyżej przedstawione elementy także przyczyniają się do mojej wysokiej oceny przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Biorąc przedstawione powyższe argumenty pod uwagę uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Weroniki Ilczyszyn spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę także o stosowne wyróżnienie tej bardzo cennej i ważnej pod kątem aplikacyjnym dysertacji.

Warszawa, 14. 02. 2016 r.

Prof. dr hab. Jacek Bielecki

