

Warszawa, 22.02.2023 r.

prof. dr hab. n. med. Anna Lutyńska
Narodowy Instytut Kardiologii Stefana kardynała Wyszyńskiego -
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Biologii Medycznej
ul. Alpejska 42
04-628 Warszawa
alutynska@ikard.pl

Ocena rozprawy mgr inż. Dariusza Stanisława Jarych pt. Molekularne analizy genomowe patogennych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*

Praca doktorska mgr inż. Dariusza Stanisława Jarych pt. Molekularne analizy genomowe patogennych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* na Stopień Naukowy Doktora Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu w Dyscyplinie Nauki Medyczne została wykonana pod kierownictwem promotora - prof. dr hab. Pawła Parniewskiego oraz promotora pomocniczego - dr inż. Marty Majchrzak w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi w 2022 r.

Praca posiada charakter obszernej monografii (168 stron) przygotowanej w typowy sposób dla prac doświadczalnych w dziedzinach nauk biologicznych i medycznych. Praca obejmuje streszczenie w j. polskim oraz j. angielskim, wstęp (31 stron), założenia i cele pracy, materiały (5 stron), metody (9 stron), wyniki (48 stron), wnioski, dyskusję (9 stron), podsumowanie w j. polskim i j. angielskim, wykaz publikacji, wykaz polskich i zagranicznych konferencji naukowych, bibliografię oraz załącznik zawierający szczegółową dokumentację wyników pracy doktorskiej. Poza wstępem, który jest moim zdaniem zbyt obszerny, zachowane są odpowiednie proporcje między częściami teoretyczną, doświadczalną i dyskusją. Zacytowane piśmiennictwo jest właściwie dobrane; liczy 148 pozycji; z czego 31 stanowią prace opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat, a 39 prace opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat.

W obszernym wstępie doktorant przedstawił pełną charakterystykę obu gatunków poddanych typowaniu, włącznie z budową, potencjalnymi środowiskami bytowania, cechami genomu, czynnikami zjadliwości oraz wrażliwością na antybiotyki. W przypadku *P. aeruginosa* szczegółowo opisane zostały także zjawiska tj. mechanizm *quorum sensing*, rola czynników sigma, sposoby przekazywania sygnału, układy sekrecyjne oraz znaczenie kliniczne w szczególności odnośnie mukowiscydozy. W przypadku pałeczek *E. coli* doktorant dokładnie omówił klasyfikację serologiczną i filogenetyczną w odniesieniu do zróżnicowanych czynników zjadliwości oraz wywoływanych zakażeń. Ostatni podrozdział wstępu stanowi podsumowanie dotychczas opracowanych oraz powszechnie stosowanych fenotypowych oraz molekularnych metod typowania na potrzeby badań taksonomicznych oraz dochodzeń epidemiologicznych. Domyślam się, że przedstawienie tak szczegółowej charakterystyki obu gatunków badanych drobnoustrojów wynikało z potrzeby uzasadnienia przez doktoranta ich poważnego znaczenia klinicznego. Doktorant bowiem do analiz wybrał 124 uropatogennych szczepów *E. coli* (UPEC) wyizolowanych od pacjentów Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Łodzi i 8 szczepów wytwarzających toksynę Shiga (STEC) wyizolowanych od pacjentów w Niemczech w latach 2011-2012 oraz 63 izolaty *P. aeruginosa* pozyskane od ośmiu pacjentów z mukowiscydozą hospitalizowanych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Doktorant określił następujące cele rozprawy: (1) ulepszenie metodyki różnicowania patogennych szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli* techniką TRS-PCR oraz

porównania nowej metodyki TRS-PCR z metodą VNTR-MLVA dla szczepów *P. aeruginosa* oraz z metodą MLST dla szczepów *E. coli*.

W tym miejscu chciałabym zadać pytanie doktorantowi czy były również inne przesłanki w wyborze obiektu badawczego, czy przeprowadzono analizę powiązań epidemiologicznych między izolatami danego gatunku przed wykonaniem badań i czy wykluczono z analiz szczepy powiązane epidemiologicznie celem uniknięcia błędów szacowania genetycznego podobieństwa, w jaki sposób biobankowano szczepy i na jakim pasażu wykonano izolację DNA i badania molekularne?

Zastosowane metody typowania molekularnego izolatów *P. aeruginosa* metodami TRS-PCR versus VNTR-MLVA oraz izolatów *E. coli* metodami TRS-PCR versus MLST zostały dobrane prawidłowo. Otrzymane wyniki wskazują, że zastosowanie numerycznego systemu oznakowania profili prowadzących do wyróżnienia klas i grup wśród badanych klinicznych szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* podczas genotypowania metodą TRS-PCR umożliwiło uzyskanie większej zdolności różnicującej niż klasyczna analiza określania genetycznego podobieństwa z zastosowaniem analizy klastrów (np. wyróżnionych przez zastosowanie oprogramowania Bionumerix), w tym wyższej niż metody obecnie powszechnie zaakceptowane i stosowane do genotypowania obu gatunków, tj. odpowiednio: MLST określające typy sekwencyjne genów kodujących szlaki metabolizmu podstawowego oraz VNTR-MLVA umożliwiające wyróżnienie charakterystycznych genotypów o zmiennej liczbie powtórzeń tandemowych.

Chciałabym podkreślić, że wyniki są bardzo dobrze udokumentowane, a w realizacji pracy zastosowano alternatywne niż powszechnie stosowane w laboratoriach referencyjnych metody genotypowania, tj. oparte na polimorfizmie trójnukleotydowych sekwencji powtórzonych wykrywanych z zastosowaniem metody PCR [np. startera N6(CAC)4 w różnicowaniu uropatogennych szczepów *E. coli*].

Doktorant przeprowadził badania powtarzalności metody TRS-PCR (w 3 układach profilowania z zastosowaniem różnych starterów: GTG-PCR, CGG-PCR oraz CAC-PCR), wyznaczając punkty odcięcia dla izolatów określonych jako identyczne (w zakresie 95%). Interesujące jest, czy doktorant w swoich badaniach stosował szczepy referencyjne lub szczepy kontrolne, które powinny być umieszczane co 4-5 ścieżce na żelu, co nie tylko umożliwi właściwe pozycjonowanie wszystkich profili badanych izolatów również w analizie klastrów wykonywanej z użyciem oprogramowania Bionumerix, a także pozwala na wyznaczenie powtarzalności wewnątrz- i między-żelowej. Analiza genotypowania 124 izolatów UPEC z zastosowaniem pojedynczego systemu genotypowania CAC-TRS, GTP-PCR oraz CGC-PCR pozwoliła doktorantowi wyróżnić odpowiednio 52, 86 i 99 klastrów, natomiast kompilacja wyników trzech testów TCR-PCR pozwoliła na wyróżnienie 111 unikatowych profili. W innym miejscu doktorant podsumował, że oznakowanie profilu genotypowania każdego unikatowego izolatu *E. coli* numerem dla każdej z klas TRS-PCR (CAC-, GTG- i CGG-PCR), pozwoliło na wyróżnienie 121 unikatowych szczepów, różniących się co najmniej w jednej klasie (dokumentacja doktoranta wskazuje, że było ich 121, a nie 111, ja wymieniono powyżej). Doktorant dokonał porównania otrzymanych wyników typowania/klasteryzacji metodą TRS w porównaniu do zaakceptowanej w typowaniu *E. coli* metody MLST wskazując na podobną siłę różnicującą, z możliwością większego zróżnicowania niektórych izolatów o identycznych profilach ST. Niewątpliwie system genotypowania TRS jest technicznie prostszy do wykonania w laboratoriach przeprowadzających rutynowo dochodzenia epidemiologiczne, przy czym wydaje się, że może on posiadać większy potencjał różnicowania przy odpowiednim doborze starterów (tj. przetestowaniu innych możliwości), umożliwiając „głębsze” zróżnicowanie izolatów o identycznym profilu ST.

Niewątpliwym osiągnięciem pracy doktorskiej jest zastosowanie przez doktoranta po raz pierwszy techniki CGG- i GTC-PCR do określania genetycznego zróżnicowania kolekcji klinicznych szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych od pacjentów z mukowiscydozą. Niewątpliwie, w/w badana grupa izolatów stanowi unikatową kolekcję do badań genetycznej zmienności szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą, tym bardziej że reizolacja identycznego szczepu w trakcie choroby świadczy o identycznym źródle zakażenia. Z jednej strony zatem, należałoby określić genetyczne podobieństwo w grupie szczepów niepowiązanych epidemiologicznie, a następnie ocenić możliwości śledzenia zmienności izolatów pozyskanych w trakcie choroby z naciskiem na zwiększenie potencjału zróżnicowania izolatów określonych jako identyczne w dotychczas zaakceptowanych standardach genotypowania tj. VNTR-MLVA czy PFGE przez zastosowanie technik nowych, alternatywnych. W badanej grupie genotypowanych szczepów *P. aeruginosa*, analiza genetycznego podobieństwa otrzymanych profili metodami CGG-PCR oraz GTC-PCR, umożliwiła przyporządkowanie 63 badanych izolatów do 26 klastrow, a po oznakowaniu numerycznym profili i uśrednieniu obu metod, izolaty zakwalifikowano do 40 grup TRS-PCR, różniących się co najmniej w jednej klasie. Nie jest zatem zaskakujące, że w grupie izolatów *P. aeruginosa*, z których część powinna być wyłączona z analizy jako szczepy powiązane epidemiologicznie, doktorant zidentyfikował 25 unikatowych profili TRS-PCR oraz 15 kompleksów, zawierających dwa lub więcej izolatów. To przypuszczenie potwierdzają wyniki analizy VNTR-MLVA, gdzie doktorant potwierdził wyodrębnienie 26 grup MLVA wśród 63 izolatów *P. aeruginosa*. Kompilacja typów MLVA oraz przyporządkowania numerycznego profili uzyskanych metodą TRS-PCR pozwoliła na zwiększenie siły różnicowania. Podejrzewam, że wykonanie analizy genotypowania dla izolatów *P. aeruginosa* nie powiązanych epidemiologicznie podniosłoby znacznie otrzymany przez doktoranta współczynnik różnicowania $DI=0,7967/0,9611$ (CGU/PCR/GTC/PCR zastosowanych pojedynczo metod TRS), $DI=0,9544$ dla uśrednionej analizy podobieństwa (CC-PCR+GTC-PCR), $DI=0,9831$ dla numerycznego systemu klasyfikacji TRS-PCR ($DI=0,9831$), a nawet dla analizy MLVA: $DI=0,9478$.

Za identyczne doktorant uznał profile, o podobieństwie powyżej obliczonej wartości powtarzalności. Na potrzeby publikacji proponuję rozszerzyć walidację metody o powtarzalność wewnątrz- i między-żelową, odtwarzalność, a także tzw. „odporność” tj. np. rozkład uzyskiwanych fragmentów pojedynczych profili w warunkach zmian serii odczytników, gdyż jak wiadomo metody genotypowania oparte na PCR mogą generować odmienne profile przy zastosowaniu np. polimeraz różnych wytwórców, różnych metod izolacji DNA, czy też innej serii/innego wytwórcy startera. Na potrzeby przygotowywanej publikacji proponuję włączyć do kolekcji badanych szczepów, szczepy referencyjne obu badanych gatunków z uznanych międzynarodowych kolekcji, dla których profile generowane metodami MLST, MLVA-VNTR są powszechnie znane, co w znaczący sposób podniesie wiarygodność wyników. Stosowanie markerów wielkości jest oczywiste, natomiast włączanie do analiz szczepów referencyjnych stanowi dodatkową kontrolę przebiegu procesu całego genotypowania. O ile ocena genotypowania może być jasno potwierdzona z zastosowaniem narzędzi jakie doktorant stosował, czyli np. oprogramowania Bionumerix, ciekawym aspektem byłoby skompilowanie tych danych z jego użyciem, co przy możliwości wprowadzania innych cech różnicujących (w tym fenotypowych) może pozwolić na rozszerzenie otrzymanych wniosków. Doktorant w swojej dysertacji podkreślił, że praca stanowi wstępny materiał do dalszych prac nad walidacją metody, dlatego biorąc pod uwagę dobry warsztat, szczegółową dokumentację wyników i innowacyjność alternatywnych metod genotypowania, która może być szczególnie przydatna do klasyfikacji dotychczas nierozróżnialnych izolatów *P. aeruginosa* wyodrębnionych od pacjentów z mukowiscydozą, uważam że przedstawiona mi do oceny praca doktorska posiada duże znaczenie w rozwoju dalszych badań taksonomicznych oraz dochodzeń epidemiologicznych. Proponuję także zgłosić nowo zidentyfikowane

typy *E. coli* STEC2745 i STEC2753 do odpowiedniej międzynarodowej bazy, co podniesie walory merytoryczne pracy.

Dyskusja stanowi obszerny, bogaty w treści rozdział i może być rozważany do przygotowania artykułu przeglądowego. Doktorant wykazał się w niej dużą wiedzą, zdolnością polemiki z wynikami innych badaczy, a co szczególnie istotne wykazał merytoryczne zrozumienie konieczności różnicowania całej puli kolonii izolowanych od pojedynczego chorego jako jedynej możliwości przeprowadzenia rzetelnych analiz molekularnych w celu zrozumienia dróg szerzenia się zakażeń jak również całego procesu patogenezy.

Podsumowując otrzymane wyniki oraz wnioski należy uznać, że cel niniejszej rozprawy jakim jest ulepszenie metodyki różnicowania patogennych szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli* z wykorzystaniem techniki TRS-PCR, oraz porównanie nowej metodyki TRS-PCR z metodą MLST dla szczepów *E. coli* oraz z metodą VNTR-MLVA dla szczepów *P. aeruginosa* został osiągnięty.

Uważam, że przedstawiony system genotypowania powinien w przyszłości objąć szerszą gamę gatunków po analizie ich zmienności, cech pangenomu oraz znaczenia klinicznego.

Pomijam komentarz odnośnie drobnych literówek, braku pełnej konsekwencji stosowania przyjętych zasad zapisu drobnoustrojów kursywą, ponieważ nie wpływają one istotnie na wartość merytoryczną pracy. Proponuję jednak w publikacji stosować termin „unikatowe” w miejsce „unikalne”.

W świetle wyżej przedstawionej bardzo pozytywnej oceny całej monografii mgr inż. Dariusza Stanisława Jarych, w tym uznania dla znacznej wartości wyników o charakterze poznawczym i aplikacyjnym, uważam, że oceniana praca doktorska spełnia wymogi Ustawy o Szkolnictwie Wyższym Nauce, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dyscyplinie nauk medycznych i wnoszę do Rady Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi o dopuszczenie Pana mgr inż. Dariusza Stanisława Jarych do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

