



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Mai Koseckiej-Strojek

pt „**Opracowanie i optymalizacja referencyjnych baz danych dla dwóch nowych metod molekularnych do identyfikacji gatunków bakterii z rodzaju *Staphylococcus*”.**

Gronkowce należą do najczęściej hodowanych bakterii z materiałów klinicznych. Nie budzi to zdziwienia, jako że większość gatunków stanowi składnik naturalnej flory ludzi i zwierząt i często kontaminują próbki. Gatunkiem zwykle uważanym za chorobotwórczy jest *Staphylococcus aureus*, jednak wyhodowanie innego gatunku gronkowca, wchodzącego w skład normalnej flory nie zawsze jest kontaminacją i gatunki te, poza pożyteczną rolą jaką spełniają w makroorganizmie są niekiedy groźnymi patogenami oportunistycznymi.

Istotnym problemem jest systematyka gronkowców, która podobnie jak w przypadku innych bakterii wciąż ulega zmianom i modyfikacjom. Jedne gatunki znikają, pojawiają się nowe, zmieniają się nazwy. Wynika to z rozwoju metod biologii molekularnej, które pozwalają na porównywanie genomów bakterii, a nie tylko cech fenotypowych, na których opierała się dawna klasyfikacja.

Małe rutynowe laboratoria diagnostyczne najczęściej dysponują jedynie metodami biochemicznymi takimi jak VITEK2 czy PHENIX, i prawidłowa identyfikacja gatunków gronkowców innych niż *S. aureus*, może nastęrczać trudności. Obecnie, dzięki powszechnemu wprowadzeniu do diagnostyki mikrobiologicznej spektrometrii masowej, problem ten został w dużej mierze rozwiązany. Np. system VITEK MS pozwala na identyfikację ponad 30 gatunków w rodzaju *Staphylococcus* oraz dodatkowo na różnicowanie niektórych podgatunków. Bazy danych stosowane przez systemy opierające się o spektrometrię masową nie zawierają jednak wszystkich opisanych gatunków, a referencyjnymi metodami są metody genetyczne. Najczęściej są one oparte o sekwencjonowanie metodą Sangera 16S rRNA, oraz przy dużym podobieństwie jeszcze dodatkowych genów jak w przypadku gronkowców *hsp60* czy *rpoB*. Metody te są jednak ze względu na wysoki koszt i czasochłonność niedostępne w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, a nawet po ich zastosowaniu, nie zawsze udaje się uzyskać zadawalający

poziom dopasowania. Duże nadzieje budzą metody sekwencjonowania nowej generacji, które można użyć dla fragmentów wielu różnych genów. Ponieważ metody te są stosowane stosunkowo od niedawna, istotne jest zwiększenie liczby zdeponowanych w bazie sekwencji referencyjnych analizowanych regionów. Najczęściej badane są regiony zmienne 16S rRNA, ale nie zawsze różnice pomiędzy tymi regionami są wystarczająco duże, żeby zróżnicować blisko spokrewnione gatunki. Analiza regionu 16S-23S rRNA, zaproponowana we wcześniejszych pracach przez promotora pomocniczego, wydaje się szczególnie obiecująca, i warta kontynuacji dla innych grup bakterii.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej było opracowanie i optymalizacja referencyjnych baz danych dla dwóch nowych genetycznych metod identyfikacji gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus*.

Praca została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz w Zakładzie Mikrobiologii Medycznej Uniwersyteckiego Centrum Medycznego w Groningen, Holandia.

Praca ma 163 strony oraz typowy układ: krótkie wprowadzenie (9 stron), materiały (8 stron), metody (20 stron), wyniki (50 stron), dyskusja (8 stron), podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo (77 pozycji), 12 tabel, 20 rycin, oraz obszerne materiały dodatkowe (zamieszczono sekwencje referencyjne regionu 16S-23S rRNA dla 50 gatunków i 6 podgatunków z rodzaju *Staphylococcus* w formacie fasta -38 stron). Ponadto na początku znajduje się spis treści, wykaz tabel, wykaz rycin, wykaz skrótów, słownik oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

W krótkim wprowadzeniu doktorantka przybliży klasyfikację i znaczenie bakterii z rodzaju *Staphylococcus* w medycynie i weterynarii. Wspomina również na temat ogromnego problemu współczesnej medycyny, jaką jest oporność bakterii na antybiotyki, jako że problem ten występuje również u gronkowców. Mam tu pewne uwagi, bo chociaż lekooporność nie jest tematem pracy, to jeśli już doktorantka na ten temat pisze, to warto sprostować, że od kilku lat są już leki beta-laktamowe, które działają na MRSA, takie jak dostępna od 2012 w Unii Europejskiej ceftarolina (również w Polsce) oraz ceftobiprol, zarejestrowany od 2008 roku w Szwajcarii i w Kanadzie. Natomiast na liście patogenów dla których wykrycie nowych leków jest priorytetem, opublikowanej w 2017 roku przez WHO, znalazły się gronkowce (zarówno *S. aureus* jak i CoNS) odporne na glikopeptydy.

We wprowadzeniu autorka omawia również pokrótce metody identyfikacji gronkowców, ze szczególnym uwzględnieniem metod opartych na sekwencjonowaniu. Doktorantka zasługuje



na pochwałę, jako że ta część wstępu jest zwięzła i dotyczy właściwie tylko zasadniczego tematu pracy.

Rozdziały materiały i metody są z kolei potraktowane dość obszernie, ale to świadczy o rzetelności doktorantki, która zapewne chciałaby, żeby każdy czytający mógł powtórzyć jej doświadczenia.

W rozdziale wyniki autorka w pierwszej części ustala brakujące referencyjne wzory prążków dla 19 gatunków i 2 podgatunków, uzyskane po trawieniu genu *saoC* czterema różnymi enzymami restrykcyjnymi. Ponadto, wykonuje określenie RFLP dla dodatkowych szczepów, dla których wzory zostały już wcześniej opisane. W sumie uzyskano referencyjne wzory dla 46 gatunków gronkowców. Nie udało się uzyskać wzorów dla 4 gatunków.

W drugiej części autorka najpierw identyfikuje wszystkie badane szczepy za pomocą sekwencjonowania genów 16S rRNA, *sodA*, *rpoB* i *tuf* metodą Sangera.

Sekwencjonowanie genów *rpoB* i *sodA* umożliwiło identyfikację w obu przypadkach po 50 gatunków, a więc wszystkich badanych. Najniższa liczba różnic w genie *rpoB* wynosiła 6, a w genie *sodA*, 4 nukleotydy. W przypadku genu *tuf*, dla 7 gatunków nie znaleziono różnic w sekwencji genu. Nie dla wszystkich gatunków były dostępne sekwencje tych genów w bazach GenBank i leBIBI.

Wszystkie 50 gatunków z kolekcji zostało zidentyfikowanych za pomocą co najmniej dwóch zastosowanych genów. Dla 4 gatunków: *S. aureus*, *S. pettenkoferi*, *S. pseudolugdunensis* i *S. schweitzeri* identyfikacja była możliwa za pomocą 2 genów; dla 12 gatunków za pomocą 3 genów, a dla znacznej większości gatunków czyli dla 34 gatunków za pomocą wszystkich 4 genów.

W celu zobrazowania zależności filogenetycznych pomiędzy gatunkami, doktorantka skonstruowała drzewa filogenetyczne dla poszczególnych genów. Analiza struktury drzew filogenetycznych pozwoliła stwierdzić klastrowanie poszczególnych gatunków. Grupa gatunków *S. aureus*, *S. argenteus* i *S. schweitzeri* grupowała się wspólnie każdą z użytych metod. Także wspólnie grupowały się gatunki: *S. argensis*, *S. pettenkoferi* i *S. pseudolugdunensis*, *S. carnosus* i *S. condimenti* oraz reprezentanci grupy SIG czyli gatunki *S. delphini*, *S. intermedius* i *S. pseudintermedius*. Wszystkie metody potwierdziły, że gatunki *S. massiliensis* oraz *S. auricularis* są gatunkami najdalej filogenetycznie oddalonymi

Wyniki uzyskane metodą sekwencjonowania Sanger, stanowiły bazę do zastosowania nowej metody, a mianowicie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) regionu 16S-23S rRNA dla 50 opisanych gatunków z rodzaju *Staphylococcus*. Celem pracy było także wyznaczenie kryteriów identyfikacji rodzajowej oraz gatunkowej przy użyciu tej metody.



Analiza bazy danych GenBank wykazała, że obecnie dostępne są sekwencje referencyjne regionu 16S-23S rRNA dla 20 gatunków gronkowców. W niniejszej pracy uzyskano sekwencje referencyjne dla brakujących 30 gatunków oraz poszerzono bazy danych o sekwencje regionu 16S-23S dla gatunków, dla których sekwencje były dostępne. Zastosowanie NGS regionu 16S-23S pozwoliło na jednoznaczną identyfikację dla 100% gatunków.

W dyskusji autorka omawia możliwości szybkiej identyfikacji gronkowców koagulazo-dodatnich w oparciu o PCR oraz multiplex PCR, omawia również zastosowanie metody RLFP do i różnicowania gatunków koagulazo-dodatnich. Dalej omawia możliwości identyfikacji wszystkich gatunków gronkowców przy użyciu tej metody. Cytuje prace różnych autorów opierające się na innych genach oraz prace w których jest współautorem, dotyczące identyfikacji gronkowców za pomocą RFLP genu *saoC*. Pierwsza część prezentowanej pracy doktorskiej jest kontynuacją tych publikacji. W dyskusji autorka słusznie zauważa, że analiza RFLP konkretnego genu, przeprowadzona dla wielu szczepów z jednego gatunku, może wykazać polimorfizm wewnątrzgatunkowy, co z jednej strony utrudniałoby jednoznaczną identyfikację, ale z drugiej strony w szerszej perspektywie, pozwoliłoby na lepsze opracowanie kryteriów tej identyfikacji. Uzyskane wyniki są niewątpliwie cenne i opracowana metoda może być przydatna w pracowniach referencyjnych, jednak nie bardzo wyobrażam sobie, żeby metoda RFLP znalazła zastosowanie w rutynowym laboratorium mikrobiologicznym. Inaczej wygląda sytuacja w przypadku SNG, gdzie jak najbardziej jest to możliwe, a obecnie wydaje się, że SNG w niedalekiej przyszłości może stać się podstawową metodą w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. Atutem jest możliwość zastosowania daleko idącej automatyzacji i wprowadzenia zwalidowanych, rutynowych testów. Metody oparte o SNG już obecnie są co raz częściej stosowane w laboratoriach referencyjnych, zwłaszcza w diagnostyce wirusologicznej. Wraz ze zwiększonym zapotrzebowaniem, metody te powinny tanieć, a postępujące zastępowanie licznych małych laboratoriów przez duże, scentralizowane ośrodki, może spowodować, że SNG będzie w przyszłości metodą nawet bardziej opłacalną niż metody klasyczne. Obecnie jednak SNG jest w Polsce dostępne jedynie w dobrych ośrodkach badawczych. Na końcu pracy autorka zamieszcza podsumowanie i wnioski, na które składa się 6 punktów. Stanowią one bardziej podsumowanie niż wnioski, ale ze względu na charakter pracy jest to uzasadnione.

Z uwag recenzenta, chciałabym zapytać jakim źródłem posługiwała się doktorantka podając liczbę i nazwy gatunków, a jeżeli była to baza NCBI, to warto by było podać datę kiedy z niej korzystano, jako, że w maju 2017 jest 53 gatunki i 31 podgatunków. W stosunku do badanych 50 gatunków przez doktorantkę w bazie NCBI występują ponadto: *S. leei*, *S. lyticans* i *S. faecalis*.



Nieprawidłowa jest stosowana przez doktorantkę pisownia nazwy antybiotyku: metycilina. W polskim piśmiennictwie stosowana jest nazwa meticylina, a wcześniej metycylina. W wykazie skrótów FA-MRSA, jest rzadko stosowanym skrótem, który znaczy to samo co LA-MRSA, i są to szczepy nabyte od zwierząt hodowlanych, głównie od trzody chlewnej, ale nie tylko. Jeśli chodzi o definicję genu *femA*, to nie jest to czynnik oporności na metycylinę. Genem oporności jest *mecA*. Skrót *fem*, pochodzi od factor essential for methicillin resistance i czynniki te (jest ich 6, *femA-femF*) występują zarówno u MRSA jak i MSSA i biorą udział w syntezie peptydoglikanu (większość w procesie sieciowania i w powstawaniu mostków pentaglicynowych). Ich rola w oporności na metycylinę polega na tym, że jeżeli w szczepach MRSA geny *fem* nie działają prawidłowo (uległy mutacjom), to poziom oporności na metycylinę ulega zmniejszeniu. Jest to tzw. oporność heterogenna, którą wykrywamy stosując krążki z cefoksytiną.

Powyższe uwagi są drobne i nie umniejszają wartości pracy.

Reasumując uważam, że praca doktorska mgr Mai Koseckiej-Strojek wnosi znaczący wkład do badań mających na celu upowszechnienie nowych metod opartych o biologię molekularną w diagnostyce mikrobiologicznej. Doktorantka wykazała się doskonałym opanowaniem trudnych technik molekularnych, w tym sekwencjonowania DNA, oraz co jest jeszcze trudniejszą umiejętnością interpretacji wyników. W mojej opinii praca doktorska pt: „Opracowanie i optymalizacja referencyjnych baz danych dla dwóch nowych metod molekularnych do identyfikacji gatunków bakterii z rodzaju *Staphylococcus*”, autorstwa mgr Mai Koseckiej-Strojek, spełnia wymogi ujęte w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 ze zmianami), dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, o dopuszczenie mgr Mai Koseckiej-Strojek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną wnoszącą o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Prof. dr hab. med. Grażyna Młynarczyk
Specjalista mikrobiolog

Warszawa, 08.06.2017