



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Dr hab. inż. Jolanta Łukasiewicz

Wrocław, 07.06.2017 r.

Zakład Immunochemii

Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani Pauliny Marii Żarnowiec zatytułowanej ” Identyfikacja i różnicowanie szczepów *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz bakterii z wybranych środowisk za pomocą metod genetycznych i spektroskopowych” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Kacy w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy wykorzystania techniki spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera typu ATR FT-IR oraz metod biologii molekularnej RAPD PCR i MLST do identyfikacji lub genotypowania szczepów bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa*. Obiektem badań Autorki są ważne ludzkie patogeny. Pierwszy z gatunków odpowiedzialny jest m. in. za przewlekłe zakażenia układu moczowego, natomiast drugi gatunek bakterii wywołuje infekcje układu oddechowego u osób chorych na mukowiscydozę oraz zakażenia ran. Obie bakterie są również izolowane od pacjentów w przypadkach uogólnionych zakażeń szpitalnych. Postawiony przez Panią mgr Paulinę Żarnowiec problem badawczy dotyczy poszukiwania skutecznych, szybkich i tanich metod identyfikacji tych gatunków pod kątem zróżnicowania klonalnego oraz serotypu O (struktury LPS), co mogłyby być wykorzystane w diagnostyce medycznej i stanowić wsparcie dla opracowywanych strategii terapeutycznych. O ile identyfikacja do gatunku nie stanowi dziś w większości przypadków żadnego problemu, z punktu widzenia epidemiologicznego, kolejnym krokiem w rozwoju analityki mikrobiologicznej jest



niewątpliwie szybka korelacja cech genotypowych z cechami fenotypowymi w kierunku identyfikacji serotypu O, typów sekwencyjnych ST, czy repertuaru innych czynników wirulencji bakterii. Tym samym kierunek badań obrany przez Autorkę wpisuje się w najnowsze trendy rozwoju analityki medycznej. Należy zaznaczyć, że oba wybrane do badań gatunki cechuje wysoka różnorodność, co nastęrcza pewnych trudności w klasycznym podejściu do typowania. Dotychczas opublikowane próby identyfikacji szczepów *Proteus* metodą FT-IR skończyły się niepowodzeniem.

Przedstawiona do oceny praca stanowi zwartą monografię obejmującą 114 stron i rozdziały typowe dla tego typu opracowań: Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie oraz bogaty spis cytowanych pozycji literaturowych, rycin i tabel. W przedstawionym układzie brakuje streszczenia, przy czym w ograniczonym zakresie funkcję taką może spełniać rozdział Podsumowanie obejmujący 6 najważniejszych wniosków płynących z otrzymanych wyników. Praca została przygotowana starannie, szczególnie z punktu widzenia prezentacji wyników pojedynczych doświadczeń (niemal każdy wynik czy wniosek poparty jest odpowiednią ryciną lub tabelą). Z punktu widzenia jakości prezentacji wyników, słabym punktem tej rozprawy jest niska rozdzielczość większości zamieszczonych rycin i niektórych tabel (np. Ryc. 12 i Tabela 9) oraz jakość podpisów pod rycinami – w niektórych przypadkach brakuje wyjaśnienia użytych symboli (B i A na Ryc. 10, 14, Tabele 9 i 11: odpowiednio symbole - i ***), kolorów (Ryc. 13), kolorowych ramek (Ryc. 21, 22, 23). Przyjęte jest, że opisy do tabel i rycin powinny być na tyle wyczerpujące, aby czytelnik nie musiał wspomagać się tekstem w interpretacji używanych symboli. Dodatkowo zawarte w rozprawie mapy ciepła oraz niektóre dendrogramy pozbawione są legendy dla użytej skali kolorów (wartości D) lub opisów osi (odległości) (Patrz np.: Ryc. 8, 9, 14A, 25). Należy jednak nadmienić, że powyższe uchybienia nie wpływają na merytoryczną ocenę pracy, a dotyczą jedynie estetyki prezentowania uzyskanych wyników.



Wstęp jest bardzo dobrze skonstruowany i napisany jasno i czytelnie. Doktorantka trafnie dobrała zakres przedstawionych informacji do celów badawczych: od charakterystyki różnych technik FT-IR i ich przydatności dla typowania bakterii, przez opis charakterystycznych pasm rejestrowanych widm z naciskiem na opis informacji strukturalnych w nich zawartych, chemometryczne metody analizy widm FT-IR, po opis aktualnego stanu wiedzy na temat wykorzystania tej techniki do różnicowania/identyfikacji szczepów bakteryjnych uzupełniony o typowanie przy pomocy metod biologii molekularnej. Rozdział ten kończy charakterystyka gatunków *P. mirabilis* i *P. aeruginosa* pod kątem chorobotwórczości, czynników wirulencji i wyzwań w zakresie typowania szczepów i ich zróżnicowania klonalnego. Na wyróżnienie zasługuje wyczerpujący charakter podrozdziałów dotyczących metod chemometrycznych analizy statystycznej widm IR. W mojej opinii to najtrudniejsza część rozprawy, o wysokim stopniu interdyscyplinarności. Dobór właściwych metod matematycznych i statystycznych oraz rejestracja dobrej jakości powtarzalnych widm stanowią element determinujący powodzenie identyfikacji/grupowania metodą FT-IR. Z punktu widzenia wyników przedstawionych w dalszej części pracy, brakuje mi jedynie odniesienia się nie tylko do indeksu D o wartości 0, 1000 i 2000, ale również do znaczenia tego wskaźnika w odniesieniu do wartości obserwowanych w niniejszej pracy, takich jak 5-20. Wstęp napisany jest starannie, a Autorka pisząc ten rozdział popełniła niewiele błędów merytorycznych, przy czym należy zwrócić uwagę na nieprawidłowe wyrażenie „*region rdzeniowy posiada dużą liczbę niepowtarzających się oligosacharydów...*” (str. 21) oraz stosowanie skrótu EtN zamiast Etn (ten drugi rekomendowany jest przez IUPAC). Warto nadmienić, że część omawianych zagadnień została przez Autorkę oraz Promotora omówiona i rozwinięta w opublikowanej w 2015 r. anglojęzycznej pracy przeglądowej (Curr. Med. Chem).

Szczegółowe cele pracy zostały precyzyjnie sformułowane w postaci kilku punktów popartych krótkim uzasadnieniem znaczenia prowadzonych badań i ich nowatorskiego podejścia do sprawy różnicowania szczepów bakteryjnych poprzez korelację fenotypowania z genotypowaniem. Przedmiotem badań była kolekcja szczepów laboratoryjnych i klinicznych



P. mirabilis oraz zróżnicowany panel szczepów *P. aeruginosa* zgromadzony w ramach współpracy międzynarodowej w programie COST, w której uczestniczyła Doktorantka.

Opis stosowanych Materiałów i Metod został poprawnie i wyczerpująco opisany. Brakuje mi jedynie ujęcia w Tabeli 2 szczepu R110 wraz z krótkim opisem tego szczepu analogicznym do R45. Dodatkowo Tabela 6 opisująca wykorzystywaną aparaturę zyskałaby na przekazie zawierając modele używanych urządzeń. Dobór metod do analizy chemometrycznej i genotypowania został w pełni uzasadniony we Wstępie. W odniesieniu do wyboru matematycznego modelu analizy widm IR, należy pochwalić przetestowanie na szczepach *P. mirabilis* aż 5 różnych metod chemometrycznych rekomendowanych dla tej techniki w pracach przeglądowych dotyczących wykorzystywania FT-IR do analizy materiału biologicznego, co pozwoliło na dobór optymalnej metody w różnicowaniu badanych mikroorganizmów.

W kolejnym rozdziale pracy przedstawiono jasno opisane i udokumentowane licznymi rycinami i tabelami wyniki. Docenić należy fakt, że Autorka umieściła w pracy komplet wyników, który pozwala śledzić i ocenić każdy etap prowadzonych analiz. Traktując 10 szczepów laboratoryjnych *P. mirabilis* jako model dla opracowywanej metodologii typowania metodą ATR FT-IR, przetestowała użyteczność różnych regionów widm IR rejestrowanych w zakresie $4000 - 900 \text{ cm}^{-1}$ w różnicowaniu testowanych szczepów. Do chemometrycznej analizy widm w różnych zakresach wybrała ocenę wskaźnika D, identyfikację zakresów liczb falowych metodą lasu losowego, analizę głównych składowych i hierarchiczną analizę skupień, co pozwoliło jej zaproponować najlepszy matematyczny model analizy widm oparty na zakresie falowym $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$. Region ten zawiera pasma absorpcji węglowodanów, polisacharydów i kwasów nukleinowych, w związku z czym prowadzone analizy mogły być korelowane z informacją na temat serotypu O *P. mirabilis* (struktur polisacharydów O-swoistych LPS). Ustalona metodologia posłużyła Pani mgr Paulinie Żarnowiec do hierarchicznej analizy skupień widm IR dla większej grupy szczepów laboratoryjnych tego gatunku, wśród których znajdowały się szczepy o tych samych



serotypach. W tej części pojawia się pytanie, co mogło być przyczyną, że głęboko szorstki szczep R45 zaklasyfikowany został do jednej grupy z gładkimi szczepami o serotypie O44, O19, O25 i O1. W odniesieniu do tego pytania, ciekawe byłoby ujęcie w tej analizie mutanta R110, który pochodzi z tego samego szczepu dzikiego, co szczep R45. Uzyskane wyniki pokazują, że sama struktura antygeny O nie jest w tego typu badaniach czynnikiem determinującym klasyfikację (nie wszystkie pary szczepów o tych samych serotypach przypisywane były do tych samych klastrow, np. szczepy 19 i 21 o serotypie O10). Co więcej, biorąc pod uwagę zmienność fenotypu szczepów laboratoryjnych i klinicznych, ciekawi mnie ogólna opinia Autorki na temat wpływu fazy wzrostu, długości polisacharydów O-swoistych, obecności antygenów kapsularnych i egzopolisacharydów na klasyfikację prowadzoną metodami FT-IR. W kolejnym podrozdziale opracowana metodologia wykorzystana została do identyfikacji przynależności serologicznej 32 izolatów klinicznych *P. mirabilis* o nieznanym serotypie O. Ponieważ metodologia opierała się w głównej mierze na analizie porównawczej z matrycą widm dla ograniczonej liczby szczepów laboratoryjnych, ostatecznie tylko jeden szczep sklasyfikowano z wysokim podobieństwem, a w przypadku pięciu podobieństwo oceniono na umiarkowane. Wyróżnić należy fakt zastosowania do klasyfikacji aż 4 różnych metod analizy chemometrycznej widm. Wyniki badań są w prawidłowe, a taki stopień identyfikacji wynikać może ze stopnia dopasowania do siebie grupy badanej i grupy wzorcowej, na co Autorka nie miała wpływu. Pojawia się tutaj pytanie, dlaczego widma szczepów klinicznych charakteryzowały wyższe wartości indeksu D? Dodatkowo, skoro szczep 104 został sklasyfikowany z wysokim prawdopodobieństwem do szczepu PrK 75/57 i biorąc pod uwagę cel przeprowadzonych badań (serotypowanie), to ciekawe byłoby podjęcie próby choć wstępnej analizy strukturalnej w kierunku potwierdzenia serotypu O. Taka weryfikacja byłaby tym bardziej zasadna, jeśli weźmie się pod uwagę jeden z wniosków Autorki na stronie 57 rozprawy: „osiem szczepów klinicznych (...) zaklasyfikowano do tej samej grupy serologicznej, co szczep laboratoryjny przez co najmniej 3 metody chemometryczne”. W dalszej kolejności, analogicznie do analiz przeprowadzonych dla



Proteus, Autorka podejmuje próbę oceny zróżnicowania klonalnego 41 szczepów *P. aeruginosa*. Podobnie jak w przypadku *Proteus mirabilis*, typowanie metodą ATR FT-IR stanowi tutaj oryginalny i ważny wkład Autorki w badania nad wykorzystywaniem tej techniki w diagnostyce i typowaniu bakterii Gram-ujemnych. Rozdział ten podparty jest w końcowej części Wyników genotypowaniem zebranych klinicznych, laboratoryjnych i środowiskowych szczepów metodami biologii molekularnej RAPD PCR i MLST, gdzie jego celem było wsparcie koncepcji traktowania widm FT-IR jako fenotypowego i genotypowego „odcisku palca” komórek bakteryjnych. Tutaj pojawia się pytanie, jak Autorka wytłumaczy różnice między genotypowaniem a typowaniem techniką ATR IR dla szczepów ATM 0060-1, -2, -3? Na koniec zaznaczam, że ciekawym pomysłem było uwzględnienie w planach badawczych identyfikacji preparatów LPS, przy czym dla lepszej prezentacji założonych celów tej części doświadczeń, zakres zbadanych preparatów powinien być powiększony o LPS innych serotypów oraz preparaty tych samych LPS, ale o różnym stopniu czystości. Powyższe uwagi, które mają raczej charakter dyskusji niż wskazywania uchybień, w żaden sposób nie umniejszają jakości wyników zawartych w przedłożonej do oceny rozprawie doktorskiej.

W Dyskusji, Autorka wnikliwie i rzeczowo ustosunkowała się do wyników badań własnych, wykazując, że informacje zawarte w widmach FT-IR szczepów bakteryjnych, po odpowiedniej obróbce matematycznej, są wystarczające, aby odróżnić od siebie serotypy szczepów *P. mirabilis*. Jak pokazał przykład serotypów O10 i O11, dla wskazania podobieństwa wystarczy obecność połowy identycznych składników cukrowych w podjednostce łańcucha O-swoistego. Ciekawy fragment Dyskusji stanowi omówienie koncepcji rozwijania metod klasyfikacji opartych na połączeniu oceny fenotypowej z genotypową. Niewątpliwie zaproponowana metodologia może ułatwić wstępną klasyfikację dużej liczby izolatów klinicznych, a zaobserwowane ograniczenia (omówione w Dyskusji), pozwalają na wyznaczenie dalszych kierunków badawczych w tym zakresie. Zarówno w Dyskusji, jak i w całej pracy, Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością piśmiennictwa i najnowszych trendów w podejściu do analiz próbek biologicznych techniką FT-IR.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Podsumowując stwierdzam, że cel pracy został osiągnięty. Autorka dostarczyła cennych wyników dotyczących wykorzystania FT-IR w klasyfikacji bakterii Gram-ujemnych, który na tle licznych badań metabolomicznych komórek eukariotycznych, tkanek i płynów ustrojowych stanowi ważny wkład w dalszy rozwój tej techniki analitycznej w mikrobiologii. Na wyróżnienie zasługuje interdyscyplinarny charakter pracy, doskonałe opanowanie chemometrycznych metod analizy widm i co najważniejsze, opublikowanie części wyników i opracowanej metodologii w 3 pracach oryginalnych w wysokiej rangi czasopismach z listy JCR i jednej pracy przeglądowej, gdzie w przypadku 3 prac Pani mgr Paulina Żarnowiec jest pierwszym autorem.

Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę z pełnym przekonaniem o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Pauliny Żarnowiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pozwalam sobie również złożyć wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na interdyscyplinarny charakter oraz dużą wartość merytoryczną popartą dorobkiem naukowym Autorki w zakresie badań realizowanych w ramach przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej.

Dr inż. hab. Jolanta Łukasiewicz