



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Warszawa, 20.11.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. farm. Piotra Celejewskiego-Marciniaka, pt.

„Genotypowanie oraz charakterystyka wybranych plazmidów i integronów klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych z rodzaju *Serratia*”

wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Stomatologicznej, Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Marty Wróblewskiej (promotor rozprawy) oraz dr n. biol. Renaty Wolinowskiej (promotor pomocniczy)

Bakterie z rodzaju *Serratia*, należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, od dawna budzą zainteresowanie badaczy, m.in. ze względu na biologiczne właściwości tych mikroorganizmów (np. produkcję charakterystycznego barwnika – prodigiozyny), szerokie rozpowszechnienie w naturalnych środowiskach wodnych, glebowych oraz w mikrobiomach wielu organizmów (w tym człowieka), a także ze względu na możliwość ich praktycznego wykorzystania w biotechnologii. Szczególnie istotną cechą, zwłaszcza w odniesieniu do *Serratia marcescens* – gatunku typowego (ang. *type strain*) dla całego rodzaju taksonomicznego, jest zdolność wywoływania oportunistycznych zakażeń człowieka, przebiegających, w wielu przypadkach, ze skutkiem śmiertelnym. Co więcej, niektóre identyfikowane szczepy *S. marcescens* kodują beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), są odporne na karbapenemy i kolistynę – wykazują więc pewne cechy charakterystyczne dla organizmów alarmowych, stanowiących rezerwuar determinant oporności. Determinanty takie zazwyczaj usytuowane są w obrębie ruchomych elementów genetycznych, umożliwiającym efektywne wprowadzanie genów adaptacyjnych do obiegu horyzontalnego transferu genów. Ponieważ zjawisko to stoi u podstaw narastającej oporności bakterii na antybiotyki, analiza jego zakresu i dynamiki w różnych grupach bakterii, a w szczególności w pałeczkach jelitowych, stanowi ważny cel analiz mikrobiologicznych.

Stosunkowo niska liczba odnotowywanych zakażeń szczepami *Serratia* spp., zwłaszcza w odniesieniu do przypadków powodowanych przez inne pałeczki jelitowe, powoduje, że izolaty kliniczne tych bakterii zazwyczaj nie są poddawane szczegółowej charakterystyce. Doktorant podjął się zatem w swoich badaniach oryginalnego i istotnego, z poznawczego punktu widzenia, zadania, jakim było scharakteryzowanie pod względem fenotypowym i genetycznym licznej puli izolatów klinicznych tych mikroorganizmów. Zdefiniowanie determinant oporności na związki o działaniu przeciwbakteryjnym, obecnych w tych

bakteriach, a także naturalnych nośników genów oporności, wprowadza również nowe dane do ogólnej wiedzy na temat rezystomu i mobilomu bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Ocena układu i poszczególnych części rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa została przygotowana w formie spójnego tematycznie opracowania, liczącego 158 stron. Zawiera ona rozdziały typowe dla prac o charakterze eksperymentalnym, tj. *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusję*, *Wnioski*, *Streszczenie* (w języku polskim i angielskim) oraz *Bibliografię*. W mojej opinii *Streszczenie* powinno rozpoczynać rozprawę, wówczas jego lektura już na wstępie daje czytelnikowi ogólne wyobrażenie o zakresie przeprowadzonych prac. Zamieszczenie tego rozdziału na końcu pracy, po *Dyskusji* i *Wnioskach*, powoduje, że jest on odbierany jedynie jako powtórzenie poznanych wcześniej treści. W pracy zamieszczono także *Wykaz stosowanych skrótów* (choć wymienione są tam również skrótowce), a także spisy tabel i rycin. Rozprawa została przygotowana poprawnie. Drobne niedociągnięcia, błędy językowe, brak niektórych oznaczeń na rycinach, czy niezręczne sformułowania nie wpływają na pozytywny odbiór całości.

Wstęp pracy jest klarowny i przedstawia podstawowe istotne informacje charakteryzujące bakterie z rodzaju *Serratia*. Pierwsze podrozdziały przynoszą aktualne dane na temat systematyki tych bakterii, a także charakterystyki i funkcji biologicznych wytwarzanej przez nie prodigiozyny. Kolejne części *Wstępu* opisują wykorzystywane w praktyce metody fenotypowania i genotypowania szczepów *Serratia* spp., a także niektóre zagadnienia związane z chorobotwórczością tych bakterii. Zasadnicza część tego rozdziału poświęcona jest jednak mechanizmom oporności *Serratia* spp. na antybiotyki i inne związki przeciwbakteryjne, ze szczególnym uwzględnieniem antybiotyków beta-laktamowych. *Wstęp* jest w dużej mierze wzorowany na pracy przeglądowej współautorstwa Doktoranta, opublikowanej w czasopiśmie *Postępy Mikrobiologii* w 2011 roku – został jednak rozwinięty i zaktualizowany w oparciu o nowsze pozycje bibliograficzne.

Charakterystyka *Serratia* spp. oraz zjawiska antybiotykooporności tych bakterii stanowi dobre wprowadzenie do tematyki badań. Jednak jednym z głównych wątków tej pracy są również zagadnienia związane z mobilomem *Serratia* spp., które nie zostały czytelnikowi we *Wstępie* przybliżone. W mojej opinii, wartościowym dopełnieniem tego wstępnego rozdziału byłoby podanie aktualnych informacji na temat nośników genetycznych genów oporności zidentyfikowanych dotychczas w tej grupie bakterii.

Wstęp prowadzi bezpośrednio do sprecyzowanego *Celu rozprawy*, w którym można wyróżnić trzy główne zadania, obejmujące: (a) utworzenie kolekcji szczepów *Serratia* spp. izolowanych od chorych hospitalizowanych na terenie Warszawy i okolic, (b) szczegółowe scharakteryzowanie poszczególnych izolatów pod względem ich genotypów oraz lekowrażliwości na wybrane antybiotyki, a także (c) zbadanie występowania w genomach tych bakterii ruchomych elementów genetycznych, mogących odgrywać rolę naturalnych nośników zidentyfikowanych determinant oporności. Wskazano w celu dwa typy ruchomych elementów genetycznych, tj. plazmidy i integrony – należy jednak zaznaczyć, że integrony nie są

mobilnymi elementami, w przeciwieństwie do ich kaset genowych, które są wbudowywane do integronów w wyniku rekombinacji zlokalizowanej.

Materiały i metody, przedstawione w dwóch oddzielnych rozdziałach, zawierają informacje (o zadowalającym stopniu szczegółowości) na temat sposobu przeprowadzenia poszczególnych eksperymentów i analiz. Należy podkreślić, że badania te wymagały zastosowania różnorodnych metod i technik, zarówno *stricte* mikrobiologicznych, genetycznych jak i bioinformatycznych, co dowodzi dobrze rozwiniętego warsztatu badawczego Doktoranta. Mam jednak kilka uwag do tej części pracy. (1) Opisuując metodę sekwencjonowania DNA metodą NGS zabrakło informacji na temat liczby uzyskanych odczytów sekwencji oraz stopnia pokrycia sekwencji genomów plazmidowych – są to istotne dane świadczące o wiarygodności ustalonego konsensusu sekwencji. (2) Ponadto, przy opisie składu mieszanin reakcyjnych należało podać stężenia wykorzystywanych preparatów DNA, a nie tylko ich objętość. (3) Inne drobne uwagi dotyczą m.in. stosowania terminu „primer” – zamiast polskiego odpowiednika „starter” (np. str. 49), a także zbyt ogólnikowo sformułowanych tytułów niektórych podrozdziałów, np. „Klonowanie karbapenemazy VIM” (4.17.) – poprawna wersja powinna brzmieć „Klonowanie genu karbapenemazy VIM”, a w tytułach podrozdziałów 4.17.6, 4.18.1 i 4.18.2 należało sprecyzować, że opisane tam metody dotyczą sekwencjonowania DNA.

W kolejnym rozdziale, liczącym 59 stron, Doktorant przedstawił wyniki swoich badań. Pierwszy etap zakładał utworzenie kolekcji izolatów klinicznych *Serratia* spp. pochodzących z 5 źródeł – czterech szpitali z Warszawy i okolic oraz jednego laboratorium diagnostycznego. Bakterie te wyizolowano z różnych materiałów biologicznych, pobranych od pacjentów w latach 2010-2012. Dywersyfikacja źródeł tych szczepów pozwoliła na zmniejszenie ryzyka analizy dużej liczby izolatów o charakterze klonalnym. Doktorant zweryfikował również pozycję taksonomiczną tych bakterii, wykorzystując do tego celu głównie system Vitek 2 Compact oraz spektrometrię mas MALDI-TOF. Umożliwiło to wykluczenie z kolekcji kilku błędnie oznaczonych izolatów, a tym samym na ostateczne zdefiniowanie kolekcji, liczącej 112 szczepów *Serratia* spp. Szczepy te poddano dalszej charakterystyce, mającej na celu: (1) określenie ich lekowrażliwości, w tym identyfikację izolatów wytwarzających beta-laktamazy ESBL i karbapenemazy, (2) analizę profili plazmidowych oraz typowanie plazmidów metodą PCR, a także (3) typowanie samych szczepów poprzez zbadanie polimorfizmu losowo namnożonych fragmentów DNA (RAPD) oraz wzorów restrykcyjnych genomowego DNA uwidocznionych w wyniku elektroforezy pulsacyjnej (PFGE).

Realizacja tych zadań przyniosła kilka istotnych obserwacji, pozwoliła bowiem na identyfikację: (1) szczepów o zmniejszonym poziomie lekowrażliwości, (2) kilku grup klonalnych szczepów *Serratia* spp., a także (3) dominującej puli plazmidów, reprezentujących grupę niezgodności IncL/M. Należy zaznaczyć, że plazmidy z tej grupy są bardzo ekspansywne i powszechnie uważa się je za istotny czynnik antybiotykooporności.

Druga, równie obszerna część Wyników, opisuje identyfikację naturalnych nośników genów oporności. Badania te rozpoczęto od identyfikacji genów integraz charakterystycznych dla różnych klas integronów oraz ustalenia sekwencji i scharakteryzowania regionów

zmiennych integronów grupy I i II, co pozwoliło na wyróżnienie obecnych tam kaset genowych. Scharakteryzowanie integronu klasy III wymagało zastosowania alternatywnego podejścia, polegającego na odczytaniu kompletnej sekwencji nukleotydowej niosącego go plazmidu. Kolejny wątek rozprawy dotyczył poszukiwania w analizowanych szczepach genów kodujących beta-laktamazy warunkujące oporność na cefalosporyny. Efektem tych badań była m.in. identyfikacja nowego wariantu genu *bla_{CTX-M}* oraz scharakteryzowanie plazmidu, w którym gen ten jest usytuowany. Mam kilka uwag i pytań w związku z lekturą tej części pracy:

- 1) Główne moje wątpliwości budzi etap identyfikacji plazmidów w szczepach *Serratia*. Do tego celu wykorzystano dostępny komercyjnie zestaw przeznaczony do izolacji DNA małych plazmidów o dużej liczbie kopii – nie pozwala on na identyfikację większych replikonów, o wielkości kilkudziesięciu, czy ponad 100 tys. par zasad (plazmidy o takich rozmiarach występują powszechnie w rodzinie *Entorabacteriaceae*). Chociaż udało się zidentyfikować w pracy liczne plazmidy, to jednak nie oddaje to faktycznego obrazu plazmidomu tych bakterii. Uważam, że zastosowanie klasycznej metody lizy alkalicznej (wykorzystującej etap precypitacji DNA) rozwiązałoby ten problem.
- 2) Opis sekwencji plazmidów jest fragmentaryczny. Z pewnością dobrym rozwiązaniem byłoby zamieszczenie w pracy tabel adnotacyjnych sekwencji wraz z charakterystyką poszczególnych ORF oraz wyróżnionymi modułami genetycznymi odpowiadającymi za określone funkcje. Chociaż Doktorant koncentruje uwagę na plazmidowych genach oporności, to jednak podstawowa charakterystyka systemów kluczowych dla funkcjonowania nośników tych genów jest równie istotna. Przykładowo Autor wspomina o obecności w plazmidzie P81-c1 systemu toksyna-antytoksyna (TA) jako ważnego systemu stabilizującego (nie precyzując jaką rodzinę systemów TA reprezentuje), a pomija obecność systemu partycyjnego, który pełni bardziej istotne funkcje stabilizujące.
- 3) Uważam za niefortunne wprowadzanie do rozprawy „roboczych” nazw plazmidów, które są zmieniane w kolejnych rozdziałach (np. P89_c2 = pPCMI3). W rezultacie te same plazmidy mają różne oznaczenia, co budzi konsternację i utrudnia analizę danych.
- 4) W szczepie nr 89 zsekwencjonowano 6 kolistych cząsteczek DNA. Po bardziej szczegółowe informacje Doktorant odsyła czytelnika do Tabeli 29, w której wyszczególniono jedynie 3 replikony – c1, c2 i c6. Ponadto, w rozdziale 5.10.5.4.1. przedstawiono opis sekwencji i mapę genetyczną plazmidu c1 (11 869 pz) – mapa ta w mojej opinii odpowiada plazmidowi o wielkości kilkunastu tysięcy pz, a nie o rozmiarach przekraczających 11 tys. pz.
- 5) W pracy przeprowadzono identyfikację genów integraz integronów metodą PCR. Ciekawi mnie, czy w chromosomach *Serratia* spp. występują superintegrony? Czy niektóre wyniki uzyskane przez Doktoranta mogą być efektem amplifikacji genów *int* superintegronów?

Przedstawione uwagi krytyczne nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy. Należy zaznaczyć, że Doktorant zrealizował wszystkie postawione cele badawcze. Do najważniejszych osiągnięć tej pracy zaliczam:

- utworzenie unikalnej i dobrze zdefiniowanej kolekcji izolatów klinicznych *Serratia* spp. oraz wskazanie spektrometrii mas MALDI-TOF jako skutecznej metody identyfikacji bakterii z tego rodzaju.
- określenie profili zróżnicowanej wrażliwości testowanych szczepów na szereg antybiotyków i chemioterapeutyków, z uwzględnieniem antybiotyków beta-laktamowych nowych generacji,
- wykrycie nieopisanego wcześniej wariantu genu beta-laktamazy CTX-M (CTX-M-221) o hybrydowej strukturze,
- przeprowadzenie wstępnej klasyfikacji plazmidów zidentyfikowanych w analizowanych szczepach oraz wyróżnienie dominującej grupy replikonów reprezentujących typ niezgodności IncL/M,
- identyfikację licznych integronów klasy I warunkujących oporność na antybiotyki aminoglikozydowe oraz integronu klasy III o nieopisanym wcześniej układzie kaset genowych,
- odczytanie kompletnych sekwencji nukleotydowych oraz określenie struktury genetycznej kilku plazmidów *Serratia* spp., w tym pPM120-2 i pPCMI3 będących nośnikami genów oporności.

Uzyskane wyniki zostały rzeczowo omówione w rozdziale *Dyskusja*. Doktorant dokonał syntezy zgromadzonych danych i omówił je na tle aktualnych danych literaturowych. Lektura tego rozdziału przekonuje mnie, że Doktorant posiada dużą wiedzę ekspercką z zakresu podjętej tematyki badawczej. Dzięki utworzeniu unikalnej kolekcji szczepów, przeprowadzeniu odpowiednio zaplanowanych badań oraz wnikliwej i krytycznej analizie uzyskanych wyników, udokumentował wiele ciekawych obserwacji na temat mobilomu izolatów klinicznych *Serratia* spp. oraz jego udziału w determinowaniu fenotypów oporności w tej grupie bakterii.

Wniosek końcowy

W mojej opinii oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz.1669 z późn. zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr. farm. Piotra Celejewskiego-Marciniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Dariusz Bartosik

