

rozprawy doktorskiej Pani mgr Wioletty Kmiecziak

pt. „Szczepy grupy *Staphylococcus intermedius* (SIG) izolowane z materiałów klinicznych od ludzi i od zwierząt towarzyszących – identyfikacja i potencjał chorobotwórczy”.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Wioletty Kmiecziak wpisuje się w nurt ważnych badań nad identyfikacją i chorobotwórczością drobnoustrojów towarzyszących zwierzętom domowym i hodowlanym, a więc też bliskich człowiekowi, będących oportunistycznymi patogenami swoich gospodarzy i człowieka. Największymi problemami współczesnej mikrobiologii są dwa zjawiska o globalnym charakterze, oba z dyscypliny mikrobiologii medycznej: rozwijająca się lekooporność drobnoustrojów oraz pojawianie się drobnoustrojów o nowych cechach biochemicznych. Zjawiska te mają szeroki zasięg oraz implikują szereg trudności i wyzwania przed dzisiejszą mikrobiologią. U ich podstaw znajduje się wiele populacji drobnoustrojów, a wśród nich bakterie właściwe z rodzaju *Staphylococcus* (gronkowiec) wraz z gatunkiem *S. intermedius*, który jest głównym bohaterem przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej. Gatunek ten, wraz z gatunkami *S. pseudintermedius* i *S. delphini* tworzy w obrębie gronkowców koagulazo-dodatnich tzw. grupę SIG tych bakterii (SIG - *Staphylococcus intermedius* group) i są przedmiotem zainteresowania bakteriologów, klinicystów, diagnostyków, epidemiologów i genetyków.

Bakterie gatunku *S. intermedius* stanowią składnik biocenozy fizjologicznej skóry i błon śluzowych zwierząt, głównie psów i kotów; (są też doniesienia o innych gatunkach zwierząt hodowlanych i dzikich). Szczepy tego gatunku są odpowiedzialne za zakażenia zwierząt i coraz częściej ludzi. Wyposażone są w szereg czynników chorobotwórczości, co pozwala przełamywać bariery immunologiczne i powodować zakażenia narządów głębokich i skóry. Zakażeniom sprzyjają dodatkowo: rosnący odsetek pacjentów z predyspozycjami, coraz większa moda na posiadanie w domach zwierząt (nawet egzotycznych), a ze strony drobnoustrojów łatwość transmisji między różnymi gatunkami gospodarzy, adaptacji, więc kolonizacji; stale narastająca lekooporność, na antybiotyki beta-laktamowe ponad 90% szczepów opornych, i zmiany cech biochemicznych, co powoduje trudności w diagnostyce, nawet omijanie identyfikacji gatunkowej. W wyniku zmian ewolucyjnych w obrębie rodzaju *Staphylococcus*, postępu w metodyce badań diagnostycznych oraz analiz danych ekologicznych i epidemiologicznych tej grupy drobnoustrojów, w ostatniej dekadzie wyodrębniono nowe gatunki gronkowców i wprowadzono zmiany taksonomiczne. Nie mniej jednak, mając do czynienia z dynamicznymi zjawiskami, wymagają one stale nowego spoglądania na systematykę, nieustannego śledzenia epidemiologii powodowanych przez nie zakażeń i racjonalizacji diagnostyki mikrobiologicznej w zakresie weterynarii oraz medycyny chorób zakaźnych człowieka.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab.

Jacek Międzobrodzki

Zakład Mikrobiologii

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

PL 30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 7

tel. +48(12) 664 63 71

tel. +48(12) 664 63 83

fax +48(12) 664 69 02

jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl

Koncepcja badań i cel rozprawy doktorskiej. Dzisiejsza praktyka diagnostyczna notuje błędy identyfikacyjne, które wynikają z niejednoznacznego wyboru i określenia skutecznej metodyki, ale także z niedawnej reklasyfikacji gronkowców koagulazo-dodatnich (do których należy badany przez Doktorantkę gatunek *S. pseudintermedius*). Logicznie wynika z tego konieczność precyzyjnego analizowania, potwierdzania (lub eliminowania) i usystematyzowania danych laboratoryjnych. Tę aktualną tematykę podejmuje recenzowana dysertacja Pani mgr Wioletty Kmieciak, doktorantki w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniw. Medycznego w Łodzi, kierowanym przez Panią Prof. Elię M. Szewczyk. Zespół badawczy Pani profesor ma tradycje i wyróżnia się badaniami w zakresie ekologii i diagnostyki drobnoustrojów, czego wyrazem jest szereg bardzo dobrych publikacji w periodykach indeksowanych w międzynarodowych bazach danych.

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia badania nad znalezieniem najbardziej wiarygodnej metody identyfikacji izolatów zwierzęcych i ludzkich, wstępnie zaklasyfikowanych do grupy SIG. Autorka wykorzystała w tym celu kilka metod – zarówno metody rutynowe, stosowane w codziennej praktyce diagnostycznej w laboratoriach medycznych, czyli metody oparte na badaniach cech biochemicznych, które zestawiła z zaawansowanymi metodami genetycznymi oraz innowacyjną techniką spektrometryczno-biochemiczną MALDI-TOF. *Recenzent wysoko ocenia koncepcję projektu, ambicje i odwagę badawczą Doktorantki jak i przyjętą strategię badań.*

Ogólna charakterystyka rozprawy. Rozprawa doktorska mgr W. Kmieciak napisana jest w języku polskim, zgodnie z kanonem przyjętym na uniwersytetach. Z pewnym wyjątkiem składa się z konwencjonalnych części, nieco przekracza typową objętość, gdyż liczy aż 174 strony. Wspomniany wyjątek stanowi zamieszczony na końcu aneks na 19 stronach, zawierający tyleż tabel z danymi izolatów ludzkich i zwierzęcych (zarówno dane wyjściowe jak i wyniki oryginalnych badań Autorki). Po pierwszym wrażeniu związanym z niewygodą wertowania pracy podczas czytania, przychodzi czytelnikowi refleksja, że taki układ wyodrębniający liczne tabele w odrębny aneks porządkuje rozprawę obfitującą w wiele tabel i rycin, gdyż niezależnie od niego, rozdział Wyniki zawiera tabele i ryciny. *Wyodrębnienie zestawu dokumentacji wyników w Aneksie, jak również objętość pracy są akceptowane i usprawiedliwione; wysoka liczba stron całej dysertacji spotyka się ze zrozumieniem po skonstatowaniu, że praca ma charakter interdyscyplinarny, obfituje w pokaźną liczbę metod badawczych i bardzo liczne wyniki, które wymagały precyzyjnego i systematycznego opracowania, czemu pomaga przedstawienie danych i cech w formie tabel.*

Maszynopis poprzedzony jest spisem treści i wykazem skrótów związków chemicznych i nazw stosowanych w pracy (3 strony). Całość na 174 stronach, obejmuje kolejno następujące główne części: wstęp (19 stron), sformułowanie celów pracy (2 strony), specyfikacje użytych materiałów (8 stron), opis zastosowanych metod (18 stron), opis uzyskanych wyników i ich omówienie (26 stron), dyskusja (34 strony), wnioski (2 strony), piśmiennictwo (266 pozycji na 35 stronach), spisy tabel i rycin (po 2 strony), i aneks (18 stron). Praca zilustrowana jest 26 tabelami, 33 rycinami (w tym 18 tabel w aneksie). W rozdziale „Piśmiennictwo” recenzent z satysfakcją odnajduje trzy publikacje Doktorantki (będącej pierwszym autorem), jedną oryginalną w periodyku Current Microbiology i dwie

przeglądowe w Postęпах Mikrobiologii (obydwa tytuły są indeksowane w międzynarodowych bazach danych). Publikacje te dowodzą wysokiej wartości uzyskanych wyników badań jak również umiejętności Autorki. Oprócz powyższych uwag formalnych recenzent gratuluje Doktorantce, autorce rozprawy, sprawnego rozdysponowania bogatym oryginalnym materiałem badawczym i zorganizowania redakcji rozprawy.

Ocena poszczególnych rozdziałów. Pierwszy rozdział – „Wstęp”, jest bardzo dobrym wprowadzeniem do dalszych części rozprawy i znakomicie integruje trzy wyraźnie zarysowane obszary badań. Autorka opisuje: i) bakterie gat. *Staphylococcus pseudintermedius* z grupy SIG, kolonizację, potencjał chorobotwórczy, patogenność, lekooporność i inne cechy; ii) transmisje między różnymi gatunkami gospodarza, kolonizację i ewolucje drobnoustrojów; iii) mechanizmy przełamania barier międzygatunkowych i wyjaśnia, dlaczego drobnoustroje zwierzęce powodują zakażenia ludzi? Autorka pisze o trudnościach identyfikacyjnych bakterii, uzasadnia potrzebę reklasyfikacji taksonomii i aktualizację klasyfikacji. Powołuje się przy tym na najnowsze doniesienia literaturowe i doświadczenia zespołu badawczego w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w którym realizowała badania. Ta część wstępu, po pogłębieniu i rozbudowaniu, nadaje się do przygotowanie bardzo dobrej pracy przeglądowej. W dalszej części następuje przegląd metod badawczych, klasycznych jak i zaawansowanych genetycznych i desorpcji laserowej (spektrometryczna MALDI-TOF). Recenzent nie znalazł informacji o różnicach w budowie i fizjologii skóry gatunków gospodarzy, między którymi zachodzi transmisja drobnoustrojów, a także o najczęściej kolonizowanych obszarach skóry człowieka (gdyż nie tylko błony śluzowe przedsonka nosa człowieka są celem kolonizacji gronkowcami, publikacje zespołu Kloosa i Schleifera, i późniejsze). *O rozmowę na ten temat recenzent poprosi Doktorantkę podczas obrony.*

Przy czytaniu „Wstępu” uwagę zwraca duża znajomość praktyki laboratoryjnej u Autorki, która bardzo dobrze zna opisywane zjawiska. Rozdział napisany jest zwięźle, syntetycznie, lekkim językiem, jednocześnie rzetelnie i wyczerpująco, bez zbędnych opisów przypadków czy komentarzy. Jednocześnie autorka zwróciła uwagę na trudności w identyfikacji bakterii wynikające z metodyki, która nie zapewnia różnicowania poważnej liczby taksonów, a nawet w przypadkach pojedynczych izolatów nie jest wystarczająca, a cóż dopiero w przypadkach drobnoustrojów nietypowych, rzadziej spotykanych, lub migrujących w środowisku i demonstrujących zmiany fenotypowe wpływające z ekspresji bądź supresji genów kodujących ważne markery. Tak więc sformułowane w kolejnym rozdziale *cele pracy są racjonalne, logiczne i nie budzą wątpliwości pod względem przesłanek. Zostały zwięźle i jasno przedstawione.*

Cel badań. Celem badań opisanych w rozprawie doktorskiej mgr Wioletty Kmiecik było poznanie potencjału chorobotwórczego badanych izolatów bakteryjnych na poziomie fenotypowym z zastosowaniem testów biochemicznych (profilu enzymatycznego i wybranych toksyn) oraz na poziomie genetycznym, z wykorzystaniem starterów zarówno rekomendowanych przez innych autorów, jak też nowych starterów, zaprojektowanych przez Doktorantkę, która poszukiwała tymi metodami cech wpływających na zdolności kolonizowania i cech pełniących ważne role w patogenezie i w mechanizmach zakażeń

gronkowcowych. Do przyjętych zadań Doktorantka włączyła także ocenę stopnia rozprzestrzeniania lekooporności wśród badanych izolatów w celu poznania możliwości skutecznej terapii infekcji powodowanych przez te bakterie. Ważnym celem jest też uchwycenie zmian ewolucyjnych szczepów zwierzęcych przekształcających się w patogeny człowieka. Są to ambitnie przyjęte cele plasujące się w szeroko pojętej diagnostyce mikrobiologicznej oportunistycznych patogenów, bakterii grupy SIG. Cele te łączą trudną problematykę określania ich pozycji gatunkowej różnymi metodami pod względem tzw. poziomu technologicznego. Badania tego typu są wielce pożądane gdyż przynoszą nową wiedzę o gatunku *S. pseudintermedius* i przyczyniają się do racjonalizacji diagnostyki, podniesienia efektywności terapii oraz uporządkowania wiedzy o tym mało poznanym gatunku bakterii. Cele badań ogólny i szczegółowe rozprawy zostały przedstawione w syntetycznej formie wyczerpująco. *Recenzent ocenia bardzo dobrze ten rozdział rozprawy.*

Materiały i metody zastosowane w pracy zostały opisane zgodnie z uniwersyteckimi standardami i zasadniczo w sposób wystarczający, aby czytelnik mógł ocenić prawidłowość eksperymentów i wypracować własny pogląd na temat wartości naukowej uzyskanych wyników. W tym miejscu recenzent zatrzymuje się nad kilkoma praktycznymi kwestiami.

Materiał badawczy. *Kolekcja badanych izolatów bakteryjnych została złożona bardzo dobrze, zarówno pod względem liczby (61 szczepów) jak i pochodzenia ich (szczepy referencyjne z międzynarodowych kolekcji i szczepy z własnej kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej), pochodzące z zakażeń pacjentów i zwierząt, co odpowiada założeniom projektu, mającego za cel identyfikację, charakterystykę biochemiczną i genetyczną, analizy grupowe szczepów, i potencjału chorobotwórczego, a nie dochodzenia epidemiologiczne czy analizy ekologiczne. Pewien niedosyt powoduje brak informacji o losach izolatów od chwili pobrania materiału od pacjenta do wykonania pierwszego testu; o sposobie ich bankowania, warunkach przechowywania, liczbach przebytych pasażu, etc. Dobór użytych szczepów, dzikich i wzorcowych, jak również ich liczby są prawidłowe.*

Metody. W rozdziale tym Doktorantka opisała szczegółowo stosowane przez siebie metody badawcze: klasyczne – fenotypowe (hodowlane, biochemiczne, enzymatyczne) i zaawansowane metody molekularne – spektrometryczną metodę MALDI-TOF i genetyczne, typowanie kaset genetycznych *SCCmec* i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) – Multiplex PCR. Zastosowała cztery programy komputerowe na różnych etapach projektu. Dowodzi to bardzo dobrego opanowania warsztatu badań. *Zastosowane metody opisano precyzyjnie; dobrano je właściwie do realizacji założonych celów badawczych.*

Wyniki. Obszerną część pracy zajmuje rozdział „Wyniki” poświęcony przedstawieniu uzyskanych rezultatów badań (27 stron). Autorka uzyskała dużo oryginalnych wyników, które sprawnie zaprezentowała dzieląc ten rozdział na szereg podrozdziałów, a dodatkowo ilustrowanych 26 tabelami oraz 15 barwnymi rycinami i fotografiami żeli z rozdziałami elektroforetycznymi i testów biochemicznych. Spisy tabel i rycin (str. 155-157) porządkują i ułatwiają czytelnikowi poruszanie się w tym obszernym materiale. Część wyników przedstawionych w dodatkowych 18 tabelach Autorka umieściła w Aneksie, stanowiącym

autonomiczną część rozprawy, co recenzent ocenia pozytywnie. Najważniejsze z uzyskanych wyników:

1. Poznanie bogatego pangenomu gatunku *Staphylococcus pseudintermedius*; odkrycie szeregu nowych cech szczepów tego gatunku, w tym cech o podstawowym znaczeniu w zjawiskach kolonizowania tkanek gospodarza.
2. Samodzielne skonstruowanie starterów reakcji PCR w badaniach toksynotwórczości izolatów i rozpoznanie obecności genów kodujących ważne toksyny. Jest pierwszym badaczem, który wykrył gen *sec* w izolatach *S. pseudintermedius* (u 8%).
3. Rozpoznanie profilu lekooporności przedstawicieli tego gatunku co pozwala na skuteczne leczenie zakażeń powodowanych przez *S. pseudintermedius* u ludzi, a jednocześnie zagrożenia z powodu występującej lekooporności wśród szczepów zwierzęcych.
4. Uzyskanie dowodów przemian genetycznych i fenotypowych w obrębie gatunku *S. pseudintermedius* powiększających jego potencjał patogenny względem człowieka.
5. Uzyskanie podstaw do zmiany strategii diagnostycznej w kierunku uwzględnienia prawdopodobieństwa przynależności izolatów, zwierzęcych i ludzkich, do poziomu grupy SIG a nie wyłącznie do gatunku *S. intermedius*.
6. Z powodów stwierdzenia braku obecności unikatowych biomarkerów biochemicznych i jednocześnie nieprzydatności zaawansowanej metody MALDI-TOF w identyfikacji szczepów gatunku *S. pseudintermedius*, zaproponowanie dwustopniowej procedury identyfikacyjnej (przez oznaczanie genu *nuc* wg. Sasaki i wsp. i potwierdzenie w oparciu o startery genu *hly* zaproponowane przez Autorkę).

Dyskusja. Biorąc pod uwagę dużo uzyskanych przez Doktorantkę wyników, o wysokiej wartości poznawczej, kolejny rozdział – „Dyskusja” wymagał szczególnej dyscypliny i logiki. Doktorantka wywiązała się sprawnie z tego wyzwania. Krytycznie skomentowała swoje osiągnięcia odnosząc się do wiedzy i wyników innych autorów, sformułowała syntetycznie kilka tez. Przy lekturze tego rozdziału recenzent zwraca uwagę na kilka bardzo dobrze komentowanych zagadnień. Oceniana praca przyniosła szereg nowych, dotąd niepublikowanych obserwacji dotyczących cech związanych z chorobotwórczością opisywanego gatunku. Autorka znalazła szczepy *S. pseudintermedius* stanowiące dowody zmian tego gatunku wzmacniających jego potencjał patogenny dla człowieka. Jest to dowód na szybko zachodzące przemiany, które kończą się pojawieniem nowych patogenów człowieka w postaci klinicznych koagulazododatnich gronkowców gatunku *S. pseudintermedius*. Jest tu rozwinięcie opisu tych bakterii na etapie ich przekształcania, z patogenów zwierzęcych na ludzkie, czyli zmian ewolucyjnych uwarunkowanych wieloma czynnikami, opisanymi w tym rozdziale.

Rozdział „Wnioski” podsumowuje w zwięzły sposób wyniki uzyskane przez Doktorantkę i jest zdaniem recenzenta użytecznym zwieńczeniem rozprawy. Jest to siedem rozbudowanych konkluzji wynikających z osiągniętych wyników.

Rozdział „Piśmiennictwo” obejmuje 266 oryginalnych pozycji na 35 stronach. Jest to dowód bardzo dobrego przygotowania Doktorantki do przeprowadzonych badań.

Ocena strony językowej i edytorskiej. Oceniana praca została przygotowana bardzo starannie. Tekst został napisany przejrzystym i zwięzłym językiem, zdania są pełne i zrównoważone. Czytanie pracy budzi zainteresowanie czytelnika. Jednak szczegółowa analiza wykazała szereg uchybień, jak: i) liczebniki porządkowe stron powinny zaczynać się od „Wstępu” a nie od strony tytułowej; ii) zjawiska i wielkości policzalne określa się słowem „liczba” a nie „ilość”, na str. 41, 82, 86 i in.; iii) ocena pojęć jak „odsetek”, nie „mniejszy” lecz „niższy” lub „wyższy”; „ilość” nie „większa” lecz „wyższa” lub „niższa”; iv) aktywność nie „słaba” lecz „niska”; v) ryzyko coś „podnosi” a nie „zwiększa”; vi) pojęcia żargonowe, jak „parazyty” na str. 85 i „stworzenie” na str. 30. Są to jednak drobiazgi; w całej pracy nie natrafiono na ani jeden błąd stylistyczny czy ortograficzny.

Podsumowanie. Niniejszym recenzent stwierdza, że rozprawa doktorska Pani mgr Wioletty Kmieciak została wykonana i zredagowana zgodnie z przyjętym kanonem uniwersyteckim i spełnia wszystkie wymagania formalne ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Oceniana rozprawa przedstawia dużo oryginalnych wyników badań eksperymentalnych i analiz komputerowych zrealizowanych w oparciu o odważną koncepcję. Doktorantka stosowała metody badawcze zarówno klasyczne, zweryfikowane w długoletniej praktyce diagnostycznej, jak i metody zaawansowane, które w dużej mierze są nowością naukową i wnoszą poważny wkład w zrozumienie badanych zjawisk. Recenzent wysoko ocenia inwencje Doktorantki dotyczące koncepcji projektu, analiz molekularnych izolatów ze szczególnym uwzględnieniem projektowania oryginalnych starterów, analiz *in silico*, gruntownej „Dyskusji” jak i wyciągnięcia wniosków końcowych. Rozprawa została przygotowana niemal wzorowo. Spełnione są również formalne wymogi ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2003 nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). **Recenzent z satysfakcją wnosi do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Wioletty Kmieciak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę mają duże znaczenie w poszukiwaniach mechanizmów chorobotwórczości bakterii będących oportunistycznymi patogenami z gatunku *Staphylococcus pseudintermedius*. Kompletnie opisanie tego gatunku, jego cech fenotypowych i genetycznych, zbadanych kilkoma standardowymi i zaawansowanymi metodami oraz dodatkowe analizy informatyczne, budzą wysokie uznanie recenzenta. Wykazane umiejętności doktorantki, Jej wiedza i dorobek, potwierdzają kompetencje naukowe na bardzo wysokim poziomie, co w pełni uzasadnia wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Wysoką Radę Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Kielce, 23.03.2018 r.

