

Recenzja

pracy doktorskiej pt. „Szczepy grupy *Staphylococcus intermedius* (SIG) izolowane z materiałów klinicznych od ludzi i od zwierząt towarzyszących – identyfikacja i potencjał chorobotwórczy” wykonanej przez Panią mgr Wiolettę Kmiecik w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Eligii M. Szewczyk

Jednym z zagrożeń XXI wieku w zakresie chorób infekcyjnych są choroby wywoływane przez drobnoustroje odzwierzęce, które przekraczając barierę gatunkową, atakują ludzi. Wśród nich jednym z nowych, nie do końca jeszcze poznanych patogenów istotnych z punktu widzenia patologii człowieka są koagulazododatnie gronkowce grupy *Staphylococcus intermedius* (SIG), do której należą *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* oraz *Staphylococcus delphini*. Pojawianie się nowych patogenów niesie za sobą konieczność rozwiązywania szeregu problemów o charakterze diagnostyczno-klinicznym. W ten nurt badań, istotnych z punktu widzenia współczesnej medycyny, wpisuje się recenzowana dysertacja doktorska.

Cele pracy doktorskiej Pani mgr Wioletty Kmiecik obejmowały: (i) znalezienie najbardziej wiarygodnej metody identyfikacji izolatów pochodzenia zwierzęcego i ludzkiego wstępnie zaklasyfikowanych do grupy SIG, stosując zarówno metody rekomendowane w rutynowej diagnostyce bakteriologicznej w medycznych laboratoriach diagnostycznych, jak i innowacyjną metodę MALDI-TOF oraz metody genetyczne, (ii) charakterystykę potencjału chorobotwórczego badanych izolatów na poziomie fenotypowym i genotypowym, z uwzględnieniem ich właściwości kolonizacyjnych oraz wytwarzania wybranych czynników chorobotwórczości, odgrywających istotną rolę w patogenezie zakażeń gronkowcowych, (iii) ocenę stopnia rozprzestrzeniania lekooporności wśród badanych izolatów. Nadrzędnym celem tej rozprawy było poszerzenie i uporządkowanie wiedzy w zakresie mało poznanych gatunków gronkowców z grupy SIG.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 175 stron. Zawiera 26 tabel oraz 15 rycin. Składa się z zasadniczych rozdziałów, typowych dla prac o charakterze eksperymentalnym, takich, jak Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Summary i Piśmiennictwo. Główne rozdziały poprzedzone są Wykazem skrótów, a na końcu pracy zamieszczono Spis tabel, Spis rycin oraz Aneks, prezentujący dane eksperymentalne uzyskane dla poszczególnych, badanych izolatów. Piśmiennictwo liczy ogółem 266 pozycji, w tym około 35% stanowią artykuły oryginalne, poglądowe i książki z lat 2013-2018. Ponadto, w Piśmiennictwie uwzględniono profesjonalne strony internetowe. Piśmiennictwo zawiera też historyczne publikacje o istotnym znaczeniu w aspekcie badań nad gronkowcami i ich udziałem w patologii człowieka.

We Wstępie Doktorantka przedstawiła etapy przełamania barier międzygatunkowych przez patogeny zwierzęce, ich miejsce w medycznej diagnostyce mikrobiologicznej, podstawy taksonomii gronkowców, ze szczególnym uwzględnieniem gronkowców koagulazododatnich oraz charakterystykę gronkowców z grupy SIG, którą stanowią trzy blisko spokrewnione ze sobą gatunki: *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* i *Staphylococcus delphi*, z uwzględnieniem problemów diagnostycznych w obrębie tej grupy drobnoustrojów. Ponadto, opisała ważne aspekty związane z możliwością kolonizacji organizmu człowieka przez patogeny zwierzęce, w tym gronkowce z grupy SIG, potencjał chorobotwórczy tej grupy drobnoustrojów oraz ich znaczenie jako rezerwuaru genów lekooporności. Wstęp świadczy o szerokiej i ugruntowanej wiedzy Doktorantki w zakresie tej tematyki.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka, zaznaczyła, że szczepy grupy SIG, będące przedmiotem badań, należą do kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Na uwagę zasługuje, opisana w Aneksie, kolekcja tych izolatów pochodzących z materiałów klinicznych od ludzi (18 izolatów) i zwierząt (43 izolaty), wstępnie zidentyfikowanych przy użyciu metody MALDI-TOF MS jako *S. intermedius* (11 izolatów) lub *S. pseudintermedius* (50 izolatów). Metodyka eksperymentów wykonywanych w toku pracy, zarówno w zakresie metod fenotypowych jak i genotypowych, poprzedzona wykazem niezbędnych szczepów referencyjnych, wzorcowych i wskaźnikowych oraz pożywek bakteriologicznych, odczynników chemicznych, stosowanej aparatury i programów komputerowych, została opisana w sposób systematyczny i szczegółowy. Całość tego rozdziału świadczy o

profesjonalnym i wszechstronnym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnego wykonywania części doświadczalnej pracy.

W rozdziale Wyniki Doktorantka przedstawiła uzyskane dane eksperymentalne w postaci 15 tabel i 6 rycin. Ponadto, wyniki uzyskane dla wszystkich badanych izolatów pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego zebrano w postaci 16 tabel oraz umieszczono je w Aneksie. Ten rozdział został podzielony na 6 podrozdziałów, obejmujących: (i) identyfikację badanych szczepów metodami fenotypowymi i genotypowymi, (ii) ocenę właściwości biochemicznych, (iii) ocenę występowania czynników sprzyjających kolonizacji i proliferacji na powierzchni skóry, (iv) ocenę wytwarzania toksyn, w tym cytolizyn, zdolności do tworzenia biofilmu, występowania czynników sprzyjających kolonizacji i proliferacji w obrębie tkanek, (v) określenie profili lekowrażliwości oraz ocenę występowania wybranych genów warunkujących oporność, (vi) analizę statystyczną. Uważam, że ten ostatni podrozdział mógłby być usunięty, ponieważ na bieżąco przedstawiane są wyniki analizy statystycznej. Informacje zawarte w tym podrozdziale można by ewentualnie przenieść do Wniosków. Należy zaznaczyć, że w toku przeprowadzonej identyfikacji metodami molekularnymi w badanej kolekcji gronkowców z grupy SIG zidentyfikowano 59 szczepów *S. pseudintermedius*, które były przedmiotem dalszych, szczegółowych badań. Na szczególną uwagę zasługuje szerokie wykorzystanie metod molekularnych w charakterystyce badanych szczepów, co pozwoliło na zebranie ważnych, nowych informacji na temat *S. pseudintermedius* w aspekcie jego znaczenia jak patogenu człowieka.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka skonfrontowała wyniki badań własnych z danymi literaturowymi i dokonała ich krytycznej analizy. W tym rozdziale Doktorantka poruszyła problemy związane z identyfikacją gronkowców z grupy SIG, zwracając uwagę na fakt, że ich identyfikacja powinna być wykonywana metodami molekularnymi, a zastosowanie nowoczesnej metody MALDI-TOF w przypadku tych drobnoustrojów wymaga poszerzenia baz danych w celu uzyskania wiarygodnych wyników. Ponadto, zwróciła uwagę na potencjał kolonizacyjny i toksynotwórczy tej grupy gronkowców w kontekście zagrożenia dla organizmu gospodarza oraz analizy genomów w zakresie genów warunkujących produkcję wybranych toksyn, uwzględniając możliwość transferu tych genów od innych gronkowców, zwłaszcza *Staphylococcus aureus*. Ważna część Dyskusji dotyczy problemu lekooporności w aspekcie skutecznej terapii zakażeń wywoływanych przez gronkowce z grupy SIG, zwłaszcza szczepy pochodzenia zwierzęcego, wśród których notuje się wyższy odsetek szczepów opornych na leki. W tym rozdziale Doktorantka zwróciła uwagę na to, że szczegółowa analiza

uzyskanych wyników w badanej grupie izolatów klinicznych *S. pseudintermedius* pozwoliła na wykrycie dowodów wskazujących na możliwość przystosowania się tego gatunku do bytowania w organizmie człowieka oraz nabycia cech warunkujących jego potencjał patogenny wobec człowieka. Przedmiotem badań była stosunkowo mała grupa izolatów, ale dobrze zidentyfikowanych, a szeroki wachlarz wykonanych eksperymentów umożliwił zebranie odpowiednich danych, warunkujących możliwość przeprowadzenia powyższej analizy. Całość Dyskusji świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorantka wyciągnęła 7 logicznych wniosków, obrazujących najważniejsze osiągnięcia recenzowanej pracy. Uważam jednak, że wniosek nr 1 mógłby być przeredagowany, koncentrując się na możliwościach identyfikacji gronkowców z grupy SIG w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej oraz interpretacji wyników tych badań. Zgromadzenie kilkunastu izolatów *S. pseudintermedius* izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi było warunkiem wykonania tej pracy.

Podsumowując, cel pracy został zrealizowany przez Doktorantkę, a recenzowana dysertacja doktorska stanowi oryginalne i bardzo wartościowe opracowanie dotyczące gronkowców z grupy SIG, zarówno w aspekcie teoretycznym jak i aplikacyjnym, zwłaszcza w kontekście rosnącego znaczenia tych drobnoustrojów jako czynników etiologicznych chorób infekcyjnych człowieka. Pani mgr Wioletta Kmiecik jest niewątpliwie ekspertem w obszarze problemów związanych z tą grupą gronkowców. Pewne niedociągnięcia zauważone w pracy, głównie o charakterze redakcyjnym i błędów edytorskich, oraz komentarze zawarte w treści recenzji mogą być skorygowane podczas przygotowywania pracy do druku i nie wpływają na ogólną, bardzo wysoką ocenę pracy.

Recenzowana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Wioletty Kmiecik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej i jej istotne znaczenie w aspekcie rozwiązywania nowych problemów w zakresie chorób infekcyjnych człowieka, stawiam wniosek o wyróżnienie tej pracy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej

prof. dr hab. Anna Malm