

Warszawa, dn.15.05.2017 r.

Recenzja Rozprawy doktorskiej mgr Anety Buda na stopień dr n. biol. pt:

„Fenotypowe i genetyczne typowanie bakteryjnych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z nadkażeń ran oraz nosicielstwa pacjentów z atopowym zapaleniem skóry”

Staphylococcus aureus (gronkowiec złocisty) jest gatunkiem, który szczególnie często towarzyszy człowiekowi zarówno w nosicielstwie, jak i w chorobie. Kolonizuje na stałe aż do 30% zdrowej populacji ludzi na świecie, a drugie tyle jest jego przejściowymi nosicielami. Istnieje więc ogromny rezerwuar tego drobnoustroju. Pomimo wielu badań, nie udało się ustalić czynników warunkujących zdolność do trwałej kolonizacji, ani po stronie gospodarza, ani po stronie drobnoustroju. Dzięki bogactwu zarówno komórkowych, jak i pozakomórkowych czynników zjadliwości, gronkowiec złocisty posiada zdolność wywoływania różnorodnych zakażeń, począwszy od miejscowych, do często ciężko przebiegających infekcji inwazyjnych, z których sepsa kończy się w ponad 20% przypadków zejściem śmiertelnym.

Gronkowiec złocisty dzięki obecności na swojej powierzchni adhezyn należących do grupy MSCRAMM ma szczególną łatwość wiązania się z tzw. białkami macierzy pozakomórkowej co powoduje wybitną zdolność do kolonizowania uszkodzonych tkanek i dalszej inwazji. Dlatego stanowi ogromne zagrożenie dla pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. Choroba ta, o niewyjaśnionym do końca patomechanizmie, stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia pacjentów nią dotkniętych, do czego znacząco przyczynia się łatwość kolonizacji zmian atopowych przez gronkowce. To właśnie one powodują najwięcej powikłań zakaźnych prowadząc do pogłębienia choroby podstawowej, a niekiedy do uogólnienia się zakażenia wraz ze wszystkimi poważnymi konsekwencjami.

W związku z powyższym, dobór tematu Rozprawy wpisuje się w ważny tor badawczy i to zarówno ze względu na drobnoustrój, jak i na chorobę, którą często wikła.

Rozprawa ma charakter klasyczny. Wprowadzenie zawiera się na 13 stronach. Rozpoczyna je krótki opis rodzaju *Staphylococcus*, po którym następuje zwięzła, ogólna charakterystyka gatunku *S. aureus*. I tu mam kilka uwag. Przede wszystkim zabrakło mi informacji dotyczącej taksonomii rodzaju, ale przede wszystkim charakterystyki gatunku *S. aureus*. Zabrakło mi także opisu konsekwencji kolonizacji, nie tylko negatywnych, ale i pozytywnych, o których mówią cytowane przez Doktorantkę publikacje. Zbyt lakonicznie potraktowany został opis oporności na antybiotyki *S. aureus*. Ponadto, znalazło się w nim kilka błędów i nieścisłości. Pierwsza nieścisłość to stwierdzenie, że ...”HA-MRSA są wielolekooporne, w tym coraz częściej na antybiotyki ostatniej szansy – glikopeptydy, linezolid czy daptomycynę..” To jest ciągle zjawisko sporadyczne i na przykład w Polsce nie stwierdzono dotąd żadnego szczepu *S. aureus* opornego na glikopeptydy, linezolid czy daptomycynę. Ponadto, kilka lat temu wprowadzono nowe leki przeciwko MRSA takie jak ceftarolina, ceftobiprol (wspomniane poniżej) oraz dalbawancynę. Informacja na temat CA-MRSA nie jest także precyzyjna, bowiem CA-MRSA nie sprawiają trudności diagnostycznych i nie są z zasady heterogenne. Nie stosuje się już określenia „FA-MRSA” tylko „LA-MRSA” (Livestock-Associated MRSA). Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła cech pozwalających na różnicowanie tych trzech populacji MRSA.

Stwierdzam także nieścisłości w terminach medycznych dotyczących postaci klinicznych zakażeń gronkowcowych, jak np. nieznanym mi terminem .. „przyczyna etiologiczna...”, a także „gronkowcowe zakażenie układu krążenia”; z pewnością chodzi tu o zakażenie łożyska krwi albo zakażenia w obrębie układu sercowo-naczyniowego. Trudno także zgodzić się z zaliczeniem zakażeń układu pokarmowego, moczowo-płciowego, czy ośrodkowego układu nerwowego o etiologii *S. aureus* do największych problemów medycznych. Gronkowiec złocisty w ich etiologii jest na odległym miejscu. Natomiast jest wiodącym czynnikiem etiologicznym infekcji skóry i tkanki podskórnej oraz kości i stawów. O tych ostatnich Doktorantka nawet nie wspomina. Nie ma słowa o chorobach wynikających z wytwarzania toksyn.

W dalszej części Wstępu, Doktorantka omawia w ogromnym skrócie czynniki wirulencji gronkowca złocistego, wskazując na różne strategie uruchamiane przez ten drobnoustrój w celu adhezji do komórek gospodarza i wywoływania zmian patologicznych.

W tym samym podrozdziale umieszczone zostało zagadnienie oporności na antybiotyki, która nie stanowi cechy wirulencji. Wydaje się, że ten temat powinien być umieszczony w odrębnym podrozdziale. Zgodzę się z Doktorantką, że najbardziej rozpowszechnioną opornością wśród gronkowców jest oporność na penicylinę, ale z pewnością nie wynika ona jak podaje Doktorantka z „... obecności na powierzchni komórki białka wiążącego penicylinę zwanego PBP...”, ale wynika ona przede wszystkim z wytwarzania przez gronkowce penicylinaz (beta-laktamazy o wąskim spektrum działania). Białka PBP (różna liczba w zależności od gatunku), to zespół enzymów biorących udział w procesie syntezy ściany komórkowej, do których wiążą się antybiotyki beta-laktamowe (zróżnicowane powinowactwo beta-laktamów do poszczególnych PBP) i w ten sposób hamują biosyntezę ściany komórkowej, co jest istotą ich działania jako antybiotyków. Jest to bardzo poważna luka w wiedzy na temat mechanizmu działania beta-laktamów, oporności gronkowców na penicylinę i inne beta-laktamy, a także znajomości biosyntezy ściany komórkowej bakterii. Nieścisłości są także w określaniu oporności gronkowców na metycylinę (MRSA). PBP2a i PBP2' to są różne nazwy tego samego białka, które jest nowym białkiem, dodatkowym w stosunku do PBP typowych dla gatunku. Zbyt powierzchowny jest opis oporności na metycylinę i Doktorantka nie wspomina o nowym genie *mecC*, także warunkującym tę oporność i mogącym sprawiać trudności w jej identyfikacji, a tym samym braku rozpoznania szczepu jako MRSA.

Szkoda, że Doktorantka nie opisała innych, częstych u gronkowców mechanizmów oporności, zwłaszcza, że Wstęp jest bardzo krótki.

Kolejny podrozdział Wprowadzenia dotyczy atopowego zapalenia skóry, jego ogólnej charakterystyki i epidemiologii oraz drobnoustrojów rezydujących na zdrowej skórze i zakażających zmiany atopowe. Powołuje się na kryteria kliniczne z 1980 r. Były one już kilkakrotnie uaktualniane, co oczywiście należało wziąć pod uwagę. Mam kolejny niedosyt informacji, tym razem dotyczących ekologii skóry zdrowej i atopowej i zależności między drobnoustrojami w tych sytuacjach. Doktorantka mówi o „bakteriach koagulazo-ujemnych”, a winna napisać „gronkowce koagulazo-ujemne”, podaje rozwinięcie skrótu HPV jako „human parvovirus” a winno być „human papilloma virus”. W Tabeli 1 nie podaje źródła cytowanych informacji, a jedynie jej Autorów.

Kolejny podrozdział Wprowadzenia mówi o metodach typowania szczepów *S. aureus*. Przedstawiono metody typowania fenotypowego, podkreślając ich ograniczenia. Nie do końca jasno wyjaśniono cel takiego postępowania. Typowanie nie służy zastosowaniu terapii celowanej. Część o typowaniu molekularnym potraktowana została także w sposób bardzo skromny. Wprawdzie Doktorantka wymieniła szereg metod ale opisała jedynie dwie z nich, zupełnie pomijając MLST, a nawet nie wymieniając WGS. Nie ma słowa o kasetach SCCmec, które także są istotnym elementem typowania i charakterystyki molekularnej MRSA.

Cel pracy poprzedzony jest ważnym wstępem, który uzasadnia podjęcie pracy. Sformułowano aż 7 szczegółowych celów. Zaplanowano badanie cech fenotypowych z nadważań, a przecież badano także szczepy z nosicielstwa od zdrowych osób.

Materiał i Metody są zawarte na 20 stronach. Mam kilka uwag. Szczepy referencyjne nie wyczerpują potrzeb prezentowanej pracy. Uzyskanie ich z WBBiB UJ nic nie mówi o ich wiarygodności (który pasaż). Nie jest dla mnie do końca zrozumiały wybór miejsc do oceny nosicielstwa. Badano tylko te miejsca, które manifestowały się zmianami atopowymi. Wydaje mi się, że warto było także wziąć wymazy z miejsc „standardowo” pobieranych w celu ustalenia kolonizacji *S. aureus*.

Grupa kontrolna składała się jedynie z 10 szczepów. To bardzo niewiele, a przecież pozyskiwanie ich nie jest trudne.

Nie umiem znaleźć wytłumaczenia, jakie przesłanki kierowały Doktorantką w wyborze krążków z antybiotykami. Po co badano wrażliwość na penicylinę, ampicylinę i amoksycylinę. To nie jest zgodne ani z EUCAST, ani z CLSI, ani z rekomendacjami KORLD (złe cytowanie i niewłaściwy rok). Zawartość krążka z penicyliną nie jest zgodna z rekomendacjami ani EUCAST, ani CLSI. Ponadto, warto było nastawić inne leki stosowane w terapii zakażeń *S. aureus*, a zwłaszcza glikopeptydy, lipopeptydy, oksazolidinony i rifampicynę. Jaką metodą oznaczano wrażliwość na makrolidy i linkozamidy? Dlaczego nie zastosowano metody rozcieńczeniowej oznaczania antybiotykooporności, która jest referencyjna? Szczep USA 300 nie jest szczepem referencyjnym do oznaczania lekowrażliwości.

Metody genetyczne są starannie opisane wraz ze szczegółowym przedstawieniem odczynników, warunków prowadzenia doświadczeń i zastosowanych metod. Przedstawiono także metody analizy statystycznej.

Rozdział Wyniki zawiera się na 40 stronach i szeroko przedstawia w pierwszej części dane na temat nosicielstwa i fenotypową analizę szczepów w oparciu o ich cechy.

Badania aktywności hemolitycznej i proteolitycznej, a także wzory oporności na antybiotyki nie pozwalały na różnicowanie szczepów z nosicielstwa i zmian atopowych. Grupa kontrolna była bardzo nieliczna, a więc nie można do niej się odnosić celem porównania.

Badane cechy biochemicznie w niewielkim stopniu różnicowały szczepy izolowane z przedsonka nosa i zakażeń zmian atopowych. Szkoda, że dopiero w tabeli zbiorczej porównano aktywności szczepów od jednego pacjenta, a izolowanych z różnych lokalizacji. Podobnie przedstawia się sprawa wzorów lekowrażliwości. Oczywiście to nie jest zarzut, ale czytałoby się te wyniki lepiej. Nie podano rozszerzenia skrótu „CFX” a nie jest on rutynowo stosowany.

Najciekawszą i najszerszej opisaną częścią Rozprawy jest typowanie molekularne. Typowanie *spa* pozwoliło na ujawnienie nowych, dotychczas nieopisywanych typów. Wykazano, że dominującym typem jest t091. Typ *spa* t015 obejmował zarówno szczepy MSSA, jak i MRSA, natomiast t223 grupowało jedynie szczepy MRSA. Ciekawy wynik typowania *spa* uzyskano dla szczepów grupy kontrolnej. Charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem i ciekawe, że w większości przypadków obejmowały typy *spa* niewykryte w grupie szczepów izolowanych od pacjentów z AZS. Szkoda, że do badania włączono tak małą ich liczbę.

Starannie przedstawiono analizę BURP, która pozwoliła na przypisanie typów *spa* do kompleksów klonalnych. Określono 9 kompleksów klonalnych.

Zastosowana analiza MLVF, często stosowana w typowaniu *S. aureus*, pozwoliła na skonstruowanie drzewa filogenetycznego. Otrzymano aż 32 klastery, z których dominujący obejmował 24% szczepów. Czy to są jakieś specjalne szczepy?, o szczególnej lokalizacji?, powodujące cięższe?, czy lżejsze zakażenia? Czy istnieją powiązania między pacjentami co do pokrewieństwa, miejsca zamieszkania, pracy?

Cennym elementem analizy wyników typowania molekularnego jest porównanie zgodności porównywanych metod i siły dyskryminacyjnej. Rozdział Wyniki zamyka tabela zbiorcza, starannie przygotowana i czytelna.

Dyskusja zawiera się na 12 stronach i niepotrzebnie powtarza dość szczegółowo i w wielu jej miejscach cele pracy, materiał i metody oraz wyniki. Prawdziwa dyskusja zawiera się na nieomal kilku stronach. Doktorantka podaje, że nosicielstwo w badanej grupie było wyższe, niż w dotychczas opisywanych badaniach. Nie odnosi się do typów nosicielstwa, co mogłoby wyjaśnić te różnice. Poza tym, w Rozprawie zajmowano się niewielką grupą pacjentów, więc nie jest właściwe porównywać wyniki własne z meta analizą, obejmującą kilka tysięcy pacjentów. Dyskusja dotycząca analizy aktywności proteolitycznej i hemolitycznej jest bardzo skąpa i Doktorantka niewystarczająco próbuje wyjaśnić przyczyny różnic w wynikach otrzymanych w badaniach własnych i w literaturze światowej. Zresztą zastosowane w Rozprawie metody oparte o arbitralną ocenę wyników nie ułatwiają tego zadania. Część dotycząca oporności także powtarza już wcześniej przedstawione wyniki. Nie odnosi się jednak i nie komentuje uzyskanych wyników, np. wysokiej oporności na chloramfenikol, czy erytromycynę, znacznie przewyższającą poziom w innych zakażeniach i innych grupach pacjentów. Nie wiem po co rozdziela się Wyniki dla szczepów uzyskanych od kobiet i mężczyzn przy tak małej próbie badawczej, zwłaszcza, że nie dyskutuje się obserwowanych różnic np. w oporności.

Typowanie molekularne ujawniło częstą identyczność szczepów izolowanych z różnych miejsc u jednego pacjenta. Jest to fakt znany od dawna. Najczęstsze typy *spa* odpowiadają tym, które były już opublikowane wcześniej jako najczęstsze (np. Rolo J et al., 2012; Grundman H. et al., 2014). Szkoda, że nie zostały one przytoczone w dyskusji.

Doktorantka słusznie stwierdza, że liczebność badanej grupy była niewielka, przez co dlatego wyciąganie wniosków jest trudne, a zwłaszcza ich uogólnianie. Trudno się więc zgodzić ze stwierdzeniem Doktorantki, że przedstawiona Rozprawa wnosi poważną wartość, pozwalając lepiej zrozumieć etiologię choroby. Etiologia dotyczy zakażenia, natomiast aby zrozumieć chorobę, trzeba lepiej poznać jej patogenezę.


Rozprawa kończy się podsumowaniem i wnioskami. Niestety, tylko dwa z nich można uznać za wnioski, bowiem pozostałe są wynikami.

Piśmiennictwo zawiera się na 10. stronach. Należy je uporządkować i tak np. pozycja „Żabicka D...” znajduje się pod „D” a nie „Ż”, nazwisko Brook napisano w całości wielkimi literami BROOK. Należy odnosić się do aktualnych zaleceń KORLD i podawać skąd się je pozyskało. Na stronie 97 2-ga od dołu pozycja piśmiennictwa jest niedokończona. O braku staranności świadczy także cytowanie publikacji Bogdali A.M i współautorów , w której to współautorzy podani są z imienia a nie nazwiska np. Anna BM, Grazyna A itp. Taki sposób cytowania powinien wzbudzić czujność. Do tej publikacji umieszczono Corrigendum , którego Doktorantka nie zauważyła.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa dotyczy ważnego problemu medycznego i mikrobiologicznego. Jednak w związku z licznymi nieścisłościami, błędami przedstawionymi powyżej proponuję jej uzupełnienie i przeredagowanie biorąc pod uwagę powyżej wymienione uwagi. Taki tryb dopuszcza Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 (§ 6 p.6).

Ze względu na fakt , że Rozprawa zawiera także szereg wartościowych wyników, zwłaszcza w części dotyczącej typowania molekularnego, rekomenduję Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego zwrócenie Rozprawy Mgr Anecie Budy celem dokonania zasugerowanych przeze mnie poprawek i ponownego przedstawienia.

Warszawa dn. 15.05.2017


Prof.dr hab. n.med. Waleria Hryniewicz

Warszawa, dn.15.05.2017 r.

Recenzja Rozprawy doktorskiej mgr Anety Buda na stopień dr n. biol. pt:**„Fenotypowe i genetyczne typowanie bakteryjnych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z nadkażeń ran oraz nosicielstwa pacjentów z atopowym zapaleniem skóry”**

Staphylococcus aureus (gronkowiec złocisty) jest gatunkiem, który szczególnie często towarzyszy człowiekowi zarówno w nosicielstwie, jak i w chorobie. Kolonizuje na stałe aż do 30% zdrowej populacji ludzi na świecie, a drugie tyle jest jego przejściowymi nosicielami. Istnieje więc ogromny rezerwuar tego drobnoustroju. Pomimo wielu badań, nie udało się ustalić czynników warunkujących zdolność do trwałej kolonizacji, ani po stronie gospodarza, ani po stronie drobnoustroju. Dzięki bogactwu zarówno komórkowych, jak i pozakomórkowych czynników zjadliwości, gronkowiec złocisty posiada zdolność wywoływania różnorodnych zakażeń, począwszy od miejscowych, do często ciężko przebiegających infekcji inwazyjnych, z których sepsa kończy się w ponad 20% przypadków zejściem śmiertelnym.

Gronkowiec złocisty dzięki obecności na swojej powierzchni adhezyn należących do grupy MSCRAMM ma szczególną łatwość wiązania się z tzw. białkami macierzy pozakomórkowej co powoduje wybitną zdolność do kolonizowania uszkodzonych tkanek i dalszej inwazji. Dlatego stanowi ogromne zagrożenie dla pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. Choroba ta, o niewyjaśnionym do końca patomechanizmie, stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia pacjentów nią dotkniętych, do czego znacząco przyczynia się łatwość kolonizacji zmian atopowych przez gronkowce. To właśnie one powodują najwięcej powikłań zakaźnych prowadząc do pogłębienia choroby podstawowej, a niekiedy do uogólnienia się zakażenia wraz ze wszystkimi poważnymi konsekwencjami.

W związku z powyższym, dobór tematu Rozprawy wpisuje się w ważny tor badawczy i to zarówno ze względu na drobnoustrój, jak i na chorobę, którą często wikła.

Rozprawa ma charakter klasyczny. Wprowadzenie zawiera się na 13 stronach. Rozpoczyna je krótki opis rodzaju *Staphylococcus*, po którym następuje zwięzła, ogólna charakterystyka gatunku *S. aureus*. I tu mam kilka uwag. Przede wszystkim zabrakło mi informacji dotyczącej taksonomii rodzaju, ale przede wszystkim charakterystyki gatunku *S. aureus*. Zabrakło mi także opisu konsekwencji kolonizacji, nie tylko negatywnych, ale i pozytywnych, o których mówią cytowane przez Doktorantkę publikacje. Zbyt lakonicznie potraktowany został opis oporności na antybiotyki *S. aureus*. Ponadto, znalazło się w nim kilka błędów i nieścisłości. Pierwsza nieścisłość to stwierdzenie, że ...”HA-MRSA są wielolekooporne, w tym coraz częściej na antybiotyki ostatniej szansy – glikopeptydy, linezolid czy daptomycynę..” To jest ciągle zjawisko sporadyczne i na przykład w Polsce nie stwierdzono dotąd żadnego szczepu *S. aureus* opornego na glikopeptydy, linezolid czy daptomycynę. Ponadto, kilka lat temu wprowadzono nowe leki przeciwko MRSA takie jak ceftarolina, ceftobiprol (wspomniane poniżej) oraz dalbawancynę. Informacja na temat CA-MRSA nie jest także precyzyjna, bowiem CA-MRSA nie sprawiają trudności diagnostycznych i nie są z zasady heterogenne. Nie stosuje się już określenia „FA-MRSA” tylko „LA-MRSA” (Livestock-Associated MRSA). Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła cech pozwalających na różnicowanie tych trzech populacji MRSA.

Stwierdzam także nieścisłości w terminach medycznych dotyczących postaci klinicznych zakażeń gronkowcowych, jak np. nieznanym mi terminem .. „przyczyna etiologiczna...”, a także „gronkowcowe zakażenie układu krążenia”; z pewnością chodzi tu o zakażenie łożyska krwi albo zakażenia w obrębie układu sercowo-naczyniowego. Trudno także zgodzić się z zaliczeniem zakażeń układu pokarmowego, moczowo-płciowego, czy ośrodkowego układu nerwowego o etiologii *S. aureus* do największych problemów medycznych. Gronkowiec złocisty w ich etiologii jest na odległym miejscu. Natomiast jest wiodącym czynnikiem etiologicznym infekcji skóry i tkanki podskórnej oraz kości i stawów. O tych ostatnich Doktorantka nawet nie wspomina. Nie ma słowa o chorobach wynikających z wytwarzania toksyn.

W dalszej części Wstępu, Doktorantka omawia w ogromnym skrócie czynniki wirulencji gronkowca złocistego, wskazując na różne strategie uruchamiane przez ten drobnoustrój w celu adhezji do komórek gospodarza i wywoływania zmian patologicznych.

W tym samym podrozdziale umieszczone zostało zagadnienie oporności na antybiotyki, która nie stanowi cechy wirulencji. Wydaje się, że ten temat powinien być umieszczony w odrębnym podrozdziale. Zgodzę się z Doktorantką, że najbardziej rozpowszechnioną opornością wśród gronkowców jest oporność na penicylinę, ale z pewnością nie wynika ona jak podaje Doktorantka z „... obecności na powierzchni komórki białka wiążącego penicylinę zwanego PBP...”, ale wynika ona przede wszystkim z wytwarzania przez gronkowce penicylinaz (beta-laktamazy o wąskim spektrum działania). Białka PBP (różna liczba w zależności od gatunku), to zespół enzymów biorących udział w procesie syntezy ściany komórkowej, do których wiążą się antybiotyki beta-laktamowe (zróżnicowane powinowactwo beta-laktamów do poszczególnych PBP) i w ten sposób hamują biosyntezę ściany komórkowej, co jest istotą ich działania jako antybiotyków. Jest to bardzo poważna luka w wiedzy na temat mechanizmu działania beta-laktamów, oporności gronkowców na penicylinę i inne beta-laktamy, a także znajomości biosyntezy ściany komórkowej bakterii. Nieścisłości są także w określaniu oporności gronkowców na metycylinę (MRSA). PBP2a i PBP2' to są różne nazwy tego samego białka, które jest nowym białkiem, dodatkowym w stosunku do PBP typowych dla gatunku. Zbyt powierzchowny jest opis oporności na metycylinę i Doktorantka nie wspomina o nowym genie *mecC*, także warunkującym tę oporność i mogącym sprawiać trudności w jej identyfikacji, a tym samym braku rozpoznania szczepu jako MRSA.

Szkoda, że Doktorantka nie opisała innych, częstych u gronkowców mechanizmów oporności, zwłaszcza, że Wstęp jest bardzo krótki.

Kolejny podrozdział Wprowadzenia dotyczy atopowego zapalenia skóry, jego ogólnej charakterystyki i epidemiologii oraz drobnoustrojów rezydujących na zdrowej skórze i zakażających zmiany atopowe. Powołuje się na kryteria kliniczne z 1980 r. Były one już kilkakrotnie uaktualniane, co oczywiście należało wziąć pod uwagę. Mam kolejny niedosyt informacji, tym razem dotyczących ekologii skóry zdrowej i atopowej i zależności między drobnoustrojami w tych sytuacjach. Doktorantka mówi o „bakteriach koagulazo-ujemnych”, a winna napisać „gronkowce koagulazo-ujemne”, podaje rozwinięcie skrótu HPV jako „human parvovirus” a winno być „human papilloma virus”. W Tabeli 1 nie podaje źródła cytowanych informacji, a jedynie jej Autorów.

Kolejny podrozdział Wprowadzenia mówi o metodach typowania szczepów *S. aureus*. Przedstawiono metody typowania fenotypowego, podkreślając ich ograniczenia. Nie do końca jasno wyjaśniono cel takiego postępowania. Typowanie nie służy zastosowaniu terapii celowanej. Część o typowaniu molekularnym potraktowana została także w sposób bardzo skromny. Wprawdzie Doktorantka wymieniła szereg metod ale opisała jedynie dwie z nich, zupełnie pomijając MLST, a nawet nie wymieniając WGS. Nie ma słowa o kasetach SCCmec, które także są istotnym elementem typowania i charakterystyki molekularnej MRSA.

Cel pracy poprzedzony jest ważnym wstępem, który uzasadnia podjęcie pracy. Sformułowano aż 7 szczegółowych celów. Zaplanowano badanie cech fenotypowych z nadważerń, a przecież badano także szczepy z nosicielstwa od zdrowych osób.

Materiał i Metody są zawarte na 20 stronach. Mam kilka uwag. Szczepy referencyjne nie wyczerpują potrzeb prezentowanej pracy. Uzyskanie ich z WBBiB UJ nic nie mówi o ich wiarygodności (który pasaż). Nie jest dla mnie do końca zrozumiały wybór miejsc do oceny nosicielstwa. Badano tylko te miejsca, które manifestowały się zmianami atopowymi. Wydaje mi się, że warto było także wziąć wymazy z miejsc „standardowo” pobieranych w celu ustalenia kolonizacji *S. aureus*.

Grupa kontrolna składała się jedynie z 10 szczepów. To bardzo niewiele, a przecież pozyskiwanie ich nie jest trudne.

Nie umiem znaleźć wytłumaczenia, jakie przesłanki kierowały Doktorantką w wyborze krążków z antybiotykami. Po co badano wrażliwość na penicylinę, ampicylinę i amoksycylinę. To nie jest zgodne ani z EUCAST, ani z CLSI, ani z rekomendacjami KORLD (złe cytowanie i niewłaściwy rok). Zawartość krążka z penicyliną nie jest zgodna z rekomendacjami ani EUCAST, ani CLSI. Ponadto, warto było nastawić inne leki stosowane w terapii zakażeń *S. aureus*, a zwłaszcza glikopeptydy, lipopeptydy, oksazolidinony i rifampicynę. Jaką metodą oznaczano wrażliwość na makrolidy i linkozamidy? Dlaczego nie zastosowano metody rozcieńczeniowej oznaczania antybiotykooporności, która jest referencyjna? Szczep USA 300 nie jest szczepem referencyjnym do oznaczania lekowrażliwości.

Metody genetyczne są starannie opisane wraz ze szczegółowym przedstawieniem odczynników, warunków prowadzenia doświadczeń i zastosowanych metod. Przedstawiono także metody analizy statystycznej.

Rozdział Wyniki zawiera się na 40 stronach i szeroko przedstawia w pierwszej części dane na temat nosicielstwa i fenotypową analizę szczepów w oparciu o ich cechy.

Badania aktywności hemolitycznej i proteolitycznej, a także wzory oporności na antybiotyki nie pozwalały na różnicowanie szczepów z nosicielstwa i zmian atopowych. Grupa kontrolna była bardzo nieliczna, a więc nie można do niej się odnosić celem porównania.

Badane cechy biochemiczne w niewielkim stopniu różnicowały szczepy izolowane z przedsionka nosa i zakażeń zmian atopowych. Szkoda, że dopiero w tabeli zbiorczej porównano aktywności szczepów od jednego pacjenta, a izolowanych z różnych lokalizacji. Podobnie przedstawia się sprawa wzorów lekowrażliwości. Oczywiście to nie jest zarzut, ale czytałyby się te wyniki lepiej. Nie podano rozszerzenia skrótu „CFX” a nie jest on rutynowo stosowany.

Najciekawszą i najszerzej opisaną częścią Rozprawy jest typowanie molekularne. Typowanie *spa* pozwoliło na ujawnienie nowych, dotychczas nieopisywanych typów. Wykazano, że dominującym typem jest t091. Typ *spa* t015 obejmował zarówno szczepy MSSA, jak i MRSA, natomiast t223 grupowało jedynie szczepy MRSA. Ciekawy wynik typowania *spa* uzyskano dla szczepów grupy kontrolnej. Charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem i ciekawe, że w większości przypadków obejmowały typy *spa* niewykryte w grupie szczepów izolowanych od pacjentów z AZS. Szkoda, że do badania włączono tak małą ich liczbę.

Starannie przedstawiono analizę BURP, która pozwoliła na przypisanie typów *spa* do kompleksów klonalnych. Określono 9 kompleksów klonalnych.

Zastosowana analiza MLVF, często stosowana w typowaniu *S. aureus*, pozwoliła na skonstruowanie drzewa filogenetycznego. Otrzymano aż 32 klastery, z których dominujący obejmował 24% szczepów. Czy to są jakieś specjalne szczepy?, o szczególnej lokalizacji?, powodujące cięższe?, czy lżejsze zakażenia? Czy istnieją powiązania między pacjentami co do pokrewieństwa, miejsca zamieszkania, pracy?

Cennym elementem analizy wyników typowania molekularnego jest porównanie zgodności porównywanych metod i siły dyskryminacyjnej. Rozdział Wyniki zamyka tabela zbiorcza, starannie przygotowana i czytelna.

Dyskusja zawiera się na 12 stronach i niepotrzebnie powtarza dość szczegółowo i w wielu jej miejscach cele pracy, materiał i metody oraz wyniki. Prawdziwa dyskusja zawiera się na nieomal kilku stronach. Doktorantka podaje, że nosicielstwo w badanej grupie było wyższe, niż w dotychczas opisywanych badaniach. Nie odnosi się do typów nosicielstwa, co mogłoby wyjaśnić te różnice. Poza tym, w Rozprawie zajmowano się niewielką grupą pacjentów, więc nie jest właściwe porównywać wyniki własne z meta analizą, obejmującą kilka tysięcy pacjentów. Dyskusja dotycząca analizy aktywności proteolitycznej i hemolitycznej jest bardzo skąpa i Doktorantka niewystarczająco próbuje wyjaśnić przyczyny różnic w wynikach otrzymanych w badaniach własnych i w literaturze światowej. Zresztą zastosowane w Rozprawie metody oparte o arbitralną ocenę wyników nie ułatwiają tego zadania. Część dotycząca oporności także powtarza już wcześniej przedstawione wyniki. Nie odnosi się jednak i nie komentuje uzyskanych wyników, np. wysokiej oporności na chloramfenikol, czy erytromycynę, znacznie przewyższającą poziom w innych zakażeniach i innych grupach pacjentów. Nie wiem po co rozdziela się Wyniki dla szczepów uzyskanych od kobiet i mężczyzn przy tak małej próbie badawczej, zwłaszcza, że nie dyskutuje się obserwowanych różnic np. w oporności.

Typowanie molekularne ujawniło częstą identyczność szczepów izolowanych z różnych miejsc u jednego pacjenta. Jest to fakt znany od dawna. Najczęstsze typy *spa* odpowiadają tym, które były już opublikowane wcześniej jako najczęstsze (np. Rolo J et al., 2012; Grundman H. et al., 2014). Szkoda, że nie zostały one przytoczone w dyskusji.

Doktorantka słusznie stwierdza, że liczebność badanej grupy była niewielka, przez co dlatego wyciąganie wniosków jest trudne, a zwłaszcza ich uogólnianie. Trudno się więc zgodzić ze stwierdzeniem Doktorantki, że przedstawiona Rozprawa wnosi poważną wartość, pozwalając lepiej zrozumieć etiologię choroby. Etiologia dotyczy zakażenia, natomiast aby zrozumieć chorobę, trzeba lepiej poznać jej patogenezę.

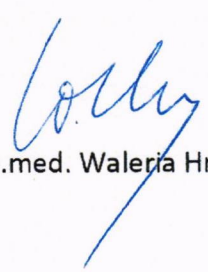
Rozprawa kończy się podsumowaniem i wnioskami. Niestety, tylko dwa z nich można uznać za wnioski, bowiem pozostałe są wynikami.

Piśmiennictwo zawiera się na 10. stronach. Należy je uporządkować i tak np. pozycja „Żabicka D...” znajduje się pod „D” a nie „Z”, nazwisko Brook napisano w całości wielkimi literami BROOK. Należy odnosić się do aktualnych zaleceń KORLD i podawać skąd się je pozyskało. Na stronie 97 2-ga od dołu pozycja piśmiennictwa jest niedokończona. O braku staranności świadczy także cytowanie publikacji Bogdali A.M i współautorów , w której to współautorzy podani są z imienia a nie nazwiska np. Anna BM, Grazyna A itp. Taki sposób cytowania powinien wzbudzić czujność. Do tej publikacji umieszczono Corrigendum , którego Doktorantka nie zauważyła.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa dotyczy ważnego problemu medycznego i mikrobiologicznego. Jednak w związku z licznymi nieścisłościami, błędami przedstawionymi powyżej proponuję jej uzupełnienie i przeredagowanie biorąc pod uwagę powyżej wymienione uwagi. Taki tryb dopuszcza Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 (§ 6 p.6).

Ze względu na fakt , że Rozprawa zawiera także szereg wartościowych wyników, zwłaszcza w części dotyczącej typowania molekularnego, rekomenduję Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego zwrócenie Rozprawy Mgr Anecie Budy celem dokonania zasugerowanych przeze mnie poprawek i ponownego przedstawienia.

Warszawa dn. 15.05.2017


Prof.dr hab. n.med. Waleria Hryniewicz

Warszawa dn. 5.06.2018 r.

Prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz

Recenzja nr 2 Rozprawy doktorskiej mgr Anety Buda na stopień dr n. biol. pt:

„Fenotypowe i genetyczne typowanie bakteryjnych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z nadkażeń ran oraz nosicielstwa pacjentów z atopowym zapaleniem skóry”

Nadesłana Rozprawa uwzględniła większość uwag zawartych w pierwotnej recenzji Rozprawy (Załącznik nr 1).

Wstęp został poszerzony i uporządkowany a także rozszerzone zostały podrozdziały dotyczące czynników wirulencji *S. aureus* i definicji oraz opisu atopowego zapalenia skóry. Niemniej nie zostały w pełni poprawione zapisy dotyczące antybiotykooporności i to stanowi najsłabszą część Wstępu. Trudno uwierzyć, że Doktorantka nie jest w stanie prawidłowo opisać mechanizmu oporności na antybiotyki beta-laktamowe wynikającego z wytwarzania nowego białka PBP, nieobecnego we wrażliwych komórkach gronkowca. Mechanizm nie wynika jak podaje Doktorantka z: „obecności powierzchniowych białek wiążących (i inaktywujących) penicyliny”, ale z pozyskania kasety genowej od koagulazo-ujemnego gronkowca grupy *Sciuri* niosącej gen *mecA*, który warunkuje wytwarzanie nowego białka PBP2a o niskim powinowactwie do beta-laktamów. Każda komórka gronkowca złocistego zawiera 4 białka PBP, które są niezbędne w procesie biosyntezy ściany komórkowej. To do nich mają powinowactwo (łączą się) antybiotyki beta-laktamowe i w ten sposób dochodzi do zatrzymania syntezy ściany komórkowej. Wprawdzie Doktorantka wspomina o oporności *S. aureus* na wankomycynę ale nie wyjaśnia różnic między hVISA, VISA i pozyskania genu VanA. Skrót ESKAPE jest niewłaściwie rozwinięty przez Doktorantkę i ostatnie „E” obejmuje *Enterobacter sp.*

Poszerzona także została część Wstępu, dotycząca typowania molekularnego która objęła praktycznie wszystkie istotne metody typowania molekularnego. To stanowi istotną zaletę Rozprawy.

W pozostałych częściach nie dostrzegłam istotnych zmian w związku z tym uwagi zawarte w pierwotnej recenzji zostają utrzymane.

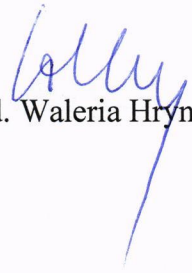
Wnioski zostały przedstawione tak jak to powinno być z wyjątkiem Wniosku nr 5, który w dalszym ciągu pozostał wynikiem.

Piśmiennictwo zostało uporządkowane.

W podsumowaniu pragnę podkreślić ważność i aktualność wybranego tematu i to zarówno z punktu widzenia medycyny jak i mikrobiologii. Cele badawcze zostały jasno sformułowane i zrealizowane. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą na temat nowoczesnych metod badawczych w epidemiologii. Niestety zabrakło konsultacji specjalisty lekarza dermatologa/mikrobiologa przez co doszło do wielu nieściśłych a nawet niefortunnych sformułowań. Dyskusja pokazała dobrą znajomość literatury. Zabrakło mi większego krytycyzmu zarówno w stosunku do własnych wyników jak i tych z literatury światowej. Wnioski wskazują, że postawione w Rozprawie cele zostały zrealizowane. Najważniejsze niedociągnięcia pokazane w pierwotnej wersji Rozprawy zostały uzupełnione.

Rozprawa doktorska mgr mgr Anety Buda na stopień dr n. biol. pt.:

„Fenotypowe i genetyczne typowanie bakteryjnych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z nadkażeń ran oraz nosicielstwa pacjentów z atopowym zapaleniem skóry” spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i dlatego wnoszę, do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Anety Buda do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz