GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII LEKARSKIEJ
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

Gdańsk, 8 maja 2017 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Anety Budy pt.: „Fenotypowe i genetyczne typowanie bakteryjnych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z zakażeń ran oraz nosicielstwa pacjentów z atopowym zapaleniem skóry" .

Dynamiczna ewolucja gatunku *Staphylococcus aureus (S. aureus)* w kierunku rozwoju wysoce opornych na antybiotyki i wirulentnych szczepów oraz wynikające z tego problemy terapeutyczne i epidemiologiczne inspirują badaczy do ciągłego zgłębiania problematyki zakażeń gronkowcowych.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr Aneta Buda analizowała fenotypowe właściwości szczepów *S. aureus* pochodzących od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (AZS) oraz określała profile genetyczne dokonując, w oparciu o nie, analizy epidemiologicznej.

AZS jest przewlekłą, zapalną i nawrotową chorobą, do rozwoju której dochodzi na skutek współdziałania czynników genetycznych, uszkodzenia bariery naskórka, zaburzeń immunologicznych oraz działania czynników środowiskowych, w tym bakterii. Gatunek *S. aureus* zajmuje tu szczególne miejsce, ze względu na najczęstsze występowanie w obrębie zmian skórnych (75-100%) oraz w okolicach skóry niezmienionej (30-50%). Bakteria stymuluje reakcje zapalne zarówno poprzez bezpośrednie działanie prozapalne, jak również na skutek oddziaływania wytwarzanych enzymów czy toksyn. Nosicielstwo *S. aureus* w przedsionku nosa jest zwykle pierwszym etapem, często poprzedzającym rozwój infekcji.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty należy stwierdzić, że temat recenzowanej rozprawy doktorskiej jest ciekawy i wpisuje się w tematykę aktualnego nurtu badań nad zakażeniami gronkowcowymi.

Oceniana praca ma układ typowy dla rozprawy doktorskiej, z klasycznym podziałem na rozdziały. Poza wprowadzeniem (wstępem), rozdziałami opisującymi materiały i metody, wyniki przeprowadzonych badań oraz ich dyskusję, zawiera podsumowanie wyników i wnioski przedstawiające w punktach najistotniejsze według oceny Doktorantki osiągnięcia oraz bibliografię (128 alfabetycznie uporządkowanych pozycji). Rozprawę uzupełniają: wykaz skrótów, streszczenia (w języku polskim i angielskim) oraz wykaz tabel i rycin. Praca liczy sto osiem stron i została wzbogacona piętnastoma tabelami oraz osiemnastoma rycinami.

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII LEKARSKIEJ
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

Wstęp

We wstępie (str. 1-13) Doktorantka przedstawiła ogólne informacje dotyczące charakterystyki bakterii z gatunku *S. aureus*, kładąc szczególny nacisk na czynniki wirulencji i lekooporność, by następnie wprowadzić czytelnika w trudne i ciekawe zagadnienia AZS oraz udziału *S. aureus* w zakażeniach pacjentów z atopowym zapaleniem skóry.

Wstęp zawiera również systematyczny przegląd metod stosowanych w diagnostyce epidemiologicznej do różnicowania szczepów w obrębie gatunku *S. aureus*, dzieląc je na metody fenotypowe, służące do wstępnego różnicowania szczepów, oraz metody genetyczne, o wyższej zdolności różnicującej szczepy w obrębie gatunku.

We wstępie zostały wyodrębnione podrozdziały, które porządkują treści w nim zawarte. Ta część pracy jest krótka, napisana w sposób zwarty, a Doktorantka przedstawiła informacje ogólne, mało wnikliwie analizując dotychczasową wiedzę.

Zdaniem recenzenta, istotnym niedociągnięciem w tym miejscu jest brak dostatecznego, popartego gruntownym przeglądem piśmiennictwa, wyjaśnienia zasadności podjętej tematyki badawczej. Należałoby wyjaśnić, w oparciu o dane literaturowe, co zostało zbadane, a czego jeszcze nie dokonano w realizowanym temacie badawczym i wyjaśnić w związku z tym, dlaczego Doktorantka podjęła ten temat?

Cele pracy

W następnej części Doktorantka przedstawiła cele pracy. Są to cele ambitne, ale zbyt liczne, nie wszystkie przedstawione precyzyjnie i nie są uporządkowane w logiczny ciąg. Punkty podane jako *„[...]...porównanie bakterii wyizolowanych z nosicielstwa ...[...]”* oraz *„[...]...porównanie profili fenotypowych i genetycznych....[...]”* nie są określeniem celu badań a jedynie mogą być sposobem realizacji celu, który można podać jako: Określenie, czy nadkażenia szczepami *S. aureus* u osób z AZS mają charakter endogenny czy egzogenny? Zdaniem recenzenta punkty określone przez Doktorantkę jako cele, należałoby w miarę możliwości przedstawić w formie pytań i rozważyć zredukowanie ich liczby (poprzez połączenie kilku w jeden cel).

Materiały

W rozdziale „Materiały” (str. 15-23) Doktorantka opisuje szczegółowo pochodzenie szczepów, charakterystykę pacjentów pod względem płci, wieku oraz miejsca izolacji bakterii. Rozdział zawiera również bardzo skrupulatnie wykonany spis podłoży hodowlanych i odczynników, przeznaczonych głównie do badań genetycznych oraz spis aparatury wykorzystywanej podczas realizacji tematu. Na docenienie zasługuje fakt użycia do doświadczeń bogatego materiału badawczego. Była to kolekcja 157 izolatów *S. aureus*

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII LEKARSKIEJ
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

uzyskanych z materiałów klinicznych pobranych w kilku zakładach i klinikach Uniwersytetu Jagiellońskiego, (a kilka także ze szpitala w Szczecinie); łącznie od 49 pacjentów (od dalszych 9 wyosobniono inne drobnoustroje). Biorąc pod uwagę zebrany materiał badawczy recenzent stwierdza, że jest to bardzo wartościowa kolekcja, która wymagała dużego i długotrwałego nakładu pracy oraz jest podstawą do uzyskania interesujących i wiarygodnych wyników.

Wątpliwości recenzenta budzi fakt włączenia do badań porównawczych, stosunkowo małej pod względem liczebności, grupy kontrolnej. W przedstawionej do oceny pracy grupa kontrolna liczyła jedynie 10 szczepów *S. aureus*, izolowanych od zdrowych osób z przedsionka nosa, bez stwierdzonego AZS. Do porównań należałoby użyć populacji szczepów zbliżonej liczebnością do grupy badanej. Wydaje się, że uzyskanie izolatów *S. aureus* od zdrowych nosicieli nie jest trudnym zadaniem.

Metody

W rozdziale „Metody" (str. 24-35) Doktorantka opisała szczegółowo stosowane przez siebie metody badawcze: klasyczne (fenotypowe) i nowoczesne metody typowania szczepów, oparte na analizie DNA (typowanie *spa*, MLVF), co w znacznym stopniu zwiększyło wartość uzyskanych wyników.

Istotnym przeoczeniem w tym miejscu jest brak cytowań literatury, z której korzystała Doktorantka. Nie można więc wnioskować, czy użyte przez Doktorantkę metody są jej modyfikacją czy też były opisane wcześniej w publikacjach? Powyższa uwaga dotyczy głównie metod fenotypowych (oznaczanie wrażliwości szczepów na antybiotyki, aktywności proteolitycznej, aktywności hemolitycznej). W opisie tych metod brakuje również precyzyjnie określonych zasad odczytu testów. Czytelnik nie wie jakie wartości Doktorantka brała pod uwagę określając hemolizę szczepu na „+", a jakie na „+++"? W jaki sposób oceniała intensywność proteolizy i jakie były zasady klasyfikacji szczepów do grupy proteolitycznej np. „+++"?

Brakuje wyjaśnienia i określenia cech używanych przez Doktorantkę szczepów referencyjnych: *S. aureus* ATCC25923 oraz *S. aureus* USA300, przeznaczonych do kontroli testów lekooporności, jako szczepów kontrolnych we wszystkich badaniach fenotypowych oraz genetycznych?

Pewien niedosyt u czytelnika wywołuje brak informacji dotyczących postępowania z badanymi szczepami od momentu uzyskania materiału klinicznego i wzrostu kolonii na podłożach bakteriologicznych, do czasu wykorzystania szczepów do badań. Czy bakterie izolowano i identyfikowano w laboratoriach diagnostycznych a następnie jako gatunek

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII LEKARSKIEJ
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

S.aureus przesyłano do badań w ramach pracy doktorskiej? Jak identyfikowano szczepy do gatunku *S. aureus*? Czy określano je wyłącznie za pomocą wzrostu na podłożu chromogennym (podłoże ID selekt), które przeznaczone jest do wstępnej identyfikacji bakterii. Przynależność do gatunku powinna być potwierdzona rutynowo stosowanymi w tym celu testami (np. test na clumping factor, koagulazę, Api ID32Staph, Pasteurex itp.). Wyjaśnienie dotyczące sposobu postępowania ze szczepem powinno znaleźć się w pracy.

Docenić należy fakt stosowania w pracy zaawansowanych metod biologii molekularnej, które wymagały od Doktorantki bardzo dobrego opanowania warsztatu badań molekularnych używanych w projektach gronkowcowych na świecie. Zastosowane metody molekularne – genetyczne, zostały opisane precyzyjnie oraz właściwie dobrane do realizacji założonych celów badawczych. Pozytywną inwencją Doktorantki jest także wykorzystanie programu komputerowego Gene Compare II do oceny podobieństw między badanymi szczepami na podstawie uzyskanych profili genetycznych metodą MLVF (opartą na zmienności liczby tandemowych powtórzeń), a także do grupowania szczepów w zbiory i podzbiory w oparciu o ich genetyczne podobieństwa. Również analiza genów *spa* i grupowanie do kompleksów klonalnych spa-CC z użyciem wymagającego programu Ridom StaphType najnowszej wersji oraz serwera Ridom SpaServer stanowi silną stronę projektu.

Wyniki

Obszerną część pracy zajmuje rozdział „Wyniki", poświęcony przedstawieniu uzyskanych rezultatów badań (str. 36-75). Doktorantka przedstawia na wstępie, za pomocą wykresów, wyniki badań fenotypowych (właściwości proteolityczne, hemolityczne). W opinii recenzenta, zastosowane wykresy nie ułatwiają, a czasem wręcz utrudniają odczyt i interpretację wyników, gdyż nie oddają charakteru zależności między porównywanymi grupami. Doktorantka przedstawia w nich wartości bezwzględne, co przy różnej liczebności porównywanych grup jest postępowaniem niewłaściwym. Należałoby użyć procentowego, skumulowanego wykresu kolumnowego w miejscu rycin 4 - 9, umieszczając na osi odciętych grupy porównywanych szczepów (np. kobiety, mężczyźni).

Podrozdział dotyczący profili lekooporności i lekowrażliwości analizowanych szczepów został zaplanowany i zrealizowany ambitnie. Wybranych antybiotyki reprezentują kilka grup chemicznych a ich liczba jest niemała. Jednak recenzent zauważa, że Doktorantka w pewnych miejscach wykazała się niedostateczną wiedzą z zakresu lekooporności bakterii, gdyż niektóre z wyników badań w tym zakresie interpretuje niepoprawnie. Dla przykładu, brak odpowiedniej strefy zahamowania wzrostu przy krążku z cefoksytyną świadczy o metycylinooporności szczepu (MRSA) a nie, jak to zostało przedstawione w pracy,

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII LEKARSKIEJ
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

oporności na cefalosporyny II generacji. Dodatkowo, szczep referencyjny ATCC 25923 używany w badaniu jako kontrola testów lekooporności, został błędnie oznaczony przez Doktorantkę jako gronkowiec MSSA, oporny na penicyliny, podczas gdy jest to szczep nie tylko wrażliwy na metycylinę (MSSA, nie posiada białka PBP2a), ale również na penicylinę (brak wytwarzania β-laktamaz). Pozostałe wyniki oznaczania oporności na antybiotyki w poszczególnych grupach szczepów *S. aureus* (ze zmian skórnych i z przedsionka nosa, oraz od kobiet i mężczyzn) zostały przedstawione na niewłaściwych rodzajach wykresów, podobnie jak miało to miejsce wcześniej (rycina 10, rycina 11). One także nie pozwalają czytelnikowi odpowiednio zinterpretować uzyskanych wyników. Natomiast starannie zostały zaprezentowane przez Doktorantkę wyniki badań molekularnych (czytelne tabele i przejrzyste ryciny), na podstawie których można odczytać, czy i w jakim stopniu występują różnice w profilach genetycznych porównywanych grup szczepów. Także przedstawiony dendrogram ukazujący grupowanie szczepów na podstawie podobieństwa DNA analizowanego metodą MLVF jest czytelnym i wartościowym zobrazowaniem analiz genetycznych. Analiza typów genu *spa* pozwoliła Doktorantce uzyskać algorytmy typu BURP (based upon repeat pattern) i określić kompleksy klonalne (jak i singletony) co zostało wyczerpująco opisane i przedstawione na rycinach 14, 15 i 16.

Dyskusja

W rozdziale „Dyskusja" Doktorantka powinna skomentować uzyskane wyniki w aspekcie stawianych hipotez oraz w kontekście wcześniej prowadzonych badań. Powinna wykazać, czy uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami innych autorów, czy też wnoszą nowe treści i mają potencjalne znaczenie praktyczne.

Dyskusja została przeprowadzona przez Doktorantkę na trzynastu stronach (str. 76-88) i stanowi przegląd doniesień najnowszego piśmiennictwa dotyczącego gronkowców złocistych izolowanych od pacjentów z AZS w odniesieniu do wyników własnych badań. Na wstępie omówione zostały wyniki badań fenotypowych, w tym zdolności proteolityczne, hemolityczne oraz oporność na antybiotyki badanych szczepów, a następnie dyskusja dotyczyła aspektów epidemiologicznych i możliwości przeniesienia szczepów gronkowców z przedsionka nosa na rany atopowe pacjentów z AZS. W tym miejscu Doktorantka szeroko omawia profile genetyczne szczepów uzyskane przy użyciu kilku metod genetycznych.

Dyskusja napisana jest miejscami w sposób bardzo oszczędny, bez zgłębiania tematyki badań, co może świadczyć o dobrej, ale nie najlepszej znajomości piśmiennictwa dotyczącego problematyki poruszanej w pracy. W dyskusji nie udało się w niektórych

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII LEKARSKIEJ
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

partiach tekstu uniknąć powielenia wyników (np. str. 82 *„[...].. W pierwszym porównaniu....14 ran z nosa)...[...]"*). Zdaniem recenzenta dyskusję należałoby pogłębić.

Wnioski

Wnioski (str. 89-90) powinny być logiczną konsekwencją uzyskanych wyników. Wniosek powinien być zwięzły i powinien zawierać praktyczną przesłankę zawartą w wyniku.

W przedstawionej do recenzji pracy Doktorantka sformułowała liczne i dość rozbudowane wnioski. Autorka napisała w jednym z nich: *„[...]..Badane szczepy S. aureus wyizolowane od pacjentów z ostrym AZS charakteryzowały się niską antybiotykoopornością. Dominowała oporność na penicyliny. Nie stwierdzono szczepów opornych na wszystkie badane antybiotyki. Ponad 97% szczepów było szczepami wrażliwymi na antybiotyki β-laktamowe (MSSA)...[...]"*. Czy określenie szczepu jako MSSA daje podstawę do zakwalifikowania go do grupy szczepów wrażliwych na antybiotyki β-laktamowe? Czy podane stwierdzenia: o dominacji oporności na penicyliny oraz o ponad 97% wrażliwości na antybiotyki β-laktamowe w populacji badanych szczepów nie są sprzeczne?

Wniosek trzeci: *„[...]..Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy poziomem aktywności proteolitycznej, typem i poziomem aktywności hemolitycznej a pojawiającymi się profilami oporności na antybiotyki...[...]"* wymaga sprecyzowania pod względem grup szczepów. Recenzent nie znalazł w pracy przesłanek, które wyjaśniałyby cel takiej analizy i uważa, że powyższe dane nie są istotne w prowadzonych badaniach.

W opinii recenzenta, na podstawie zgromadzonego obszernego oraz wartościowego materiału badawczego i przeprowadzonych ciekawych badań, można było wysnuć zarówno z klinicznego jak i epidemiologicznego punktu widzenia wnioski cenniejsze.

Bibliografia

Bibliografia (str. 95-105) obejmuje 128 alfabetycznie uporządkowanych pozycji zagranicznych oraz polskojęzycznych, z uwzględnieniem najnowszych pozycji literaturowych. Zawiera też publikacje pracowników Zakładu Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki, Biotechnologii UJ. Została niestety wykonana w kilku punktach niestarannie. Niektóre z pozycji Doktorantka umieściła z niepełnymi lub błędnymi danymi (*Goering, Richard V. (2010) The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, pr....: Reviews in Medical Microbiology*) lub bez zachowania kolejności alfabetycznej (*Żabicka D., and Hryniewicz W. (2009) wśród nazwisk zaczynających się na literę „D"*). Odosobnione błędy edytorskie występują również w innych częściach pracy, co mogło być wynikiem pośpiechu w jej pisaniu.

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII LEKARSKIEJ
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

W podsumowaniu recenzent stwierdza, że praca doktorska przedstawiona do recenzji jest próbą scharakteryzowania szczepów *S. aureus* kolonizujących i nadkażających pacjentów z AZS oraz ich powiązań epidemiologicznych i porusza ważny temat ze względu na ewentualną przydatność wyników badań w postępowaniu z pacjentem. Wartości pracy doktorskiej dowodzą: zbudowana przez Doktorantkę kolekcja szczepów bakteryjnych, oportunistycznych patogenów gatunku *Staphylococcus aureus*, ambitny i niełatwy temat interdyscyplinarny dotyczący nadkażeń u alergicznych pacjentów cierpiących na atopowe zapalenie skóry, zjawiska zakażeń endogennych i egzogennych, zbadanie lekooporności drobnoustrojów oraz analizy fenotypowe i molekularne z opracowaniem stopni genetycznego podobieństwa i grupowania szczepów w podzbiory. Na uwagę zasługują liczba badanych drobnoustrojów jak i liczba pacjentów uczestniczących w projekcie. Tak więc Doktorantka podjęła się trudnego zadania. Dysponując dobrym warsztatem badawczym, stosując standardowe metody fenotypowe i zaawansowane metody molekularne uzyskała oryginalne wyniki o dużej wartości naukowej i przydatności w przyszłym postępowaniu diagnostycznym i terapeutycznym. Krytyczne zastrzeżenia recenzenta dotyczą szczególnie formy przedstawienia części wyników badań cech fenotypowych, zwłaszcza lekooporności. W obliczu wymienionych powyżej błędów i uchybień recenzent oczekuje od Doktorantki stosownych wyjaśnień w czasie obrony oraz stwierdza, że muszą być one wyeliminowane na etapie przygotowania publikacji.

Biorąc pod uwagę uzyskane oryginalne wyniki i odwagę badawczą, rozważając zarówno zalety przedstawionej do recenzji pracy oraz wymienione wyżej uchybienia stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana zgodnie z przyjętym uniwersyteckim kanonem, stanowi nowość naukową i spełnia wymagania formalne Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2003 nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biotechnologii i Biofizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Anety Budy do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Gdańsk, 8 maja 2017 r.

KIEROWNIK
Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
dr hab. n. med. Lidia Piechowicz

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

Gdańsk, 8 czerwca 2018 r.

RECENZJA nr 2

Rozprawy doktorskiej mgr Anety Budy pt. "Fenotypowe i genetyczne typowanie bakteryjnych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z zakażeń ran oraz nosicielstwa pacjentów z atopowym zapaleniem skóry".

Podstawą ponownej recenzji jest poprawiona wersja rozprawy doktorskiej. Niniejsza recenzja zawężona jest do analizy, czy praca została poprawiona zgodnie z sugestiami recenzenta i czy spełnia warunki i wymagania stawiane dla pracy naukowej.

Przedstawiony do recenzji egzemplarz pracy doktorskiej jest obszerniejszy, bardziej przejrzysty i uporządkowany. Doktorantka poszerzyła niektóre podrozdziały o brakujące informacje, pojawiły się też dodatkowe rozdziały. Niedociągnięcia merytoryczne oraz błędy edytorskie zostały znacznie zredukowane. Po przejrzeniu pracy stwierdzam, że większość uwag zawartych w pierwszej recenzji zostało przez Doktorantkę uwzględnionych.

Wprowadzenie

Występujące w poprzedniej wersji rozprawy informacje ogólne, nie zawierające szczegółowej analizy dotychczasowej wiedzy z zakresu tematyki badawczej, zostały wzbogacone w treści merytoryczne, dzięki czemu w sposób bardziej wnikliwy Doktorantka przedstawiła zagadnienia dotyczące w szczególności: charakterystyki bakterii z rodzaju *Staphylococcus,* bakterii należących do gatunku *Staphylococcus aureus* oraz lekooporności szczepów *S. aureus*. Podrozdział dotyczący metod genetycznych został rozbudowany o opis jednej z metod (MLST). Korzystną modyfikacją było także dodanie krótkiego podrozdziału „Podsumowanie", który w sposób zwarty zamyka część wprowadzającą pracy oraz wskazuje na znaczenie i zasadność podjętej problematyki badawczej. Ogółem, stwierdzam, że rozdział „Wprowadzenie" zyskał na wartości – podrozdziały w nim zawarte są przejrzyste, w sposób logiczny wprowadzają czytelnika w ciekawą tematykę pracy oraz uzasadniają jej wybór. Mimo ważności tematu Doktorantka nie uniknęła błędów merytorycznych w tej części pracy. Dotyczyły one głównie niedostatecznej znajomości zagadnień lekooporności. Warto zapamiętać, że oporność na antybiotyki β-laktamowe u gronkowców jest związana z dwoma

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

mechanizmami: wytwarzaniem β-laktamaz, skutkującym opornością na penicyliny naturalne, amino- i ureidopenicyliny oraz z wytwarzaniem nowego białka PBP2a, zwanego także PBP2' o niskim powinowactwie do antybiotyków β-laktamowych. Jego obecność w komórce gronkowca skutkuje opornością na wszystkie antybiotyki β-laktamowe obecnie stosowane w leczeniu i określana jest mianem oporności na meticylinę (wyjątek stanowią wprowadzone do leczenia ceftarolina oraz ceftobiprol). Białko PBP2a lub PBP2', kodowane jest przez gen *mecA* zlokalizowany w chromosomie i stanowiący część regionu noszącego nazwę *SCCmec* (gronkowcowa kaseta chromosomalna *mec*, ang. staphylococcocal cassette chromosome mec). W odróżnieniu od pozostałych białek PBP, białko PBP2a nie ulega hamowaniu przez antybiotyki β-laktamowe z powodu obniżonego powinowactwa do tych antybiotyków. Białko PBP2a zachowuje swoją funkcję enzymatyczną i uczestniczy w syntezie ściany komórkowej w obecności antybiotyku β-laktamowego.

Błędnie została podana przez Doktorantkę nazwa bakterii tworząca skrót ESKAPE, określający drobnoustroje, które są lekooporne i zdolne do „ucieczki" przed działaniem dostępnych antybiotyków. Skrót został utworzony od pierwszych liter nazw gatunkowych: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa i Enterobacter spp.* (a nie *Enterobacteriaceae* jak zostało podane w pracy).

Cele pracy

Cele pracy zostały skrócone i poprawione zgodnie z sugestiami recenzenta. Mimo subtelnej korekty wydają się realizowalne i adekwatne do przyjętej metodologii badawczej.

Materiały, Metody

Rozdziały dotyczące „Materiałów" i „Metod" zostały częściowo zmienione. Uzupełniono dane dotyczące postępowania z badanymi szczepami od momentu ich izolacji z materiału klinicznego. Odnośniki do literatury zostały w większości naniesione, wraz ze skalą odczytu testów fenotypowych, co w znacznym stopniu uporządkowało tą część pracy. Część genetyczna została napisana bardzo skrupulatnie i wyczerpująco, co zostało zauważone przez recenzenta już w pierwszej recenzji. Pozostało jeszcze kilka niewyjaśnionych kwestii.

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

- Wytłumaczenia wymaga zastosowanie testu chromogennego do identyfikacji wcześniej zidentyfikowanych metodami przyjętymi w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej (API ID 32 Staph) szczepów *S. aureus*?
- Dlaczego Doktorantka nie umieściła charakterystyki szczepów: *S. aureus* ATCC 25923, szczepu USA 300 oraz informacji, w jakich testach i dlaczego zostały użyte ?

Wyniki

Rozdział przedstawiający „Wyniki" został zmieniony poprzez wymianę nieczytelnych wykresów na procentowe, skumulowane wykresy kolumnowe, co znacznie ułatwiło odczytanie i analizę uzyskanych rezultatów badań. Dużą zaletą jest obszerne i wnikliwe przedstawienie wyników badań genetycznych, o czym informuje wcześniejsza recenzja pracy.

Dyskusja

Rozdział „Dyskusja", mimo niewielkich zmian, stanowi poprawny element rozważań naukowych. Czytając uważnie ten fragment rozprawy, można zauważyć dojrzalszą, bardziej wnikliwą i popartą odniesieniami do oryginalnych prac naukowych analizę uzyskanych przez Doktorantkę wyników.

Wnioski

„Wnioski" zostały przeredagowane, zredukowano ich liczbę (z dziewięciu do sześciu), są one zgodne z faktami i przeprowadzonym procesem badawczym.

Bibliografia

„Bibliografia" została znacznie poszerzona (128 do 188 pozycji), zawiera w większości pozycje z najnowszej literatury przedmiotu. Niektóre pomyłki edytorskie zostały poprawione. Zmianą ze stratą dla pracy jest brak alfabetycznego spisu literatury, który był umieszczony w pierwszym egzemplarzu rozprawy.

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA MIKROBIOLOGII
ul. Dębowa 25
80-204 Gdańsk
tel. 58 349 18 31, tel/fax 58 349 18 29
e-mail: mikrob@gumed.edu.pl

W podsumowaniu poprawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że silną stroną pracy jest wybrana tematyka badawcza, przejrzyście sprecyzowane cele pracy oraz stosowane w czasie realizacji badań, nowoczesne metody genetyczne. Naniesione przez Doktorantkę zmiany, choć nie w całości przeprowadzone zgodnie z sugestiami recenzenta, wpłynęły korzystnie na pracę: uporządkowały treści w logiczny ciąg badawczy, podwyższyły walory poznawcze i zwiększyły jej przejrzystość. Dlatego uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została sporządzona zgodnie z przyjętym uniwersyteckim kanonem i spełnia wymagania formalne Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2003 nr 65, poz.595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biotechnologii i Biofizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Anety Budy do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Gdańsk, 8 czerwca 2018 r.

KIEROWNIK
Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
dr hab. n. med. Lidia Piechowicz
prof. nadzw. GUMed