



Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich Wrocław
ul. Borowska 211a, 50 - 566 Wrocław
Kierownik: dr hab. nauk med. Marzenna Bartoszewicz
tel/fax (71) 784 05 10

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
FARMACEUTYCZNEJ I PARAZYTOLOGII
ul. Borowska 211a, 50-566 Wrocław
tel./faks: 71 784 05 10
(1)

RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia
medyczna mgr Sylwii Kożusko pt :

„Charakterystyka szczepów *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*
opornych na wankomycynę”

Promotor:

Prof. dr hab. Eugenia Gospodarek

Szanowny Panie Dziekanie , Wysoka Rado, Szanowni Państwo
dziękuje za powierzenie mi zaszczytu ale też i odpowiedzialności
zrecenzowania rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Kożusko

„Charakterystyka szczepów *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*
opornych na wankomycynę”.

Recenzent oceniając pracę musi odpowiedzieć na pytanie na ile oceniana
praca wpisuje się we współczesną naukę, czy wnosi nowe elementy i
poszerza wiedzę na badany temat.

Postęp medycyny sprawił, że coraz częściej borykamy się z problemem
zakażeń wywołanych przez drobnoustroje do niedawna uznawane za
niechorobotwórcze.

Dotyczy to przede wszystkim bakterii wchodzących w skład bioty fizjologicznej.

Szczególnie gatunki *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* stanowią istotne patogeny różnych klinicznie zakażeń szpitalnych.

Niezwykle istotna jest prawidłowa ich identyfikacja do gatunku, ponieważ ma to wpływ na empiryczne leczenie zakażeń z udziałem tych bakterii.

Enterokoki uznawane jeszcze całkiem niedawno za bakterie niechorobotwórcze wykazują się obecnością naturalnych mechanizmów oporności na wiele grup antybiotyków. Oporność naturalna to oporność determinowana przez zaprogramowaną genetycznie strukturę bakterii. Może być ona związana z brakiem receptora dla antybiotyku lub ze zbyt niskiego powinowactwa do stosowanego leku lub też może posiadać nieprzepuszczalną ścianę komórkową dla antybiotyku czy też wytwarzać enzymy inaktywujące lub modyfikujące antybiotyk. Taką oporność enterokoki prezentują np. w stosunku do cefalosporyn szeroko stosowanej grupy antybiotyków beta laktamowych. Naturalna oporność enterokoków istniała przed wprowadzeniem cefalosporyn do lecznictwa.

Równocześnie trudności terapeutyczne zakażeń wywołanych przez enterokoki sprawia nabyta oporność na antybiotyki glikopeptydowe i wysokie stężenia aminoglikozydów.

Ważnym elementem w biologii enterokoków i poszukiwaniu nowych rozwiązań terapeutycznych, jest dokładne poznanie i zrozumienie ich mechanizmów oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe.

Tego właśnie niezwykle ważnego problemu zarówno klinicznego, jak i mikrobiologicznego dotyczy przedstawiona mi do recenzji praca doktorska.

Jej przedmiotem jest szeroka charakterystyka szczepów *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* zebranych w okresie 5 lat, a pochodzących z materiałów diagnostycznych od hospitalizowanych pacjentów.

Szczegółowej analizie doktorantka poddała ocenę:

1. skuteczności identyfikacji gatunkowej enterokoków z użyciem konwencjonalnych metod hodowli i wyników reakcji biochemicznych z zastosowaniem systemu automatycznego
2. przydatności techniki multipleks PCR do identyfikacji genów specyficznych gatunkowo oraz genów oporności na wankomycynę
3. lekowrażliwości z uwzględnieniem wartości minimalnego stężenia hamującego wankomycyny, teikoplaniny, gentamicyny i streptomycyny dla szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* opornych na wankomycynę
4. częstości występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji takich jak substancji agregującej (*asa1*), żelatynazy (*gelE*), cytolizyny (*cylA*), białka powierzchniowego (*esp*) i hialuronidazy (*hyl*) wśród szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* opornych na wankomycynę.

Układ ocenianej rozprawy liczącej 112 stron jest typowy dla medycznych prac doświadczalnych. Wstęp liczący 27 stron podzielono na 4 podrozdziały i 13 podpodrozdziałów.

Następne części pracy zawierają: 1 stronicowy cel pracy, opisanie użytych materiałów i zastosowane metody (8 str.), wyniki (21 str.), dyskusję (14 str.), wnioski (1 str.), streszczenie w języku polskim i angielskim (6 str.), spis rycin, tabel, fotografii i obliczenia statystyczne umieszczone w 8 tabelach (4str).

Zgromadzone piśmiennictwo (25 str.), uwzględnia 246 pozycje. Całość opracowania uzupełnia 15 tabel, 13 rycin i 4 fotografie. Na początku rozprawy bezpośrednio przed spisem treści umieszczono wykaz stosowanych skrótów.

We wstępie Doktorantka szeroko charakteryzuje rodzaj *Enterococcus* i zakażenia jakie wywołują te bakterie. Opisuje również ważne czynniki warunkujące wirulencję i mechanizmy oporności na wybrane 2 ważne grupy terapeutyczne aminoglikozydy i glikopeptydy.

Rozdział ten jest wzbogacony o 3 tabele, w których w esencjonalny sposób przedstawia zawarte informacje. Niestety tabela II umieszczone na stronie 11 pomimo bardzo istotnych walorów poznawczych nie może być w pełni wykorzystana przez recenzenta z powodu małej czytelności.

Cel pracy podano w sposób zwięzły, w 4 punktach uzasadniając wybór do badania tych właśnie patogenów.

W podrozdziale materiał i metody jest wyodrębniony jedynie materiał o numerze podrozdziału 3.1 natomiast nie uwzględniono wyodrębnienia metod (poza metodami statystycznymi numer podrozdziału 3.9), co jednak nie wpływa negatywnie na czytelność całości. Doktorantka szczegółowo opisała użyte do badania 104 szczepy i ich pochodzenie (klinika i materiał diagnostyczny) oraz opisała w podrozdziale oznaczania lekowrażliwości użyte szczepy wzorcowe z kolekcji ATTC.

Do realizacji zamierzonych celów badań zastosowała dobrze dobrane metody z obszaru mikrobiologii klasycznej, jak i nowoczesnych technik biologii molekularnej takich jak izolacja bakteryjnego DNA, wykrywanie genów warunkujących oporność na wankomycynę oraz genów warunkujących wirulencję.

Wyniki przedstawione są przejrzysto na 11 rycinach, 8 tabelach i 4 zdjęciach. Doktorantka wyodrębniła różne metody identyfikacji porównując metody konwencjonalne i z użyciem systemu automatycznego. Następnie oceniła występowanie genów *van A* i *van B* i właściwości biochemiczne, a także porównała te właściwości w zależności od występowania genotypów oporności na glikopeptydy.

Ocenę lekowrażliwości Doktorantka przeprowadziła metodami jakościowymi, oraz określiła Minimalne Stężenie Hamujące dla glikopeptydów i aminoglikozydów a także oceniła występowanie 5 genów kodujących czynniki wirulencji enterokoków.

Bogata i wielowątkowa dyskusja świadczy o dociekliwości, znajomości podejmowanego tematu i dojrzałości naukowej.

Doktorantka porównuje otrzymane wyniki z wynikami różnych zespołów badawczych.

Analizując wyniki wielokierunkowych badań własnych Doktorantka sformułowała 7 wniosków, które są podsumowaniem osiągnięć Jej pracy i odpowiedzią na postawione cele.

Pani magister Sylwia Kożuszko wykazuje znajomość podjętej tematyki badawczej na co wskazuje dobrze dobrane piśmiennictwo. Spośród 246 pozycji piśmiennictwa - 35 pochodzi z lat 2010-2014, w tym 6 pozycji z 2013 i 2014 roku.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że praca podejmuje ważny i aktualny temat naukowy. Doktorantka w jego realizacji podjęła wielokierunkowe badania mikrobiologiczne, wykazując znajomość różnych metod badawczych. Zastosowała różnorodne metody fenotypowe i genetyczne wykazując tym samym, że dysponuje nowoczesnym warształem badawczym i dojrzałością rozwiązywania stawianych problemów a także łączenia teorii z praktyką.

Praca została przygotowana bardzo starannie, napisana jest poprawnym językiem naukowym, w przejrzysty sposób, co sprawia, że nawet trudne zagadnienia czyta się z łatwością i przyjemnością.

Z obowiązku recenzenta, oprócz wyżej wymienionych spostrzeżeń, muszę podać, że Doktorantka nie ustrzegła się kilku nieprawidłowości.

Zdarzają się literówki, podpis pod ryciną numer 8 (strona 51) powinien znajdować się bezpośrednio pod nią, a nie na następnej stronie, dość często zdania nie kończą się na jednej stronie np. strona 13, 14, 15, 17, 67, 68, 70 itd. co szczególnie przeszkadza przy podzieleniu nazw np. strona 35 i 43.

Pragnę jednak podkreślić, że mimo kilku uwag, praca doktorska mgr Sylwii Kożuszek stanowi, wartościowy i oryginalny dorobek naukowy. Ponadto, wnosi nowe spojrzenie na *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*. Struktura rozprawy czyli kolejność rozdziałów, zachowane proporcje między poszczególnymi rozdziałami, kompletność tez, obecność założeń metodologicznych pracy w tym metod, technik i narzędzi badawczych oceniam bardzo dobrze.

Stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska pt.: „Charakterystyka szczepów *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* opornych na wankomycynę” posiada zarówno wartości poznawcze, poszerzające wiedzę na tak ważny temat, jak i praktyczne i odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim przedstawionym w ustawie z 14 marca 2003 roku (O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dziennik Ustaw RP nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003 r.) .


Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie mgr Sylwii Kożuszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Z wyrazami szacunku,

Dr hab. nauk med. Marzenna Bartoszewicz

marzenna.bartoszewicz@umed.wroc.pl

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
FARMACEUTYCZNEJ I PARAZYTOLOGII
Wrocław

dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz