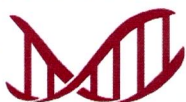


Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej **mgr Pauliny Marii Żarnowiec** „**Identyfikacja i różnicowanie szczepów *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz bakterii z wybranych środowisk za pomocą metod genetycznych i spektroskopowych**”.

Szybka, skuteczna identyfikacja bakterii, ich różnicowanie klonalne oraz identyfikacja lekooporności to najważniejsze wyzwania diagnostycznych laboratoriów mikrobiologicznych. Metody hodowli drobnoustrojów czy określania ich właściwości biochemicznych, oraz techniki mikroskopowe stosowane od lat w diagnostyce mikroorganizmów są obecnie intensywnie wspomagane poprzez metody molekularne oparte o analizy kwasów nukleinowych czy innych makromolekuł obecnych w komórkach bakterii. Ogromny rozkwit metod masowego sekwencjonowania kwasów nukleinowych i białek daje nam nieograniczone możliwości nie tylko identyfikacji ale również typowania drobnoustrojów. W praktyce laboratoryjnej, ważne jest dobranie odpowiedniej metody diagnostyczno-epidemiologicznej pozwalającej na precyzyjne, jednoznaczne, szybkie ale również stosunkowo tanie zidentyfikowanie czynnika etiologicznego danego zakażenia, czy identyfikację lokalnych i/lub globalnych zagrożeń epidemiologicznych. Sukcesywnie obniżane koszty masowego sekwencjonowania DNA powodują jego coraz większą dostępność, jednak ciągle są zbyt wysokie aby wprowadzić je do rutynowej diagnostyki bakterii. Metody, które pozwoliłyby na tanią, zautomatyzowaną, uniwersalną, szybką i niezawodną diagnostykę oraz typowanie drobnoustrojów stałyby się kolejnym przełomem w diagnozowaniu chorób infekcyjnych. Nadzieje na taki przełom dają metody spektroskopowe, w tym spektroskopia w podczerwieni dająca informację o kompletnym składzie biochemicznym złożonych próbek biologicznych.

Biorąc pod uwagę wciąż niewykorzystany potencjał jaki posiadają metody spektroskopowe w diagnostyce mikrobiologicznej, Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego zadania identyfikacji i różnicowania istotnych klinicznie bakterii gramoujemnych w oparciu o



technikę FT-IR. Wieloletnie doświadczenie w podjętej tematyce pracy zespołu prof. Wiesława Kacy, świetny warsztat naukowy oraz dostęp zarówno do szczepów bakteryjnych jak i zdefiniowanych preparatów lipopolisacharydów gwarantowały rzetelną weryfikację postawionej hipotezy badawczej.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny. Część doświadczalna jest poprzedzona wstępem literaturowym wprowadzającym czytelnika kolejno w techniki spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera, charakterystykę widm szczepów bakteryjnych, chemometryczne metody analizy widm, zastosowania spektroskopii do różnicowania szczepów bakteryjnych oraz metody molekularnej identyfikacji drobnoustrojów zastosowane w ocenianej pracy doktorskiej. Ze względu na postawione cele pracy, Doktorantka zawarła również w części wstępnej swojej dysertacji aktualne informacje o chorobotwórczości *P. mirabilis* i *P. aeruginosa* oraz o metodach różnicowania tych drobnoustrojów. Ta część pracy, oparta o aktualną literaturę naukową, jest napisana ładnym, przejrzystym językiem naukowym. **Prosiłbym Doktorantkę o kilka informacji uzupełniających wstęp pracy:** Czy podjęto próby skorelowania różnicowania drobnoustrojów metodami spektroskopii w podczerwieni z metodami sekwencjonowania genomowego DNA ? Jaka liczba mutacji typu „silent” w genomie bakterii wpłynęłaby na zmianę widm dla szczepów bakteryjnych ? Jakie są obecnie najważniejsze ograniczenia hamujące wprowadzenie metod FT-IR do rutynowej diagnostyki ? Jak Doktorantka oceniłaby przydatność metod LM-PCR oraz PCR MP w typowaniu bakterii z rodzaju *Proteus* i *Pseudomonas* ?

Cele pracy są jasno sformułowane i mają swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w prezentowanych wynikach. Ponadto Doktorantka formułuje hipotezę badawczą, weryfikowaną poprzez realizację częściowych celów pracy.

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorantka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Metody badań zostały dobrane prawidłowo dla realizacji postawionych celów pracy. Na podkreślenie zasługuje umiejętna analiza danych spektralnych z zastosowaniem metod chemometrycznych.

Otrzymane w czasie realizacji badań wyniki dowodzą skutecznej realizacji ambitnych celów pracy. Przedstawiona dokumentacja naukowa oraz przeprowadzona analiza statystyczna wyników dowodzi realizacji poszczególnych etapów pracy i świadczy o bardzo dobrym, metodycznym przygotowaniu autorki.

Przeprowadzone badania umożliwiły Doktorantce konstrukcje modelu matematycznego pozwalającego na różnicowanie widm IR szczepów *P. mirabilis*. Przygotowano bazę widm szczepów laboratoryjnych i klinicznych *P. mirabilis* oraz ich lipopolisacharydów, a także szczepów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjentów z mukowiscydozą oraz szczepów środowiskowych. Na bazie biblioteki obejmującej 3200 widm Doktorantka wykazała przydatność analiz widm IR, po zastosowaniu 4 metod chemometrycznych, do klasyfikacji serologicznej szczepów klinicznych *P. mirabilis*. Widma IR uzyskano również dla preparatów LPS obserwując różnice w kolekcji preparatów typu R i S. Podjęto także próbę różnicowania klonalnego szczepów *P. aeruginosa* za pomocą spektroskopii w podczerwieni i analizy chemometrycznej. Uzyskane wyniki Doktorantka zweryfikowała z typowaniem genetycznym tej samej kolekcji szczepów z zastosowaniem techniki RAPD oraz MLST obserwując ograniczoną zgodność różnicowania klonalnego metodami genetycznymi i spektroskopii podczerwieni. Wydaje mi się jednak, że porównanie wyników typowania genetycznego oraz FT-IR byłoby łatwiejsze gdyby zostały one zabrane w postaci wspólnej Tabeli i/lub ryciny.

Analiza zaprezentowanych przez Doktorantkę wyników nasuwa mi kilka pytań szczegółowych do tej części pracy: Czy dla przeprowadzonej analizy widm ATR FTIR szczepów laboratoryjnych *P. mirabilis* (str. 48) wyznaczono wartość odcięcia (cut off value). Prosiłbym Doktorantkę o przedyskutowanie ewentualnej zasadności wyznaczania takiej wartości w analizach ATR FTIR. Czy w przeprowadzanych analizach widm szczepów *P. mirabilis* nie byłoby korzystnie w charakterze kontroli negatywnej włączenie innych gatunków bakterii z rodzaju *Proteus*. Czy wyznaczona została siła różnicowania dla każdej z zastosowanych metod genetycznych i spektroskopowych w badaniach różnicowania klonalnego szczepów *P. aeruginosa*.

Dyskusja pracy została napisana w sposób bardzo dojrzały, a Doktorantka krytycznie odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych.

Wnioski wyciągnięte przez autorkę (Podsumowanie) są w pełni uprawnione i mają całkowite pokrycie w przedstawionych danych eksperymentalnych.

Podsumowanie:



Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Pauliny Marii Żarnowiec uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe. **Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Marii Żarnowiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek