



Warszawa, 4 sierpnia 2023 r.

dr hab. Michał Czopowicz, prof. SGGW
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. wet. Marty Miszczak

pod tytułem

„Charakterystyka epidemiologiczna gronkowców izolowanych od ludzi
oraz psów i kotów, ze szczególnym uwzględnieniem *Staphylococcus aureus*
i *Staphylococcus pseudintermedius*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska powstała w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod opieką promotorów prof. dr. hab. Krzysztofa Rypuły z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu i prof. dr. hab. Leszka Szenborna z Katedry i Kliniki Pediatrii i Chorób Infekcyjnych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Podstawę formalną do wykonania niniejszej recenzji stanowi Uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 27 czerwca 2023 roku.

Rozprawa doktorska lek. wet. Marty Miszczak poświęcona jest ocenie częstości występowania koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych szczepów gronkowców u ludzi oraz dwóch najpopularniejszych w Polsce gatunków zwierząt towarzyszących czyli psów i kotów, dokładnej charakterystyce profilu fenotypowego i genotypowego

oporności dwóch gatunków gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i *S. pseudintermedius*) na powszechnie stosowane chemioterapeutyki przeciwbakteryjne oraz identyfikacji czynników ryzyka występowania zakażeń gronkowcowych u psów, kotów i ludzi. Tematyka pracy jest niezwykle aktualna. Gronkowcowe należą nie tylko do najbardziej rozpowszechnionych, ale również najgroźniejszych drobnoustrojów chorobotwórczych w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej. Szeroki zakres wywoływanych przez nie chorób oraz ogromny potencjał do rozwijania oporności na powszechnie stosowane leki przeciwbakteryjne czynią z gronkowców niezwykle groźnych przeciwników dla lekarzy medycyny i weterynarii. Dlatego każde badania naukowe poszerzające naszą wiedzę na temat tych drobnoustrojów zasługują na uznanie. Szczególnie, jeżeli są to badania tak rzetelne zaprojektowane, przeprowadzone i opisane, jak to ma miejsce w przypadku badań będących przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w której wykonano omawiane badania, od wielu lat zajmuje się problematyką zakażeń gronkowcami u zwierząt towarzyszących, co znajduje swoje odzwierciedlenie w licznych publikacjach naukowych z tego zakresu. Dzięki współpracy z Klinikami Weterynaryjnymi Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu możliwe było pozyskanie dużej ilości zróżnicowanego materiału do badań laboratoryjnych od psów i kotów, jak również danych epidemiologicznych do dalszych analiz. Ponadto, współpraca z Katedrą i Kliniką Pediatrii i Chorób Infekcyjnych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu umożliwiła rozszerzenie zakresu prowadzonych badań na ludzi, często będących właścicielami badanych zwierząt. Otworzyło to pole do niezwykle ciekawych analiz epidemiologicznych łączących żyjących w jednym środowisku ludzi i zwierzęta. Wpisuje się to idealnie w bardzo obecnie popularną koncepcję WHO podkreślającą istnienie ścisłej i nierozzerwalnej sieci wzajemnych zależności między zdrowiem ludzi, zwierząt i środowiskiem, w którym żyją („One health”).

Omawiana rozprawa doktorska ma tradycyjną formę manuskryptu z dość nietypowym jednak dla tego typu prac układem rozdziałów – cele badań są elementem rozdziału „Problematyka i metoda badań własnych”, a dyskusja wyników i wnioski

wchodzą w skład rozdziału „Wyniki badań”. Osobiście jestem zwolennikiem umieszczania celów badań, dyskusji oraz wniosków w oddzielnych rozdziałach, co moim zdaniem zwiększa przejrzystość opisu.

We wprowadzeniu Doktorantka przedstawiła znaczenie gronkowców w medycynie, w ciekawy sposób uwzględniając aspekty historyczne, a następnie dokładnie omówiła biologię, występowanie, chorobotwórczość, czynniki zjadliwości i lekooporność dwóch gatunków gronkowców koagulazo-dodatnich będących głównym obiektem jej zainteresowania – gronkowca złocistego i *S. pseudintermedius*. Wprowadzenie w sposób przejrzysty i wyczerpujący przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą tematu pracy, dostarczając wszystkich niezbędnych informacji do pełnego zrozumienia stosowanych metod badawczych oraz znaczenia uzyskanych wyników. Do jego napisania wykorzystano właściwie i logicznie dobrane piśmiennictwo, obejmujące zarówno pozycje najnowsze jak i kluczowe starsze publikacje, stanowiące pierwotne źródło wiedzy dotyczącej omawianych zagadnień. Jedynym mankamentem jest brak numeracji najniższego poziomu podrozdziałów (str. 21-24).

Doktorantka postawiła sobie w pracy cztery cele. Pierwszym było sprawdzenie, jak często występują gronkowce u psów, kotów i ludzi, uwzględniając zarówno szczepy koagulazo-ujemne, jak i koagulazo-dodatnie. Drugi dotyczył określenia lekooporności szczepów na poziomie fenotypowym oraz genotypowym, ze szczególnym uwzględnieniem oporności na metycylinę. Trzecim była charakterystyka klonalna izolatów gronkowca złocistego w oparciu o sekwencjonowanie genu *spa*. Czwarty cel obejmował poznanie związku potencjalnych czynników ryzyka z kolonizacją badanych ludzi i zwierząt przez gronkowce, ze szczególnym uwzględnieniem szczepów koagulazo-dodatnich czyli gronkowca złocistego i *S. pseudintermedius*. Przyczyny dla których Doktorantka zdecydowała się na wybór takich celów zostały obrazowo wytłumaczone, a ich zasadność nie budzi zastrzeżeń.

Przeprowadzone badanie miało konstrukcję badania przekrojowego. Prawidłowo sformułowano kryteria włączenia i wyłączenia uczestników badania. Pozwoliło to na uzyskanie prób o stosunkowo dużej liczebności – 113 psów, 161 kotów i 261 ludzi. Zastosowano metody przypadkowego i celowego doboru próby badanej. Z oczywistych względów próby nie mogły mieć charakteru losowego, jednakże ich duża liczebność pozwala podejrzewać, że z dużym prawdopodobieństwem uzyskano wyniki

reprezentatywne dla populacji docelowych. Materiał do badań pozyskano od ludzi i zwierząt z zachowaniem wszelkich wymogów formalnych dotyczących wyrażenia przez uczestnika badania świadomej i dobrowolnej zgody. W opisie doboru próby brakuje wskazania metod statystycznych, którymi kierowano się przy określaniu wymaganej wielkości próby.

Izolację i wstępną identyfikację bakterii z rodzaju *Staphylococcus* przeprowadzono rutynowymi metodami mikrobiologicznymi (hodowla na podłożach podstawowych oraz wybiórczo-różnicujących i ocena morfologii kolonii). Klasyfikację na szczepy koagulazododatnie i koagulazo-ujemne oparto na tradycyjnej metodzie określania zdolności bakterii do koagulowania króliczego osocza. Identyfikację gatunkową gronkowców oparto na metodzie MALDI-TOF, a przynależność do gatunków *S. aureus* i *S. pseudintermedius* potwierdzano dodatkowo metodą PCR. Klasyfikację gronkowca złocistego pogłębijono sekwencjonując fragmenty genu *spa*. Zastosowane metody są w pełni prawidłowe i zapewniają wysoką wiarygodność procesu identyfikacji gronkowców. Lekooporność gronkowców badano na poziomie genotypu metodą PCR, a na poziomie fenotypu metodą dyfuzyjno-krażkową oraz poprzez oznaczanie minimalnego stężenia hamującego metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym. Metody te są zgodne z najwyższej jakości standardami i pozwalają na uzyskanie szerokiej wiedzy na temat oporności badanych bakterii na leki przeciwbakteryjne.

Uzyskane wyniki badań zostały w pracy przedstawione niezwykle szczegółowo i udokumentowane bardzo rzetelnie. Wyizolowano 202 szczepy gronkowca złocistego (należące do aż 99 typów *spa*) i 165 szczepów *S. pseudintermedius*. Fenotypowo, ok. 60%-70% nich było odporne na penicylinę klasyczną i aminopenicyliny, a 13% szczepów gronkowca złocistego i 6% *S. pseudintermedius* na metycylinę. Nie są to wartości zatrważające, ale duży niepokój budzi wysoki odsetek opornych na metycylinę (18%) wśród 392 szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych, tradycyjnie uważanych za niechorobotwórcze. Jest to niezwykle ciekawa obserwacja, która może stać się przyczynkiem do dalszych odpowiednio ukierunkowanych badań. Na uznanie zasługuje część ankietowa badania, w której dzięki ogromowi włożonej pracy uzyskano bardzo wysoki odsetek zwrotu ankiet (80%), co zdecydowanie wpływa pozytywnie na wiarygodność uzyskanych wyników. Uzyskane dane pozwoliły na przeprowadzenie rozbudowanej analizy statystycznej wyników i uzyskanie wielu wyników statystycznie

istotnych. Niektóre z tych obserwacji stanowią bardzo interesujące hipotezy i otwierają pole do dalszych badań. Z pewnością badania zyskałyby na przeprowadzeniu statystycznej analizy wieloczynnikowej obejmującej te czynniki, które spełniły w analizie jednoczynnikowej założone wcześniej kryterium istotności statystycznej.

W wynikach brakuje jasnego zilustrowania prewalencji dwóch głównych gatunków gronkowców koagulazo-dodatnich u zwierząt i ludzi wraz z odpowiednimi 95% przedziałami ufności – jej określenie wymaga sięgania do danych w tabelach nr 4 i 5 a następnie wykonania odpowiednich przeliczeń. Ciekawa mogłaby być również bezpośrednia analiza zależności między występowaniem genotypowej i fenotypowej oporności, szczególnie w kontekście dużych rozbieżności w częstości występowania wielolekooporności na poziomie fenotypowym i genotypowym w szczególności w przypadku gronkowca złocistego (tab. 25-26).

Mam pewne zastrzeżenia do sposobu przedstawiania odsetków zwierząt w grupach, który jest dość niespójny – czasem bez miejsc dziesiętnych a czasem z dwoma (str. 51-55). W większości sytuacji wystarczy podawać jedno miejsce dziesiętne. Ponadto, w niektórych przypadkach nie jest jasne jaka liczba stanowiła podstawę do liczenia odsetka (np. str. 54) – dobrą praktyką jest podawanie zarówno licznika jak i mianownika. W niektórych miejscach 95% przedziały ufności dla odsetków budzą wątpliwości, głównie w tabeli 27, np. 95% przedział ufności dla odsetka 1/1 czyli 100% nie jest równy od 100% do 100% a raczej od ok. 20% do 100% (mogą wystąpić różnice w zależności od metody liczenia), ponieważ oszacowanie oparte na jednym elemencie jest bardzo niedokładne. Podobnie dla niskich odsetków (np. 1/92, 1,1%) dolna granica ufności nigdy nie wynosi 0%, ponieważ jakiś szczep gronkowca jednak w badaniu wykryto.

Wyniki badań własnych zostały we właściwy i obszerny sposób przedyskutowane i podsumowane w „Dyskusji”. Zaletą tej części jest duża doza krytycyzmu, z którym Doktorantka podchodzi do uzyskanych wyników, wskazując i omawiając potencjalne mankamenty swoich badań w oddzielnym podrozdziale.

Praca zawiera aż 12 wniosków, które w większości są właściwie sformułowane i odpowiadają założonym celom pracy. Jednak niektóre z nich są bardzo ogólne i jedynie luźno powiązane z przeprowadzonymi analizami (np. wnioski nr 3, 6 i 12) i mogłyby w mojej ocenie zostać pominięte.

Praca została bardzo dobrze napisana pod względem językowym, jak również niezwykle starannie zilustrowana. Zauważyłem jedynie pojedyncze sformułowania, które są w mojej ocenie niewłaściwe: od zwierząt pobiera się próbki a nie próby (s. 105), a bakterii raczej się nie „posiada” (str. 51 i 52). Właściwsze wydaje mi się również pisanie, że gronkowce kolonizują narządy lub tkanki ludzi lub zwierząt, a nie ludzi lub zwierzęta jako takie. Powyższe uwagi nie mają znaczącego wpływu na bardzo wysoką ocenę przeprowadzonych przez Doktorantkę badań i sposobu przygotowania rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. wet. Marty Miszczak pt. „Charakterystyka epidemiologiczna gronkowców izolowanych od ludzi oraz psów i kotów, ze szczególnym uwzględnieniem *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus pseudintermedius*” przygotowana pod opieką prof. dr. hab. Krzysztofa Rypuły i prof. dr. hab. Leszka Szenborna stanowi przykład bardzo wysokiej jakości badań naukowych. Zastosowana metodyka badawcza jest nie tylko w pełni prawidłowa, ale też bardzo różnorodna i nie budzi żadnych zastrzeżeń. Pozwoliło to uzyskać ciekawe wyniki, stanowiące istotny wkład we współczesną wiedzę dotyczącą epidemiologii zakażeń gronkowcowych u ludzi i zwierząt towarzyszących.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Wnioskuje zatem o dopuszczenie Pani lek. wet. Marty Miszczak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto wnioskuje o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą określoną przepisami obowiązującymi na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Mój wniosek motywuję bardzo wysoką jakością przeprowadzonych badań bakteriologicznych i molekularnych, dużym znaczeniem wybranego przez Doktorantkę tematu dla zdrowia publicznego oraz niezwykle dbałością Doktorantki o dokładne i jednocześnie przejrzyste przedstawienie uzyskanych wyników.



dr hab. Michał Czopowicz, prof. SGGW