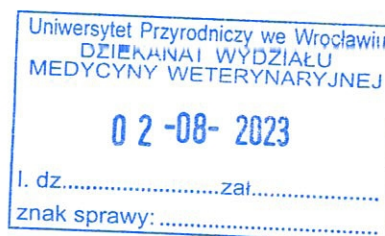


Olsztyn, 27.07.2023 r.

prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj  
Katedra Epizootiologii  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
w Olsztynie



## OCENA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Marty Miszczak**  
pt. „**Charakterystyka epidemiologiczna gronkowców izolowanych  
od ludzi oraz psów i kotów, ze szczególnym uwzględnieniem *Staphylococcus aureus*  
i *Staphylococcus pseudintermedius*”**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Rypuły  
oraz prof. dr hab. Leszka Szenborna

Rozprawa została przygotowana w ramach kształcenia w Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej „ProHum - utworzenie Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich - planowanie badań eksperymentalnych, tworzenie i optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych z umiejętnościami transferowania ich do badań klinicznych w medycynie człowieka” w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020; Osi III Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju; Działania 3.2. Studia doktoranckie (Umowa nr POWR.03.02.00-00-I008/17) zawarta pomiędzy Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu a Uniwersytetem Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Podstawę formalną recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod przewodnictwem prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego, z dnia 27 czerwca 2023 r. (MDDD0000.4101.12.2023).

Gronkowce, to oportunistyczne patogeny, które mogą być odpowiedzialne za wiele ciężkich chorób. Zarówno u ludzi, jak i u zwierząt powszechne jest zjawisko stałego lub przejściowego bezobjawowego nosicielstwa *Staphylococcus* spp. Dotychczas wyodrębniono ponad 30 gatunków gronkowców, a chorobotwórczość wielu z nich nie została ustalona. Większość mikroorganizmów z tej grupy kolonizuje skórę i błony śluzowe

stanowiąc fizjologiczną florą bakteryjną organizmu, jednakże zakażenie gronkowcami może mieć bardzo ciężki przebieg, a leczenie często utrudnia lekooporność drobnoustroju. Znaczna grupa gronkowców wykazuje zdolność do kolonizacji, zarówno organizmów ludzi, jak i zwierząt towarzyszących, żyjących w bliskim kontakcie ze swoimi właścicielami. Zdarza się, że bakterie te przełamują bariery obronne gospodarzy i stają się przyczyną różnego stopnia stanów chorobowych. Stwarza to problem wspólny dla medycyny i weterynarii, związany nie tylko z patogennością tej grupy drobnoustrojów, ale i postępującą lekoopornością.

Odrębny problem stanowi diagnostyka zakażeń gronkowcowych. Podstawą klasyfikacji *Staphylococcus* spp. jest zdolność wytwarzania koagulazy. Za chorobotwórcze przyjęto uznawać gronkowce koagulazo-dodatnie, jednak ostatnie badania wskazują na wzrastający lub dotąd niedostrzegany problem zakażeń objawowych wywoływanych również przez gronkowce koagulazo-ujemne. Przykładem może być *Staphylococcus (S.) epidermidis*, koagulazoujemny gronkowiec uważany przez lata za składnik fizjologicznej flory organizmu. Z uwagi na brak zdolności do wytwarzania koagulazy jego obecność w próbkach poddawanych badaniom bakteriologicznym często bywa ignorowana. Ostatnie badania wykazały, że zajmuje obecnie trzecie miejsce na liście bakterii najczęściej wywołujących zakażenia w warunkach szpitalnych i jest to sygnał, że konieczne są nowe kryteria chorobotwórczości dla tych drobnoustrojów.

Jednym z najlepiej poznanych gatunków gronkowca jest *S. aureus*, który wykształcił wiele mechanizmów oporności na leki przeciwbakteryjne, przez co znalazł się na liście najgroźniejszych patogenów człowieka. Uważa się, że jego naturalnym gospodarzem jest człowiek, jednakże ten sam drobnoustrój może wywoływać liczne choroby również u zwierząt.

Gronkowiec złocisty może być przyczyną zakażeń miejscowych lub ogólnych, a wytwarzana przez niego termostabilna enterotoksyna odpowiedzialna jest za ciężkie zatrucia pokarmowe. *S. aureus* wytwarza wiele toksyn. Szczególną grupę stanowią toksyny o charakterze tzw. superantygenów, m.in. eksfoliatyny zwane także toksynami wstrząsu toksycznego. Ważnym mechanizmem chorobotwórczości gronkowca złocistego jest również zdolność tworzenia tzw. biofilmu.

Podobnie, psy i koty są naturalnymi gospodarzami lub nosicielami różnych *Staphylococcus* spp, które mogą być przyczyną chorób ludzi, jednakże wiedza w tym obszarze jest niepełna. Nie do końca poznane są też czynniki wpływające na aktywację zakażeń, których dany organizm jest nosicielem. Niewiele wiadomo też jakiego stopnia



zagrożenie dla ludzi stwarza powszechne zjawisko nosicielstwa różnych gronkowców przez zwierzęta towarzyszące. Dlatego też podjęcie przez lek. wet. Martę Miszczak badań nad występowaniem gronkowców wśród ludzi i zwierząt towarzyszących, określeniem poziomu lekooporności uzyskanych szczepów, oraz nad ustaleniem czynników ryzyka związanych z kolonizacją ludzi i zwierząt przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* uważam za uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 151 stron i składa się z 6 części takich jak Wprowadzenie, Podstawy teoretyczne badań, Problematyka i metoda badań własnych, Wyniki badań, Piśmiennictwo i Załączniki. Poszczególne części podzielono na rozdziały i podrozdziały. Dysertacja zawiera 34 tabele, 24 ryciny i 12 załączników.

W części „Wprowadzenie”, poprzedzonej wykazem skrótów oraz streszczeniami w językach polskim i angielskim, lek. wet. Marta Miszczak w interesujący sposób opisała historię wykrycia i nadania nazwy bakteriom z rodzaju „*Staphylococcus*”, klasyfikację systematyczną, cechy charakterystyczne gronkowców, właściwości patogenne gatunków i związane z tym problemy diagnostyczne oraz terapeutyczne. Rozdział wzbogacony został trzema rycinami, z których zwłaszcza trzecia, przedstawiająca stworzony przez Autorkę schemat potencjalnej transmisji drobnoustrojów oraz zależności między zwierzęciem i jego opiekunem, zasługuje na uznanie.

Kolejna część, zatytułowana „Podstawy teoretyczne badań”, została podzielona na dwa rozdziały, a te na pięć podrozdziałów. Rozdział pierwszy poświęcony jest charakterystyce *S. aureus*, drugi *S. pseudintermedius*. W rozdziałach tych zostały opisane występowanie i chorobotwórczość obu gatunków gronkowca dla ludzi i zwierząt towarzyszących oraz ich czynniki zjadliwości i lekooporności. Obie części pracy, „Wprowadzenie” i „Podstawy teoretyczne badań”, dowodzą bardzo dobrej znajomości badanej problematyki i piśmiennictwa oraz uzasadniają celowość podjętych badań.

W części dysertacji zatytułowanej „Problematyka i metoda badań własnych”, w rozdziale pt. „Pytania i hipotezy badawcze oraz uzasadnienie celu badań”, Doktorantka wymieniła w czterech punktach przyjęte cele badań:

1. Sprawdzenie, z jaką częstością występują gronkowce u psów oraz kotów i ludzi, uwzględniając zarówno szczepy koagulazo-ujemne, jak i koagulazo-dodatnie;
2. Określenie lekooporności szczepów na poziomie fenotypowym oraz genetycznym ze szczególnym uwzględnieniem oporności na metycylinę;
3. Oznaczenie typów *spa Staphylococcus aureus*;

4. Weryfikację związku potencjalnych czynników ryzyka z kolonizacją badanych ludzi i zwierząt przez gronkowce, ze szczególnym uwzględnieniem szczepów koagulazododatnich (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*).

Dodatkowo, przedstawione zostały pytania badawcze i hipotezy, które miałyby zostać wyjaśnione po osiągnięciu zamierzonych celów badawczych.

W zawartym w tej części pracy rozdziale „Materiały i metody”, liczącym 15 stron, opisana została organizacja i sposób pobierania próbek od ludzi i zwierząt, konstrukcja grup badawczych, metodyka badań bakteriologicznych, metody identyfikacji gatunkowej wyizolowanych szczepów, identyfikacji genów odpowiedzialnych za lekooporność, metody badania lekooporności oraz sposób określania ryzyka kolonizacji badanych zwierząt i ludzi przez gronkowce. Na końcu tej części pracy wymienione zostały zastosowane analizy statystyczne. Materiał do badań stanowiło 261 wymazów pobranych z kilku miejsc na ciele od ludzi oraz 113 od psów i 161 od kotów. Zwierzęta i badani ludzie zostali podzieleni na grupy w zależności od okoliczności zdrowotnych, posiadanych zwierząt, charakteru pracy i wieku. Rozdział „Materiały i metody” został podzielony na 13 podrozdziałów i zawiera trzy tabele oraz 56 rycin. Zastosowana w pracy doktorskiej metodyka, mimo swojej złożoności, została jasno przedstawiona.

Wyniki badań przedstawiono na 42 stronach w pięciu rozdziałach w sposób opisowy i graficzny. Rozdział zawiera 31 tabel i 11 rycin. Liczba danych otrzymanych w wyniku tak bardzo złożonych i obszernych badań jest ogromna. Mimo to Doktorantce udało się przedstawić wyniki w logiczny i jasny sposób.

Analizie poddano 165 szczepów *S. pseudintermedius* uzyskanych z próbek pochodzących od 7 osób i 75 zwierząt oraz 202 szczepy *S. aureus* pochodzące od 109 osób i 30 zwierząt. Interesujące jest to, że wszyscy ludzie, od których wyizolowano typowego dla zwierząt gronkowca *S. pseudintermedius*, w ciągu roku poprzedzającego badania byli leczeni antybiotykami i w większości (ok. 70%) były to kobiety. Drobnoustrój najczęściej izolowano z wymazów ze skóry w zgięciu łokciowym i z przedsionka jamy nosowej. Wśród zwierząt natomiast *S. pseudintermedius* izolowano głównie od dorosłych psów (88% badanych zwierząt). Od 81,75% badanych zwierząt wyizolowano przynajmniej jeden gatunek gronkowców. Łącznie od psów i kotów uzyskano 23 gatunki tych bakterii, a największą różnorodność gatunkową obserwowano w grupie zdrowych kotów.

W przypadku ludzi nosicielami co najmniej jednego gatunku gronkowców było 91,19% badanych osób. Łącznie wyizolowano od ludzi 618 szczepów reprezentujących 22 gatunki gronkowców, najczęściej *S. epidermidis*, *S. hominis* i *S. aureus*.



Lekooporność wśród izolatów *S. pseudintermedius* oraz *S. aureus* badano na poziomie fenotypowym i genotypowym. Nie wykazano związku pomiędzy gatunkiem gospodarza a częstością izolacji szczepów wielolekoopornych (MDR). Szczepy MDR wśród izolatów *S. pseudintermedius* częściej stwierdzano u kotów niż u psów, natomiast wśród izolatów *S. aureus* szczepy MDR częściej pochodziły od psów. Badania statystyczne wykazały, że zwierzęta mieszkające w jednym domu z innymi zwierzętami były nosicielami większej liczby gatunków gronkowców niż te mieszkające jako jedyne zwierzę.

Interesującym elementem recenzowanej rozprawy jest rozdział „Dyskusja” liczący 16 stron, zawierający krytyczną analizę wyników badań własnych w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Lek wet. Marta Miszczak w rozdziale tym dowiodła umiejętności prowadzenia naukowej polemiki, a odpowiednio dobrane piśmiennictwo świadczy o szerokiej znajomości badanej problematyki.

Recenzowaną pracę doktorską wieńczy aż dwanaście wniosków dokumentujących zaplanowane cele badawcze oraz wykaz 295 pozycji piśmiennictwa dowodzących umiejętności doboru literatury odpowiedniej do analizy i dyskusji uzyskanych wyników badań własnych. Na końcu zamieszczone zostały spis tabel i rycin oraz załączniki.

Przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana niezwykle starannie, a jej konstrukcja, choć nieco nietypowa, sprawia, że czyta się ją z dużym zainteresowaniem. Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak kilka drobnych nieścisłości, których Autorka nie ustrzegła się przygotowując ostateczną wersję rozprawy, zatem jako recenzent zobowiązana jestem przedstawić je w formie uwag krytycznych.

- Zamieszczony na początku rozprawy wykaz skrótów jest bardzo pomocny podczas studiowania treści dysertacji. Zabrakło w nim jednak kilku skrótów występujących w pracy
  - SSSS - ang. Staphylococcal scalded skin syndrome (str. 23),
  - agr - ang. accessory gene regulator, str. 24,
  - sar - staphylococcal accessory regulator, str. 24,
  - sae - ang. egzoproteiny *S. aureus*, str. 24,
  - MRSP - ang. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*, str. 26-30, 70-71, 82, 96-97, 101-103, 130, 132,
  - PSM - ang. Phenol-soluble modulín, str. 29,
  - Luk – leukotoksyna, str. 20.
- Na str. 8 Autorka pisze po raz pierwszy o zmiennych strukturach genetycznych, takich jak SCCmec, natomiast tłumaczenie skrótu znajduje się dopiero na str. 15. Regułą jest,

że tłumaczenie powinno pojawić się, gdy skrót używany jest po raz pierwszy, potem stosowany jest wyłącznie skrót. W recenzowanej pracy jest różnie. Podobnie: toksyna Panton-Valentine (PVL), str. 22, CA-MRSA, str. 22, 25, MALDI-TOF MS – tłumaczenie jest na str. 18 i 26, CF, str. 21 i 29.

- Publikacja Bierowiec, 2019, cytowana na str. 8. - W spisie literatury są dwa artykuły opublikowane w 2019 r. Powinny być oznaczone jako a i b. Podobnie Razauskas i wsp., 2015, str. 8 i 26, Ma i wsp., 2020, str 11 i 93.
- W spisie piśmiennictwa brak cytowanych w tekście publikacji: str. 14 i 15, Markiewicz i wsp., 2008, Vogel i wsp., 2019, str. 46, Schwarz i wsp., 2010.
- W spisie cytowanej literatury znalazły się też pozycje, które w pracy cytowane nie były: Cheung i wsp., 1992, Recsei i wsp., 1986
- Str. 10 - określenie opuchlizna sugeruję zastępować słowem obrzęk.
- Str. 14 - „odporność konstytutywna” - powinno być oporność konstytutywna
- Str. 32 – jest: „Określenie lekooporności szczepów na poziomie fenotypowym oraz genetycznym” – powinno być „...fenotypowym oraz genotypowym”.
- Nie do końca zgadzam się z wnioskiem 6, w którym doktorantka pisze, że „Pobieranie wymazów bakteriologicznych z kilku lokalizacji anatomicznych jednocześnie może zwiększać czułość wykrywania obecności gronkowców u ludzi i zwierząt”. Pobieranie próbek z kilku miejsc podnosi raczej skuteczność izolacji drobnoustroju od pacjenta. Czułość kojarzy się raczej z wykrywaniem najmniejszej liczby cząstek drobnoustroju z danego miejsca pobrania.
- We wniosku 7. nazwanie zwierząt hodowlanych producentami żywności uważam za odrobinę niefortunne.
- W przyszłości radzę Doktorantce unikać wielokrotnego cytowania danej pozycji piśmiennictwa w jednym akapicie, po każdym zdaniu, w środku zdania i jeszcze na końcu. To nieco rozprasza uwagę odbiorcy. W takim przypadku wystarczy podać cytowaną pracę na końcu akapitu (np. str. 17, Murray i wsp., 2018, str. 30, Worthing i wsp., 2018).

Praca została bardzo dobrze zaplanowana, doskonale wykonana, a otrzymane wyniki są bardzo interesujące i wnoszą nowe wartości do obecnego stanu wiedzy na temat występowania zakażeń *Staphylococcus* spp. u zwierząt i ludzi, zwłaszcza *S. aureus* i *S. pseudintermedius*. Drobne uwagi mają raczej charakter porządkowy bez wpływu na wysoką ocenę pracy.



Podsumowując, należy stwierdzić, że wykonane przez Doktorantkę obszerne i pracochłonne badania dostarczyły ciekawych i cennych wyników poznawczych oraz aplikacyjnych zasługujących na pozytywną ocenę. Lek. wet. Marta Miszczak wykazała m.in. zależności między występowaniem gronkowców u ludzi i u zwierząt towarzyszących, określiła jakie gatunki gronkowców izolowane są najczęściej od ludzi, psów i kotów, oraz że wśród badanych szczepów *S. aureus* i *S. pseudintermedius* dominuje oporność na penicylinę, ampicylinę, klindamycynę, erytromycynę oraz amoksycylinę z kwasem klawulanowym, co stanowi ważną wskazówkę dla klinicystów przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych. Wykazanie wysokiej częstości izolacji od psów i kotów metycylinoopornych gronkowców koagulazo-ujemnych oraz przedstawienie dowodów na rozprzestrzenianie się międzygatunkowe genów oporności na antybiotyki zwraca uwagę na ryzyko transmisji tych bakterii oraz istotne zagrożenie dla zdrowia człowieka.

Uzyskane wyniki wnoszą cenny wkład do poszerzenia wiedzy dotyczącej epidemiologii zakażeń gronkowcowych u ludzi i zwierząt towarzyszących oraz rzucają nowe światło na temat czynników ryzyka mających wpływ na częstość tych zakażeń.

Reasumując, stwierdzam, że 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***” odpowiada warunkom określonym Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie Wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Marty Miszczak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Wnoszę też o wyróżnienie pracy, ponieważ uważam, że rozprawa doktorska lek. wet. Marty Miszczak w sposób znaczący wzbogaca wiedzę na temat występowania *Staphylococcus* spp. u ludzi i zwierząt.

Olsztyn, 27 lipca 2023 r.



prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj