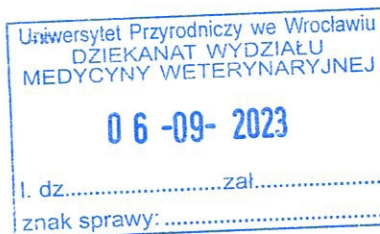




## WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII  
ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 63 23  
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl



Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska  
Zakład Mikrobiologii  
Uniwersytet Wrocławski

5.09.2023

## Recenzja rozprawy doktorskiej

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

**Lek. wet. Marty Miszczak**

Praca doktorska wykonana w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków  
i Zwierząt Egzotycznych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Rypuła

Promotor: prof. dr hab. Leszek Szenborn

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska przygotowana została 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.

Autorka niniejszej rozprawy, lek. wet. Marta Miszczak jest pierwszą Autorką pracy przeglądowej opublikowanej w Postępkach Higieny i Medycyny Doświadczalnej oraz pierwszą Autorką lub współautorką 6 wystąpień konferencyjnych związanych z tematyką pracy.

Rozprawa doktorska ma zasadniczo układ typowy dla prac eksperymentalnych, z pewnymi odstępstwami. Autorka w pracy umieściła obszernie *Wprowadzenie*, po którym nie ma typowego rozdziału pt. *Wstęp*, ale część opisana jako *Podstawy teoretyczne badań*. Należy stwierdzić, iż oba rozdziały w pełni spełniają rolę teoretycznego, typowego wstępu do pracy doktorskiej. Kolejną część pracy stanowi rozdział pt. *Problematyka i metodyka badań własnych*, w której ujęto pytania i hipotezy badawcze, uzasadnienie celu badań oraz materiały i metody, następnie w pracy doktorskiej omówione są wyniki badań,



przedstawiona jest ich dyskusja oraz wnioski. Praca zawiera także wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, piśmiennictwo, spis tabel, rycin oraz załączniki.

Praca poświęcona jest istotnym zagadnieniom z obszaru bakteriologii i epidemiologii. Autorka podejmuje problematykę charakterystyki epidemiologicznej gronkowców izolowanych od ludzi oraz psów i kotów w powiązaniu z ich lekoopornością, którą zestawia z cennymi informacjami pozyskanymi z ankiet, na bazie których możliwe było dokonanie charakterystyki grup badanych oraz charakterystyki czynników mających wpływ na kolonizację ludzi i zwierząt przez gronkowce. Dane z ankiet pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie wniosków o charakterze praktycznym. Doktorantka postawiła sobie kilka celów badań, m.in. sprawdzenie częstości występowania gronkowców u psów i kotów oraz ludzi (szczepy koagulazo-ujemne oraz koagulazo-dodatnie), określenie ich lekooporności ze szczególnym uwzględnieniem oporności na metycylinę, oznaczenie typów *spa* dla *S. aureus* oraz weryfikację związku potencjalnych czynników ryzyka z kolonizacją badanych ludzi i zwierząt przez gronkowce. Założone cele zostały zrealizowane. Zaproponowana w rozprawie doktorskiej problematyka jest bardzo aktualna i wnosi nowe dane nie tylko do badań podstawowych w obszarze mikrobiologii, ale także zebrane wnioski mogą mieć zastosowanie w praktyce, zarówno w weterynarii czy medycynie. Gronkowce, mimo, iż naturalnie kolonizują skórę każdego człowieka, mogą być groźne, szczególnie ma to znaczenie w kontekście problemów zakażeń szpitalnych, ale także ze względu na powodowanie przez te bakterie zatruc pokarmowych, zespołu wstrząsu toksycznego, zapalenia wsierdza, bakteriemii czy posocznicy. Zakażenia wywoływane przez gronkowce, są istotnym problemem epidemiologicznym w skali świata i w tym odniesieniu, wybór tematyki oceniam jako bardzo aktualny. Zaproponowane badania są istotne zarówno epidemiologicznie jak i społecznie.

We *Wprowadzeniu* Autorka charakteryzuje gronkowce, zwracając uwagę na istotny problem epidemiologiczny jakim są obecnie koagulazo-ujemne gronkowce, zwraca także uwagę, iż wiedza na temat epidemiologii oraz wirulencji tych bakterii izolowanych od zwierząt jest znacznie mniejsza niż szczepów izolowanych od ludzi. Doktorantka wskazuje





również na różne czynniki zjadliwości tych bakterii, m.in. na umiejętność „ukrywania się” przed mechanizmami obronnymi gospodarza.

- Proszę o wyjaśnienie jakie mechanizmy Doktorantka ma dokładnie na myśli, czy dla gronkowców jest znany mechanizm mimikry molekularnej, o której Autorka nie wspomina?

W części pracy zatytułowanej: *Podstawy teoretyczne badań*, Doktorantka dokonuje charakterystyki gatunku *Staphylococcus aureus* oraz *S. pseudintermedius*. Wyczerpujący i ciekawy opis dotyczy ich występowania i chorobotwórczości u ludzi oraz u zwierząt towarzyszących, czynników zjadliwości tych drobnoustrojów tj. enzymów, toksyn tworzących kanały w błonie komórkowej czy superantygenów. Autorka omawia także zagadnienie lekooporności tych bakterii. Na wyróżnienie zasługują samodzielnie wykonane ryciny umieszczone w tej części pracy. Pisząc część teoretyczną dysertacji Autorka potwierdziła w pełni szeroką znajomość tematyki oraz prawidłowy dobór literatury. Pytania do tej części pracy:

- Autorka pisze, iż peptydoglikan ma aktywność endotoksyczną i aktywuje system dopełniacza. Czy zatem gronkowce są wrażliwe na układ dopełniacza?
- Jaka jest opinia Doktorantki, na podstawie badań własnych, dotycząca skuteczności metody MALDI-TOF MS do identyfikacji *S. aureus* i *S. pseudintermedius* izolowanych od zwierząt oraz ich wzajemnego prawidłowego różnicowania szczególnie w kontekście opinii innych autorów stosujących tę metodę?
- Które z cech wirulencji *S. pseudintermedius* Doktorantka uważa za kluczowe, popierające tezę umieszczoną w dysertacji: „Badacze wskazują na wysoki potencjał chorobotwórczy *S. pseudintermedius* u ludzi, porównywalny z opisanym *S. aureus*”?

Pod względem formy, rozdział zatytułowany *Problematyka i metoda badań własnych* ma układ inny niż zazwyczaj w pracach doktorskich. Rozdział nie jest zatytułowany: *Cel pracy* doktorskiej, ale: *Pytania i hipotezy badawcze oraz uzasadnienie badań*. Rozdział ten nie jest zwykłym wypunktowaniem celów pracy, ale dość szerokim opisem, w którym Autorka stawia 6 ważnych pytań badawczych, a także formułuje 3 hipotezy. Taka forma



potwierdza bardzo dobre przeanalizowanie przez Doktorantkę tematyki pracy i dojrzałą jej analizę.

W rozdziale *Materiały i metody* Autorka rozprawy opisała organizację i pobieranie materiału do badań, opisała jakie były badane grupy ludzi i zwierząt. W zakresie identyfikacji gatunkowej szczepów Doktorantka opisała badania bakteriologiczne, testy na wytwarzanie koagulazy, identyfikację gatunkową szczepów z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS. Autorka dokonała także opisu izolacji genomowego DNA wszystkich szczepów oraz wykrywania genów techniką PCR. Doktorantka zastosowała także metodę PCT-RFLP do weryfikacji przynależności *S. pseudintermedius*. Dodatkowo, Autorka określiła profil lekowrażliwości szczepów metodą dyfuzyjno-krażkową, oraz metycylinooporność szczepów z wykorzystaniem metody MIC. W rozdziale metodycznym opisano metody statystyczne zastosowane w pracy. Część dotycząca opisu organizacji i pobierania materiału do badań, a także sam przebieg badania opisane są szczegółowo i bardzo dokładnie. Autorka opanowała bardzo dobrze techniki laboratoryjne zarówno z zakresu mikrobiologii, jak i nowoczesne techniki biologii molekularnej. Pytania i uwagi do tej części pracy:

- Czy w badaniach bakteriologicznych wykorzystywane były gotowe podłoża, czy Doktorantka sama je przygotowywała? W opisie nie znajduję odpowiedniego spisu i procedury.
- Biorąc pod uwagę umieszczoną rycinę 8 oraz 9, brakuje ryciny przedstawiającej przykładowy wzrost bakterii na agarze z eskuliną.
- Ryciny 11 oraz 12 powinny znaleźć się raczej w rozdziale *Wyniki*, dodatkowo powinny być bardziej szczegółowo opisane tj. masy molekularne markera oraz nazwy lub numery izolatów.
- Co było próbą kontrolną i jak oznaczoną na ryc. 13 przy określaniu metycylinooporności metodą MIC?
- Jak Doktorantka definiuje słowo „izolat” w kontekście używanej w pracy nomenklatury? Opisuując przebieg eksperymentów należy oddzielić moment pozyskiwania izolatów do badań w odróżnieniu od pracy nad już konkretnymi szczepami.

Wyniki zobrazowane są szczegółowo na licznych wykresach, a dane zestawione w tabelach. Doktorantka analizuje dane w oparciu o analizę statystyczną. Opracowanie i zestawienie wyników pracy doktorskiej jest czytelnie przygotowane, wyniki są zwięzłe





opisywane i podsumowują kolejne etapy pracy, niemniej ich analiza pozwala na postawienie pytań:

- o W rozdziale *Występowanie gronkowców u zwierząt*, w tabelach nr 6 i 8, zestawione są dane dotyczące izolacji gronkowców, podane są wartości próbek pozytywnych, dane te uzyskano którą, z opisanych w części metodycznej metodą?
- o Czy wszystkie izolaty wstępnie zaklasyfikowane jako gronkowce udało się następnie zidentyfikować do gatunku z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS z uzyskaniem odpowiednio wysokiego *score*?

Ze względu na fakt, iż gronkowce wykazują wyraźne preferencje do określonego miejsca bytowania w organizmie, cenne są wyniki pokazujące częstość ich występowania z uwzględnieniem właśnie lokalizacji. W tym miejscu chciałabym podkreślić i docenić ogrom pracy jaki musiała wykonać Doktorantka pracując z tak dużą liczbą izolatów. Praca taka wymaga bardzo dobrego warsztatu bakteriologicznego, aby finalnie uzyskać odpowiednio czyste kultury niezbędne do wykonania zaawansowanych badań MALDI-TOF MS. Efektem tych czasochłonnych prac jest zgromadzenie unikalnej kolekcji szczepów, co jest bardzo ważnym efektem finalnym tej rozprawy, niestety niezbyt uwypuklonym i podkreślonym przez samą Doktorantkę.

Ciekawe wyniki uzyskała Doktorantka w części pracy analizującej występowanie genów determinujących lekooporność. Wyniki Autorka zestawiała w tabelach. Badania dotyczące lekooporności, przedstawione w tej pracy, uważam za interesujące, bardzo ważne i cenne z praktycznego punktu widzenia. Ważnym testem było wykonanie badania metycylooporności gronkowców koagulazo-ujemnych i tutaj ciekawym wynikiem było uzyskanie ponad 25% szczepów opornych na metycylinę wśród *S. epidermidis*. Dla pełnej analizy badań istotnymi były dane pozyskane z kwestionariuszy, na bazie których sporządzono analizy statystyczne czynników ryzyka związanych z kolonizacją badanych ludzi i zwierząt przez gronkowce. Ciekawą obserwacją była korelacja między metycyloopornością, a pracą w ochronie zdrowia lub pracą związaną z bezpośrednim kontaktem ze zwierzętami. W pracy doktorskiej potwierdzono, iż dominującymi u ludzi gatunkami były *S. epidermidis* i *S. aureus*, u psów *S. pseudintermedius* i *S. epidermidis*, natomiast u kotów *S. felis* i *S. epidermidis*, co jest potwierdzeniem danych wskazywanych także przez innych autorów.

*Dyskusja* poprowadzona jest ciekawie i dojrzałe, Autorka konfrontuje wyniki własne z wynikami innych autorów. Ciekawym rozdziałem jest rozdział pt. *Ograniczenie badania*, w którym lek. wet. Marta Mischczak uzasadnia jakie badania i dlaczego nie mogły być



wykonane, a o jakie w przyszłości należałoby tę tematykę badań poszerzyć. Autorka słusznie wskazuje, że dodanie w przyszłości dla uzyskanych szczepów metody MLST pozwoliłoby na stworzenie pełnej charakterystyki pozyskanych izolatów. *Piśmiennictwo* do pracy dobrane zostało prawidłowo, Autorka cytuje aktualne pozycje, jednak w spisie literatury nie odnajduję pozycji Markiewicz i wsp. 2008, na którą w dysertacji Autorka się powołuje.

Doktorantka finalnie formułuje 12 wniosków płynących z otrzymanych wyników. Część wniosków, w mojej opinii jest zbyt ogólnych, niemniej za najbardziej cenne wnioski wynikające z przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej uważam:

- wykazanie wysokiej częstości izolacji metycylinoopornych gronkowców koagulazo-ujemnych od zwierząt najczęściej utrzymywanych w domach i wskazanie na ryzyko międzygatunkowej transmisji tych bakterii, co stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia człowieka,
- wykazanie wśród badanych szczepów *S. aureus* oraz *S. pseudintermedius* oporności na penicylinę, ampicylinę, klindamycynę, erytromycynę oraz amoksycylinę z kwasem klawulanowym, jako istotnej wskazówki terapeutycznej,
- potwierdzenie u ludzi, psów i kotów typów *spa* gronkowców złocistych izolowanych wcześniej głównie z żywności oraz dzikich zwierząt co wskazuje na szeroką transmisję międzygatunkową.

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi jakie stawia się eksperymentalnym pracom doktorskim. Pani lek. wet. Marta Miszczak wykazała się znajomością technik mikrobiologicznych oraz biologii molekularnej, przeprowadziła prawidłowo szereg eksperymentów, dokonała właściwego wnioskowania i przeprowadziła dojrzałą analizę swoich wyników. Uzyskane wyniki wnoszą nowe dane do badań podstawowych, a jednocześnie mogą być dobrym materiałem dla pracy lekarzy weterynarii oraz epidemiologów. Na szczególne wyróżnienie zasługuje oprawa edytorska pracy oraz piękny język rozprawy. Czytanie rozprawy było prawdziwą przyjemnością, gdyż Autorka wiedzie czytelnika przez meandry swojej dysertacji pisząc piękną mikrobiologiczną



## WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII  
ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 63 23  
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

opowieść, stawia pytania, dokonuje oceny, rozważa, udziela odpowiedzi, jednocześnie nie gubiąc naukowego charakteru pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani lek. wet. Marty Miszczak spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce oraz wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Zwracam się do Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z prośbą o dopuszczenie **Pani lek. wet. Marty Miszczak** do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Zakład Mikrobiologii  
KIEROWNIK

prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska

Gabriela Bugla-Płoskońska