

Acceptuję



Warszawa, dnia 15.05.2023 r.

Prof. dr hab. Marian Binek
Zakład Mikrobiologii
Katedra Nauk Przedklinicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
SGGW w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 WARSZAWA

Recenzja

rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne **mgr Anety Mroczkowskiej, zatytułowanej „Livestock-associated *Staphylococcus aureus* w Polsce – nowe zagrożenie dla zdrowia publicznego”**, **wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Anny Skoczyńskiej i promotora pomocniczego Dr n. biol. Joanny Empel**

- 1. Podstawa formalna recenzji:** Uchwała Rady Centrum Biostruktury, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, z dn. 17.05.2018 roku. Rozprawę doktorską stanowi praca pisemna. Badania przeprowadzono w Zakładzie Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowego Instytutu Leków w Warszawie.
- 2. Ogólna charakterystyka rozprawy:** Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma formę manuskryptu zatytułowanego „Livestock-associated *Staphylococcus aureus* w Polsce – nowe zagrożenie dla zdrowia publicznego” i odpowiada standardom dla tego typu dysertacji. Rozprawa rozpoczyna się wstępem, zawiera wyraźnie wyodrębniony cel pracy, opis materiałów i metod, omówienie wyników, dyskusję, wnioski i wykaz piśmiennictwa. Praca poprzedzona jest wykazem ważniejszych użytych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Do manuskryptu dołączono aneks z wykazem ferm świń z których pobierano próbki oraz wzór ankiety na podstawie której zidentyfikowano i charakteryzowano osoby i obiekty objęte badaniami.

3. Problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego:

Współczesne technologie przyczyniające się do niezwyklej i powszechnej mobilności, międzynarodowy rynek, dewastacja środowiska, przeludnienie, zmiany klimatyczne, sprawiają, że Ziemia stała się niewielką przestrzenią, na której lokalne wydarzenia odbijają się w skali globalnej. Dotyczy to w szczególności zdrowia i chorób, które w erze globalizacji, ze względu na szybkie i masowe rozprzestrzenianie się zagrażają wszystkim. Oznacza to spojrzenie na chorobę odzwierzęcą w szerszym kontekście niż na zoonozę, z uwzględnieniem współzależności wszystkich składowych ekosystemu, w tym zarówno zbiorowych zachowań ludzkich, jak i instytucjonalnych. Poparciem dla tezy, że zdrowie człowieka zależy od „zdrowia ekosystemu” są pojawiające się zagrożenia obserwowane na przestrzeni ostatnich dekad, głównie ze strony chorób spowodowanych przez przekraczające barierę gatunkową RNA wirusy, priony, a także wiele bakterii. Ostatnie wydarzenia, w tym pandemia Covid-19 pokazują, że idea jednego zdrowia we wspólnym świecie zyskuje na znaczeniu. W takim kontekście postrzegam zasadność podjętych przez Panią mgr Anetę Mroczkowską badań poświęconych zagrożeniom dla ludzi ze strony nowej linii genetycznej odzwierzęcego gatunku *Staphylococcus aureus* określonego jako Livestock-associated. Kompleks klonalny CC398 wspomnianego gatunku tzw. kład zwierzęcy związany jest z gospodarzem, którym jest świnia i został opisany w początkach lat 2000-nych i później. Wrotce okazało się, że gronkowce złociste, a wśród nich szczepy Metycylino-oporne (LA MRSA) przenoszą się na ludzi, w tym nie tylko zawodowo zajmujących się chowem świń, ale także zamieszkujących w pobliżu ferm hodowlanych oraz osób zupełnie nie związanych z otoczeniem chowu zwierząt. Co więcej, izolowane od ludzi szczepy okazywały się uzyskiwać nowe cechy i często były bardziej zjadliwe poprzez między innymi zdolność do wytwarzania inhibitora dopełniacza, leukocyny PV, nowych białek powierzchniowych i innych. Stało się więc jasne, że bakterie przenoszą się i adaptują do ludzi stwarzając tym samym zagrożenie dla ich zdrowia. Stanowią również zagrożenie dla zdrowia publicznego wynikające z faktu zanieczyszczenia takimi szczepami otoczenia chowu zwierząt, produktów żywnościowych zwierzęcego pochodzenia, jak i ich transmisji między ludźmi, w tym w środowisku szpitalnym. Doktorantka dostrzega pojawiające się zjawisko, które na podstawie wstępnych doniesień w literaturze dotyka również Polskę. Zagrożenie zdrowia ludzi potęguje masowy chów świń, z reguły w dużych fermach i będące jego

skutkiem zanieczyszczenie środowiska, co w sumie sprzyja transmisji wspomnianych gronkowców od zwierząt do ludzi i pomiędzy ludźmi. Doktorantka podejmuje kompleksowe badania, których celem jest udzielenie odpowiedzi na pytanie dotyczące częstości występowania LA-SA u świń na fermach trzody chlewnej zlokalizowanych w różnych regionach kraju, a także u rolników i lekarzy weterynarii, którzy z racji wykonywanego zawodu mają kontakt na co dzień z trzodą chlewną. Dokonuje także oceny właściwości izolowanych szczepów zarówno metodami fenotypowymi, jak i metodami biologii molekularnej. Badania Pani mgr Anety Mroczkowskiej obejmują więc typowanie molekularne livestock-associated *S. aureus* w celu rozpoznania ich kompleksów klonalnych, typów sekwencyjnych, typów elementu SCCmec i innych. Autorka wykrywa również geny lub ich fragmenty kodujące czynniki inwazyjności, zjadliwości i lekooporności. Na podstawie cech molekularnych dokonała następnie analizy porównawczej izolatów *S. aureus* występujących u świń i ludzi oraz bliżej scharakteryzowała szczepy nowego kompleksu klonalnego CC30. Wyniki tego ostatniego zadania badawczego pozwoliły na odkrycia nowego nieopisywanego dotychczas na świecie klonu MRSA (ST433-t318-SCCmec IVa). Postawione na wstępie cele należy uznać za zasadne i spójne ze zidentyfikowanymi do rozwiązywania problemami naukowymi.

4. **Ocena ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki w dyscyplinie nauki medyczne:** Mgr Aneta Mroczkowska jest czynnym pracownikiem Zakładu Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, specjalistką do spraw mikrobiologii. Posiada doświadczenie zawodowe w zakresie diagnostyki mikrobiologicznej oraz epidemiologii szpitalnej i poza szpitalnej. Na podstawie przedstawionego we wstępie dysertacji opisu aktualnego stanu wiedzy na temat właściwości gronkowców, dochodzenia epidemiologicznego i epidemiologii wywoływanych przez te bakterie chorób należy uznać, że Kandydatka dysponuje niezbędną wiedzą w dyscyplinie nauki medyczne. Przywołane pozycje literatury zarówno we wstępie manuskryptu, jak i w rozdziale poświęconym formułowaniu założeń i dyskusji są trafne i aktualne. Korzysta i biegle posługuje się rekomendacjami wydawanymi przez Europejskie i Światowe Instytucje ds. standaryzacji metod badań mikrobiologicznych.

5. Poprawność i oryginalność metodyczna oraz zakres rozwiązania zagadnienia naukowego: Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła badania, które można określić jako kompleksowe ze względu na dużą liczbę izolatów LA-SA pochodzących zarówno od świń, ludzi i środowiska, jak i wielość oraz zróżnicowanie metod badawczych. W pierwszej części rozprawy, do analizy i charakterystyki LA-SA wykorzystywała szczepy zebrane przez pracowników Zakładu Chorób Świń, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach realizujących projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Populacja *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę występujących u trzody chlewnej i hodowców w Polsce – charakterystyka fenotypowa i genotypowa”. Fakt ten należy ocenić wysoce pozytywnie, ponieważ jest dowodem na współpracę naukową jednostek reprezentujących odmienne dziedziny i dyscypliny naukowe, pracujących jednak na rzecz wspólnego dobra, którym jest zdrowie ekosystemu i ostatecznie zdrowie publiczne. Kandydatka stosuje wybraną, ale kompleksową paletę metod badawczych z zakresu nowoczesnej epidemiologii molekularnej, w większości opartych na genomowej analizie i typowaniu izolatów w oparciu o PCR, sekwencjonowanie i wiele technik rozdziału i analizy genomowego DNA. Zna także i biegle posługuje się metodami badań fenotypowych, co w sumie należy uznać za dowód pełnego przygotowania do pracy w diagnostycznym laboratorium o profilu mikrobiologicznym i epidemiologicznym. Mgr Anecie Mroczkowskie udało się rozwiązać postawione we wstępie cele badawcze i udowodniła, że LA-SA, w tym w większości MRSA, występują u świń w wielu fermach w Polsce.. Dominują bakterie zaliczane do linii genetycznych: CC398, CC9 i CC30/ST433. Kład zwierzęcy CC398 występuje zarówno wśród hodowców, jak i lekarzy weterynarii. Nosicielstwo tych gronkowców ma tendencję wzrostową, podobnie jak kompleksu klonalnego CC30, wśród, których Doktorantka odkryła nowy klon ST433-t318-SCCmec IVa. Uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne o dużym znaczeniu poznawczym, stanowiące podstawę do badań i analiz porównawczych w przyszłości. Mają również znaczenie praktyczne ponieważ wskazują na zwierzęcy rezerwuuar i źródło zakażenia LA-SA, w tym szczepami MRSA, a także ich transmisję między ludźmi, co rodzi zagrożenie dla zdrowia publicznego. Równocześnie, opisana sytuacja stwarza potrzebę uzupełnienia wywiadu lekarskiego, co najmniej o informację na temat profesji chorego, miejsca jego zamieszkania, kontaktu z osobami pracującymi ze zwierzętami itp. Słabą stroną dysertacji stanowi fakt, że analizowane szczepy LA-SA, w większości pochodziły z lat

2011-2012. Uzyskane dane odnoszą się zatem do wspomnianego okresu. Na obronę Autorki przemawia fakt wcześniejszego opublikowania wyników badań we współautorskiej pracy pt.: Livestock-associated *Staphylococcus aureus* on Polish pig farms. PLoS One 12:e0170745 (2017). Kandydatka występuje tam jako pierwszy autor. Ponadto, jak wspomniano wcześniej, uzyskane dane niewątpliwie będą stanowić punkt odniesienia dla innych badaczy do analizy częstości występowania, czy dróg rozprzestrzeniania się LA-SA. Mocną stroną dysertacji stanowią: uzasadniona potrzeba i cel podjęcia badań, ich kompleksowość, współpraca naukowa z jednostkami zewnętrznymi, rozbudowana i nowoczesna metodyka badań, staranne i przejrzyste przedstawienie wyników oraz przygotowanie manuskryptu. Na podkreślenie zasługuje również fakt szczegółowego zbadania przez Doktorantkę antybiotykooporności izolatów LA-SA, zarówno przy pomocy metod fenotypowych, jak i molekularnych. Ta część badań oprócz aktualizacji wiedzy na temat antybiotykooporności wspomnianych bakterii wpisuje się również w ideę monitorowania zjawisk lekooporności w celu budowy programów i tworzenia rekomendacji postępowania w zakresie profilaktyki i kontroli zakażeń i chorób zakaźnych, a także racjonalizacji stosowania i zużycia antybiotyków.

6. **Wniosek końcowy:** Mgr Aneta Mroczkowska wykonała nakreślone w celach rozprawy zadania badawcze i uzyskała wartościowe wyniki o znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym. Potwierdziła, że gronkowce złociste linii genetycznej określanej jako livestock-associated występują również u świń w Polsce, adaptują się do ludzi i dalej mogą się wśród nich rozprzestrzeniać. Doktorantka zauważa, że wspomniane bakterie charakteryzują się wysokim stopniem genetycznego zróżnicowania co może świadczyć o ich polifiletycznym pochodzeniu, ale z drugiej strony również o ciągłej i szybkiej ewolucji w wyniku nabywania nowych cech w tym zjadliwości w następstwie wbudowywania genów kodujących wiele toksyn, jak PVL, czy różne enterotoksyny. Autorka wyciąga podobne wnioski co do zróżnicowania LA-SA pod względem obecności genów kodujących oporność na antybiotyki. Metycylinooporne LA-SA oprócz niewrażliwości na β -laktamy wykazują często oporność na wiele innych grup antybiotyków, jak np. tetracykliny, fenikole, linkozamidy, oksazolidynony, pleuromutyliny, czy streptograminę. Co więcej, szczepy niosące gen *cf* wykazują krzyżową oporność na linezolid, stosowany w leczeniu chorób wywoływanych przez MRSA. W opisanej sytuacji, jak dowodzi Autorka, dochodzi więc do dalszego

ograniczenia potencjalnych opcji terapeutycznych w praktyce klinicznej. Doktorantka zauważa ponadto, że konieczność wdrożenia terapii antybiotykowej u chorych w następstwie zakażenia wspomnianymi szczepami może mieć wpływ na dalszą ewolucję LA-SA. Mgr Aneta Mroczkowska na podstawie przebadania dużej, ponieważ wynoszącej 283 izolatów LA-SA identyfikuje potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego wymagające ciągłego monitorowania. Bezspornie, wyniki zaprezentowane w ocenianej dysertacji będą stanowiły punkt odniesienia dla danych uzyskiwanych w przyszłości.

Oceniana dysertacja wnosi nowe dane do nauki i poszerza wiedzę na temat właściwości LA-SA i epidemiologii wywoływanych przez nie chorób. Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska autorstwa Mgr Anety Mroczkowskiej zatytułowana *Livestock-associated Staphylococcus aureus w Polsce – nowe zagrożenie dla zdrowia publicznego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.)*. Przedkładam, zatem Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. wet. Marian Binek