Ocena rozprawy doktorskiej
w dziedzinie nauk medycznych
mgr Łukasza Mąki
pt. „Analiza wybranych mechanizmów lekooporności szczepów *Salmonella* spp. wyizolowanych z żywności w latach 2008 – 2013"

Lekooporność pałeczek *Salmonella*, podobnie jak innych rodzajów chorobotwórczych pałeczek *Enterobacteriaceae*, stanowi obecnie istotny problem zdrowia publicznego ze względu na występującą w środowisku życia człowieka znaczną presję selekcyjną w kierunku szczepów o zwiększonej oporności. Presja ta spowodowana jest m. in. nadużywaniem antybiotyków i chemioterapeutyków w rolnictwie i weterynarii. Stosowanie antybiotyków nie tylko jako środków leczniczych lecz także w celach profilaktycznych oraz jako promotorów wzrostu u zwierząt hodowlanych pośrednio wzmaga szybkość rozprzestrzeniania się ruchomych elementów genetycznych, warunkujących wystąpienie określonych mechanizmów lekooporności u szczepów. Ze względu na łatwość transmisji lekoopornych bakterii od zwierząt do człowieka za pośrednictwem żywności, bieżąca analiza wzorów lekooporności oraz mechanizmów warunkujących tę oporność jest istotna dla monitorowania stanu zagrożenia dla konsumentów żywności oraz bezpieczeństwa zdrowotnego populacji.

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Łukasz Mąka poddał takiej ocenie 241 lekoopornych izolatów *Salmonella* spp. pozyskanych z próbek żywności w latach 2008-2013 w Polsce. Podstawową naukową przesłanką wiodącą do podjęcia takich badań były dane piśmiennictwa oraz własne obserwacje zespołu naukowego, którego aktywnym badaczem był mgr Łukasz Mąka, o stale narastającej lekooporności izolatów *Salmonella* spp. w kraju. Ponad 68% izolatów *Salmonella* spp. wyosobnionych z próbek mięsa w latach 2008-2012 przejawiało oporność na co najmniej jeden lek przeciwbakteryjny i był to istotnie wyższy odsetek lekoopornych szczepów w porównaniu z okresem obejmującym lata 2004-2007.

Szerokie omówienie obecnego stanu wiedzy o lekoopornych pałeczkach z rodzaju *Salmonella* Doktorant zawarł we Wstępie ocenianej rozprawy. Przedstawił w nim mechanizmy chorobotwórczości oraz oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki, wraz z omówieniem zjawiska wielolekooporności i przyczyn jego występowania wśród pałeczek *Salmonella*. Zwrócił też uwagę na pojawienie się szczepów *Salmonella* spp., np. serotypu Kentucky, wytwarzających β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL). Szczepy takie już został wyosobnione w kraju z próbek mięsa

przeznaczonego do spożycia. W mojej opinii jednak w tym obszernym opracowaniu zabrakło wyczerpującego omówienia znaczenia oraz typów pomp efflux, aktywnie usuwających antybiotyki i chemioterapeutyki z cytozolu komórki bakteryjnej.

Za swoje główne zadania badawcze mgr Łukasz Mąka uznał określenie mechanizmów warunkujących oporność pałeczek *Salmonella* na antybiotyki i chemioterapeutyki. Poznanie tych mechanizmów umożliwia określenie potencjału transmisji ruchomych elementów genetycznych, niosących geny oporności w środowisku oraz w produktach spożywczych, wytwarzanych z mięsa skażonego lekoopornymi pałeczkami *Salmonella*. Autor postawił sobie jeszcze jedno zadanie – analizę podobieństwa genetycznego badanych izolatów pałeczek *Salmonella*.

Zarówno tezę badawczą zakładająca, że żywność jest istotnym źródłem lekoopornych bakterii chorobotwórczych dla człowieka, jak i zadania badawcze zaprojektowane w celu weryfikacji tej hipotezy uważam za prawidłowe i naukowo uzasadnione.

Do realizacji badań Doktorant wykorzystał analityczne narzędzia biologii molekularnej, tj. łańcuchową reakcję polimerazy (metodę PCR), sekwencjonowanie oraz typowane genetyczne izolatów za pomocą analizy wielkości fragmentów restrykcyjnych chromosomalnego DNA badanych izolatów *Salmonella* spp. po ich rozdziale za pomocą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). Zastosował także klasyczną metodę dyfuzyjno-krążkową oznaczania wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki, a dla szczepów lekoopornych oznaczał wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC), stosując do interpretacji wyników kryteria Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości lub Clinical and Laboratory Standard Institute w Stanach Zjednoczonych.

W wyniku przeprowadzonych analiz mgr Łukasz Mąka pokazał istotnie niższy odsetek lekoopornych pałeczek w produktach gotowych do spożycia w porównaniu do odsetka lekoopornych izolatów w produktach przeznaczonych do dalszej obróbki cieplnej (8,3% vs 90,3%) wśród szczepów *S. enterica* subsp. *enterica* pozyskanych w 2013 roku. To stwierdzenie jednak powinno zostać poparte przedstawieniem proporcji tych produktów ujętych w badaniach, tak aby można było przyjąć, że żywność gotowa do spożycia jest skażona przez lekooporne pałeczki *Salmonella* w istotnie niższym stopniu.

W celu identyfikacji genów warunkujących oporność w genomach 241 włączonych do badań izolatów *Salmonella* spp. Doktorant wykonał 52 różnych rodzajów

reakcji PCR, w tym co najmniej 9 rodzajów badań wykonał w postaci PCR multiplex. Świadczy to o dużym nakładzie pracy włożonym w realizację zadań badawczych, których wyniki przedstawiono w ocenianej rozprawie doktorskiej. Dzięki szeroko zakrojonym badaniom przesiewowym mgr Łukasz Mąka zidentyfikował 14 różnych genów warunkujących lekooporność w genomach badanych szczepów.

Za istotną praktyczną obserwację opisaną w ocenianej rozprawie uważam wykazanie, że żaden z 74 szczepów *Salmonella* spp. opornych na antybiotyki β-laktamowe nie wytwarzał β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL). Znaczny odsetek (75,1%) badanych szczepów wykazywał oporność na kwas naliksydowy i ciprofloksacynę. Analizując w rozprawie mechanizmy leżące u podstaw tej oporności, wykazano występowanie 10 różnych zmian aminokwasowych w czterech genach: *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE*, warunkujących oporność na chinolony i fluorochinolony. W stosunku do tetracykliny i sulfonamidów oporność przejawiało odpowiednio 39,0% i 41,5% badanych szczepów *Salmonella* spp. Aż 24,5% izolatów pałeczek *Salmonella* posiadało w genomie integrony klasy I, ruchome elementy genetyczne, których przyczyniają się do szerzenia się oporności na leki pomiędzy różnymi szczepami i gatunkami bakterii. W obrębie integronów zidentyfikowano w wyniku sekwencjonowania 6 różnych kaset genowych. Potwierdzono eksperymentalnie występowanie zjawiska transferu genów warunkujących oporność na antybiotyki na drodze koniugacji pomiędzy wybranymi izolatami *Salmonella* spp. i *Escherichia coli*. Wymienione powyżej obserwacje stanowią istotne elementy opisu obecnego stanu mikrobiologicznego znajdującej się w obrocie żywności w Polsce.

Do tej części rozprawy mam dwie uwagi: 1) kryteria doboru określonych genetycznych wyznaczników lekooporności, których poszukiwano u pałeczek *Salmonella* powinny być szerzej omówione; 2) u prawie połowy izolatów pałeczek tego drobnoustroju przejawiających oporność na co najmniej jeden antybiotyk/ chemioterapeutyk nie wykryto poszukiwanych wyznaczników lekooporności; przyczyny tego zjawiska powinny być także poddane wyczerpującej dyskusji.

Chromosomalne DNA izolatów *Salmonella* spp., zaliczonych do 10 różnych serotypów, poddano trawieniu endonukleazą Xba*I* a następnie analizowano metodą PFGE. Uzyskane wzory makrorestrykcji poddano analizie skupień (klasteryzacji) w celu ustalenia podobieństwa genetycznego pomiędzy izolatami. W trakcie analizy zamieszczonych w rozprawie dendrogramów, nasuwa się pytanie: w jaki sposób definiowano profile PFGE, czyli na jakiej podstawie odróżniano je od siebie? Dotyczy to zwłaszcza wzorów makrorestrykcji uzyskanych dla izolatów *Salmonella* Enteritidis,

których wzory makrorestrykcji są wysoce homogenne po trawieniu chromosomalnego DNA jedynie endonukleazą Xba*I*, tak jak postępowano w badaniach przedstawionych w rozprawie.

Oceniana rozprawa doktorska jest bardzo obszerna, liczy 239 stron, włącznie z 51 rycinami i 38 tabelami, dokumentującymi uzyskane wyniki. Poza wartością naukową uzyskanych wyników bardzo pozytywnie oceniam sposób prowadzenia dyskusji wyników własnych w porównaniu z wynikami innych badaczy. Obrazuje on szeroką wiedzę Doktoranta na temat lekooporności pałeczek *Salmonella*, popartą cytowaniem 387 pozycji piśmiennictwa.

Do rozdziału Dyskusja mam następującą uwagę: mgr Łukasz Mąka wielokrotnie nawiązuje do wyników trzech publikacji z lat 2010-2015 o lekooporności pałeczek *Salmonella*, których był współautorem (wraz z co najmniej czterema innymi badaczami). Uważam, że fakt współautorstwa publikacji powinien być każdorazowo uwzględniany podczas powoływania się na wyniki tych prac.

Ocenianą rozprawę kończy 11 wniosków. Są one w większości uzasadnione w oparciu o uzyskane wyniki i ich dyskusję. Zastrzeżenia mam do dwóch wniosków: 1) wniosek nr 1 powinien zostać przeformułowany – częstość występowania lekoopornych pałeczek *Salmonella* spp. być może rośnie w latach 2008-2013 (tj. rok do roku), ale nie wskazują na to bezpośrednio wyniki tej pracy. Zakładam, że autor porównuje uzyskane wyniki z poprzednim okresem, tj. przed 2008 rokiem; 2) podobne zastrzeżenie dotyczy wniosku nr 7 w odniesieniu do rozpowszechnienia, wraz z żywnością, lekoopornych klonów na terenie Polski na przestrzeni lat.

Wniosek końcowy:

Podjęcie przedstawionych w ocenianej rozprawie badań uważam za wysoce uzasadnione; w Polsce nie są dostępne wyniki oceny lekooporności izolatów *Salmonella* spp. z żywności występujących w obrocie, bezpośrednio dostępnej dla konsumentów. Za wyróżniające się, oryginalne osiągnięcie Autora uznaję wykazanie występowania określonych mechanizmów oporności u szczepów *Salmonella* spp. wyosobnionych ostatnio w naszym kraju, jak również wskazanie na potencjał rozprzestrzeniania się tej oporności. Jest to niezmiernie ważne dla poprawy bezpieczeństwa żywności w Polsce a także dla obniżenia stopnia narażenia konsumentów na zagrożenia związane ze spożyciem skażonej żywności. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia

więc wszystkie wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.

W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Mąkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Elżbieta Anna Trafny, prof. WAT

Centrum Inżynierii Biomedycznej

Instytutu Optoelektroniki,

Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie