

Prof. dr hab. Aneta Nowakiewicz

Lublin, dn. 02 kwietnia 2023 r

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Skarżyńskiej pt. „*Antybiotykooporność bakteryjnej flory jelitowej wybranych gatunków zwierząt*” wykonanej pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Dariusza Wasyla

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 13 grudnia 2017 roku.

Badania przedstawione przez Doktorantkę w niniejszej rozprawie doktorskiej w formie cyklu publikacji, obejmują niezwykle istotną i jakże aktualną tematykę związaną z analizą i kontrolą narastającego zjawiska lekooporności wśród drobnoustrojów. Wydarzenia z ostatnich kilku lat związane z gwałtownym i nieprzewidywalnym rozprzestrzenianiem się wśród populacji ludzkiej wirusa SARS-CoV-2 i konsekwencji różnorodnych powikłań zdrowotnych z tym związanych, uświadomiły jak ważnym jest bezpieczeństwo ludzi i zwierząt w kontekście możliwości stosowania skutecznych leków nie tylko o działaniu przeciwwirusowym ale również przeciwbakteryjnym. Ponieważ sytuacja pandemiczna nie jest zarezerwowana wyłącznie dla infekcji wirusowych, dysponowanie skutecznymi metodami profilaktyki i terapii również infekcji na tle bakteryjnym jest niezbędnym elementem bezpieczeństwa zdrowia publicznego. W 2021 roku Światowa Organizacja Zdrowia ogłosiła, że oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe jest jednym z dziesięciu największych globalnych zagrożeń dla zdrowia publicznego, przed którymi stoi ludzkość, dlatego wszelkie działania i badania związane z wyjaśnianiem mechanizmów lekooporności drobnoustrojów, ich monitoringiem, kontrolą, a także odkrywaniem nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych należą do najbardziej pożądaných obecnie aktywności naukowych.



Konieczność podjęcia zintegrowanych działań, dotyczących nie tylko problematyki związanej z lekoopornością czynników odpowiedzialnych za infekcje u człowieka, doskonale wpisuje się w koncepcję „Jedno zdrowie” (ang. One Health), która oznacza ogólnoswiatowe, systemowe podejście do zdrowia, oparte na zrozumieniu, że zdrowie ludzkie jest ściśle powiązane ze zdrowotnością zwierząt, bezpieczną żywnością i środowiskiem oraz właściwą równowagą ich wpływu na ekosystemy. Dlatego tematyka prac, dotycząca oceny i charakteru lekooporności mikrobioty jelitowej wybranych do ewaluacji w niniejszej rozprawie doktorskiej gatunków zwierząt, jest niezwykle ważna zarówno z poznawczego jak i epidemiologicznego punktu widzenia oraz wnosi nową wiedzę, szczególnie w zakresie nie tylko słabo poznanych rezerwuarów zwierząt wolno żyjących ale przede wszystkim tła i mechanizmów szerzenia się zjawiska lekooporności wśród drobnoustrojów.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Rozprawa doktorska stanowi cykl powiązanych tematycznie prac, składający się z czterech publikacji, w tym jednej przeglądowej oraz trzech eksperymentalnych. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych na liście Journal Citation Reports:

1. Magdalena Skarżyńska, Magdalena Zając, Dariusz Wasyl: „Antybiotyki i bakterie: mechanizmy działania i strategie oporności” *Postępy Mikrobiologii*, 2020, 59, 1, 49–62; DOI: 10.21307/PM-2020.59.1.005.
2. Magdalena Skarżyńska, Magdalena Zając, Ewelina Kamińska, Arkadiusz Bomba, Jacek Żmudzki, Artur Jabłoński, Dariusz Wasyl: „Salmonella and Antimicrobial Resistance in Wild Rodents –True or False Threat?” *Pathogens* 2020, 9, 771; DOI: 10.3390/pathogens9090771
3. Magdalena Skarżyńska, Magdalena Zając, Arkadiusz Bomba, Łukasz Bocian, Wojciech Kozdruń, Marcin Polak, Jarosław Wiącek, Dariusz Wasyl: „Antimicrobial resistance glides in the sky – free-living birds as a reservoir of resistant *Escherichia coli* with zoonotic potential” *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12:656223 DOI: 10.3389/fmicb.2021.656223
4. Magdalena Skarżyńska, Pimlapas Leekitcharoenphon, Rene S. Hendriksen, Frank M. Aarestrup, Dariusz Wasyl: “A metagenomic glimpse into the gut of wild and



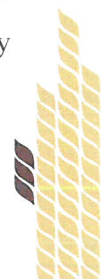
domestic animals: Quantification of antimicrobial resistance and more” PLoS ONE, 2020, 15(12): e0242987

Summaryczne wartości naukometryczne wynoszą: IF =13,743 oraz liczba punktów MEiN=320. We wszystkich pracach Pani mgr M. Skarżyńska jest pierwszym a zarazem korespondencyjnym autorem, natomiast Jej wiodący udział w powstawaniu niniejszych publikacji został potwierdzony zarówno imiennymi oświadczeniami pozostałych współautorów jak i treścią informacji zawartej w sekcji „Wkład autorów”, zamieszczanej obecnie przez każde czasopismo w publikacjach drukowanych przez wydawnictwa o wysokich standardach wydawniczych.

Rozprawa doktorska liczy 145 stron, w tym 71 stron obejmują wydruki prac wchodzących w skład cyklu oraz materiały dodatkowe. Pozostała część rozprawy została podzielona na osiem głównych rozdziałów zatytułowanych w kolejności jako: wstęp (13 stron), uzasadnienie podjęcia badań (2 strony), materiał i metody (2 strony) z odwołaniem do treści szczegółowych zawartych w publikacjach, główne wyniki badań (10 stron) dyskusja (9 stron), podsumowana pięcioma wnioskami, oraz piśmiennictwo obejmujące ponad kilkaset najistotniejszych dla tematyki pozycji literaturowych. Praca została również opatrzona streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim. Doktorantka załączyła także wykaz publikacji oraz skrótów, którymi posługiwała się w niniejszej pracy.

Ocena szczegółowa

Praca została zatytułowana „Antybiotykooporność bakteryjnej flory jelitowej wybranych gatunków zwierząt” wskazując na bardzo holistyczne podejście do zagadnienia i faktycznie oddając treść przedstawionej pracy. Niemniej w ostatnich latach pojawiła się nowa koncepcja związana z analizami dotyczącymi nie tylko obecności drobnoustrojów ale również ich materiału genetycznego, różnego rodzaju metabolitów, ich wzajemnych oddziaływań oraz oddziaływań środowisko-bakteria. Dlatego pojawiła się również nowa nomenklatura związana z pojęciem mikrobiomu, a nawet bardziej ukierunkowanych analiz, tj. wiromu, bakteriomu czy mykobiomu. Zwykle pojęcie mikrobiomu obejmuje mikrobiotę czyli „społeczność” mikroorganizmów zasiedlających dane środowisko (tj. mikrobiota jelit, jamy ustnej itp.) oraz ogromne spektrum cząsteczek wytwarzanych przez mikroorganizmy, tj. elementy strukturalne oraz różnego rodzaju metabolity, co definiuje również zewnątrzkomórkowe DNA i ruchome elementy genetyczne. Dlatego patrząc na charakter i zakres badań prezentowanych przez Doktorantkę, być może lepszym rozwiązaniem byłoby



użycie w tytule szerszego pojęcia „mikrobiomu” obejmującego analizę mikrobioty w pracach eksperymentalnych nr 2 i 3 oraz analiz metagenomowych czyli zbioru genów i genomów mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobioty, zaprezentowanych w pracy nr 4. Użycie w tytule przez Doktorantkę słowa „mikroflora” prawdopodobnie wynika z faktu, iż tytuł pracy był proponowany już w 2017 roku, natomiast należy podkreślić, iż w treści rozprawy Pani mgr Magdalena Skarżyńska posługuje się aktualną nomenklaturą (z niewielkimi wyjątkami stosowania określenia „flora jelitowa”), zatem powyższa uwaga nie wpływa na ocenę pracy.

Wstęp został podzielony na siedem podrozdziałów, z których każdy w sposób wyczerpujący, a zarazem bardzo skondensowany przedstawia najważniejsze aspekty lekooporności drobnoustrojów, (a konkretnie bakterii) stopniowo wprowadzając czytelnika w tematykę, a jednocześnie dążąc konsekwentnie do uzasadnienia celu i znaczenia podjętych badań. We wstępie Doktorantka naświetliła ogólnoświatowe znaczenie zjawiska lekooporności, tło potencjalnych mechanizmów warunkujących powstawanie i istnienie zjawiska lekooporności związane pierwotnie z konkurencją pomiędzy drobnoustrojami zasiedlającymi daną niszę, znaczenie i zagrożenie związane z opornością nabytą, przenoszoną na drodze wymiany horyzontalnej (ang. HGT), czynniki środowiskowe promujące szerzenie się oporności wśród drobnoustrojów oraz znaczenie środowiska i przede wszystkim rola zwierząt, w tym zwierząt hodowlanych i wolno żyjących w tym procesie, wskazując na zasadność koncepcji „Jedno Zdrowie”. W ostatnim podrozdziale Pani mgr Magdalena Skarżyńska opisała najistotniejsze metody oceny lekooporności w kontekście ich przydatności oraz interpretacji wyników. Zatem wstęp obejmuje wszystkie najważniejsze informacje niezbędne do zrozumienia, analizy i znaczenia badań przeprowadzonych przez Doktorantkę. W końcowym uzasadnieniu Doktorantka wskazuje na dwa istotne elementy: poznanie roli różnych gatunków zwierząt jako potencjalnych wektorów lub rezerwarów drobnoustrojów mających udział w dynamice zjawiska narastającej lekooporności; po drugie: zastosowanie do tego celu zróżnicowanych metod badawczych, umożliwiających nie tylko jakościową i ilościową analizę takich drobnoustrojów ale również ocenę najistotniejszych mechanizmów genetycznych mających udział w tym zjawisku.

Jedynym elementem, którego według mnie zabrakło we wstępie i uzasadnieniu, było zbyt mało uwagi poświęconej na uzasadnienie badanej grupy bakterii, wśród których



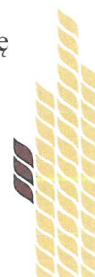
niezaprzeczalny prym w badaniach Doktorantki wiódł gatunek *Escherichia coli*. Szczepy *E. coli* odporne na III i wyższą generację cefalosporyn oraz karbapenemy należą do grupy drobnoustrojów krytycznych, które Światowa Organizacja Zdrowia definiuje jako szczególne zagrożenie w zakażeniach szpitalnych. Należą do nich *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* (w tym *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* i *Proteus*). Bakterie te powodują ciężkie i często śmiertelne infekcje związane z brakiem możliwości terapeutycznych. Ponadto bardzo wysoki odsetek oporności na różne substancje przeciwdrobnoustrojowe, w tym chinolony i kolistynę, uzasadnia uwzględnienie tego gatunku w urzędowym monitoringu drobnoustrojów odzwierzęcych, dlatego szkoda, że we wstępie nie znalazł się również podrozdział przedstawiający istotne znaczenie tego drobnoustroju w badaniach nad lekoopornością.

Doktorantka wskazała dwa główne cele pracy, dość jasno sprecyzowane, niemniej proponuję w trzecim podpunkcie pierwszego celu doprecyzować:

- ilościową ocenę skali występowania genów oporności na substancje przeciwbakteryjne w **mikrobiomie** różnych gatunków zwierząt

Warto podkreślić, iż Doktorantka założyła przeprowadzenie analizy z uwzględnieniem szerszego niż zazwyczaj podejścia metodycznego, biorąc pod uwagę również tło genetyczne (tj. analiza możliwości powiązań międzygenetycznych w aspekcie wielogenowych transmisji genów oporności) oraz potencjalny wpływ diety na skład rezystomu jelitowego różnych gatunków zwierząt.

Część eksperymentalna została dobrze zaprojektowana i jasno przedstawiona. Rozdział „Materiał i metody” naświetla schematyczny plan badawczy oraz wykorzystane w poszczególnych pracach metody, a także przedstawia pulę wykorzystanych w poszczególnych badaniach próbek, z uwzględnieniem źródła pochodzenia (gatunki zwierząt). Analizując ten rozdział w poszczególnych pracach eksperymentalnych należy podkreślić reprezentatywną liczebność badanych próbek, gwarantującą wiarygodność uzyskanych wyników. Wartym zauważenia jest również fakt, iż w dwu pierwszych pracach Doktorantka podeszła konwencjonalnie do zastosowanej metodyki, w pierwszym etapie analizując oporność fenotypową, a następnie uzupełniając go analizą molekularną genomów wyizolowanych szczepów, w ostatniej zaś wykorzystwała w badaniach analizę metagenomu, nie ograniczając się tylko do szczepów uzyskanych w wyniku badań hodowlanych. Taki rodzaj metodyki daje znacznie szerszy kontekst badawczy i pozwala na realną ocenę



znaczenia poszczególnych gatunków zwierząt jako potencjalnych rezerwuarów lekoopornych drobnoustrojów.

Doktorantka przyjęła również bardzo czytelną formę prezentacji wyników uzyskanych w każdej z prac eksperymentalnych, omawiając je następnie w zbiorczej dyskusji, która stanowiła dobre podsumowanie i konfrontację z dotychczas znanymi wynikami dotyczącymi omawianego zakresu badawczego.

Za najistotniejsze w rozprawie doktorskiej należy uznać następujące obserwacje:

- określenie znaczenia badanych grup zwierząt w aspekcie wektorów wielolekoopornych, a zarazem istotnych epidemiologicznie szczepów *E.coli*. Doktorantka w oparciu o reprezentatywne grupy badawcze wykazała niewielkie znaczenie grupy gryzoni jako gospodarzy szczepów wielolekoopornych, natomiast w przypadku populacji (zróżnicowanej pod względem gatunkowym) ptaków wolno żyjących, odsetek występowania opornych szczepów *E.coli* był znacznie wyższy, co potwierdziła również na poziomie genomu. Dodatkowo, w przypadku drugiej badanej grupy zwierząt mgr M. Skarżyńska wykazała, iż badane szczepy należą do typów sekwencyjnych, istotnych pod względem epidemiologicznym, po raz kolejny potwierdzając, iż populacje ptaków wolno żyjących, szczególnie gatunków o dużym potencjale migracyjnym mogą stanowić nie tylko rezerwuar takich szczepów ale również istotny element promujący rozprzestrzenianie się wielolekoopornych szczepów o dużym potencjale zoonotycznym.

- bardzo ważnym aspektem badawczym, który podjęła Doktorantka była próba oceny wpływu czynników niezależnych od bakterii, tj. wieku gospodarza czy typu diety danego gatunku. Doktorantka wskazała, iż długość życia zwierzęcia sprzyja większej kolonizacji przez bakterie, w tym wielolekooporne. Obserwacja ta zdaje się również potwierdzać w przypadku różnych innych gatunków zwierząt wolno żyjących, np. nietoperzy, które należą do gatunków długowiecznych. Drugą zmienną którą pod uwagę wzięła Doktorantka był typ diety określony na podstawie badań genomowych. W tym przypadku Doktorantka również słusznie wskazała, iż zwierzęta drapieżne (do których należą np. lisy rude), ze względu na najszerszy zakres i zmienność diety, będą kumulować wielolekooporne drobnoustroje zasiedlające gatunki stanowiące ich pożywienie, przez co odsetek szczepów opornych będzie nieporównywalnie wyższy niż w przypadku wolno żyjących zwierząt roślinożernych. Pani mgr M. Skarżyńska jako jeszcze jeden dodatkowy czynnik zwiększający udział rezystomu w mikrobiomie zwierząt wolno żyjących wskazuje również wzrastający stopień



synantropizacji niektórych gatunków zwierząt (m. in. lisa rudego i dzika). Zwierzęta te, co raz częściej stanowią element miejskiego krajobrazu w związku z łatwiejszym dostępem do pożywienia, zatem stwierdzenie to jest jak najbardziej uzasadnione.

- ukierunkowanie analizy na fenotypy/genotypy *E.coli* stanowiące najistotniejsze zagrożenie dla zdrowia publicznego. Analizując próbki badawcze bez względu na zastosowaną metodę Doktorantka poszukiwała przede wszystkim szczepów opornych na cefalosporyny, karbapenemy, chinolony i kolistynę oraz genów odpowiedzialnych za nabyty typ oporności na te i inne leki. Jednoczesna analiza fenotypu i genotypu pod względem oporności pozwoliła na dość ciekawe obserwacje. O ile nie pojawiło się zaskoczenie w przypadku braku oporności na karbapenemy oraz niewielki odsetek szczepów – producentów β -laktamaz o poszerzonym spektrum substratowym, o tyle dość interesujący wynik badawczy stanowi rozbieżność pomiędzy fenotypową i genotypową opornością na kolistynę, szczególnie u wolno żyjących gryzoni. Brak potwierdzenia występowania znanych, genetycznych mechanizmów oporności na ten lek mimo oporności fenotypowej wskazuje, że bakterie w dalszym ciągu doskonały się ewolucyjnie wykształcając kolejne możliwości adaptacyjne. W tym przypadku szczególną pulą badawczą wydaje się właśnie mikrobiota zwierząt wolnożyjących, u których pomimo braku bezpośredniej presji selekcyjnej (leczenie antybiotykami) może częściej pojawiać się stres związany z czynnikami środowiskowymi i generować różne, nieznanne dotąd mechanizmy obronne. Z podobną sytuacją spotkałam się również w badaniach własnych odnośnie lekowrażliwości szczepów *E.coli* na kolistynę pochodzących od lisa rudego. Mimo fenotypowej oporności na ten antybiotyk o wartości $\geq 2\mu\text{g/ml}$, nie została ona potwierdzona obecnością żadnego, znanego genetycznego mechanizmu oporności. Podobnym przykładem obrazującym tego typu zjawisko jest częsta oporność na rifampicynę wśród szczepów *Enterococcus* izolowanych od zwierząt wolno żyjących, występująca pomimo braku ekspozycji na ten antybiotyk. Zatem jak najbardziej uzasadnionym wydaje się kontynuacja badań w tym zakresie.

-racjonalna ocena obu typów zastosowanych metod (molekularnej i hodowlanej) w kontekście ich wad i zalet. Wiadomym jest, iż metody hodowlane (fenotypowe) zawsze częściej będą stosowane w przypadku klasycznej diagnostyki, mającej na celu potwierdzenie bądź wykluczenie sukcesu terapeutycznego, ponieważ zazwyczaj w centrum zainteresowania takich badań znajduje się realna ocena możliwości zastosowania danego antybiotyku/chemioterapeutyku do celów leczniczych. Natomiast w przypadku metod



genetycznych możliwe jest nie tylko potwierdzenie oporności fenotypowej ale również wykazanie potencjalnych mechanizmów genetycznych, w tym mutacji które mogą lecz nie muszą przekładać się na ekspresję, ocena tła genetycznego związanego z predyspozycją do horyzontalnej wymiany genów (obecność sekwencji plazmidowych lub fagowych), a także możliwość przekazywania wielogenowych sekwencji, co niesie ze sobą znacznie bardziej rozbudowany zakres oporności. Taki rodzaj badań pomimo swoich ograniczeń z pewnością daje znacznie szerszą perspektywę w kontekście oceny tła powstawania i szerzenia się oporności.

W mojej ocenie Doktorantce udało się uzyskać bardzo wiele cennych obserwacji, które będą istotne w dalszych badaniach nad mechanizmami oporności, szczególnie wśród drobnoustrojów izolowanych od zwierząt wolno żyjących, które z jednej strony są znacznie bardziej zróżnicowane pod względem genetycznym jeśli chodzi o przystosowanie do warunków środowiskowych, a z drugiej niestety cechują się w większości przypadków takimi samymi mechanizmami oporności jak szczepy izolowane od człowieka i zwierząt hodowlanych lub towarzyszących. Zatem z pewnością, co słusznie zauważyła Pani mgr M. Skarżyńska należałoby rozważyć wytypowanie wśród zwierząt wolno żyjących gatunku wskaźnikowego, w oparciu o który można by było monitorować stopień kontaminacji środowiska naturalnego środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Jest to szczególnie warte podkreślenia, w kontekście wyników badań z ostatnich lat, które wskazują, na relatywnie duży udział wielolekoopornych gatunków bakterii w mikrobiocie zwierząt niepoddawanych celowanej terapii. Być może wyniki tych badań będą miały wpływ również na wyznaczenie nowych trendów badań przesiewowych.

Opracowanie zostało podsumowane pięcioma trafnymi wnioskami, które odzwierciedlają wyniki uzyskanych badań. Muszę odnieść się z dużym uznaniem do bardzo ostrożnego i wyważonego sformułowania wniosków. Pomimo szerokiego panelu badań, we wnioskach zostały zawarte tylko i wyłącznie istotne i potwierdzone obserwacje, które stanowią doskonały punkt wyjściowy do planów dalszych badań przedstawionych w ostatnim rozdziale dysertacji.

Na zakończenie chciałabym również odnieść się do charakteru publikacji nr 1. Pomimo, iż jedna z publikacji wchodzących w skład cyklu nie jest pracą eksperymentalną tylko przeglądową, stanowi ona jasne i czytelne uzupełnienie informacji dotyczących najczęściej występujących obecnie mechanizmów oporności i strategii obronnych generowanych przez



bakterie. W mojej opinii, dołączając powyższą pracę Doktorantka uniknęła nadmiernego rozbudowywania wstępu, ponieważ w niniejszej pracy zostały opisane wszystkie wspomniane przez Nią w pracach eksperymentalnych mechanizmy i zjawiska dotyczące poszczególnych typów oporności. Z jednej strony stanowi to bardzo dobre rozwiązanie, ułatwiające śledzenie kontekstów prac, z drugiej zaś potwierdza umiejętność krytycznej analizy dostępnej literatury przez Doktorantkę.

W związku z powyższym jednoznacznie stwierdzam, iż recenzowana przez mnie rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Skarżyńskiej pt. „*Antybiotykooporność bakteryjnej flory jelitowej wybranych gatunków zwierząt*”, odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 1 lipca z 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn zm) i przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Skarżyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysokie walory naukowe i poznawcze rozprawy, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Uzasadnienie: przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi oryginalną i przemyślaną analizę zjawiska lekooporności, ze szczególnym uwzględnieniem *E. coli*- drobnoustroju wskaźnikowego, stanowiącego jeden z głównych gatunków uwzględnionych w urzędowych badaniach przesiewowych oporności odzwierzęcych czynników chorobotwórczych i bakterii komensalnych na substancje przeciwbakteryjne. Warty podkreślenia jest przede wszystkim analiza drobnoustrojów izolowanych od zwierząt wolno żyjących, które stanowią jeden z istotnych elementów koncepcji „Jedno Zdrowie”. Przedstawienie potencjalnych mechanizmów i sposobów generowania lekooporności wśród tych bakterii stanowi bardzo cenne uzupełnienie wiedzy w zakresie wzajemnych powiązań i oddziaływań, które mogą determinować obecny, bardzo wysoki poziom niepowodzeń terapeutycznych również przy leczeniu infekcji szpitalnych u ludzi. Bez względu na źródło pochodzenia szczepu (człowiek, zwierzę, środowisko), Doktorantka udowodniła, że zarówno genetyczne czynniki oporności jak i kompleksy klonalne (typy sekwencyjne) mogą być identyczne w obrębie określonego gatunku bakterii, zatem wielolekooporne szczepy izolowane np. od zwierząt wolno żyjących, stanowią takie samo zagrożenie dla zdrowia publicznego jak typowe szczepy szpitalne.

Aneta Nowalica

