

Olsztyn 03.06.2022 r.

dr hab. Agata Bancierz-Kisiel, prof. uczelni

Katedra Epizootiologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Marceliny Anny Osińskiej** pt. „**Występowanie, charakterystyka molekularna i fenotypowa wielolekoopornych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących**”, wykonanej pod kierunkiem promotora – prof. dr hab. Anety Nowakiewicz, w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej, Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Lublinie.

Podstawa formalna

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 31 marca 2022 roku.

Oryginalność, aktualność i przydatność podjętego problemu naukowego

Doktorantka podjęła się badań mających na celu określenie występowania wielolekoopornych szczepów *Escherichia (E.) coli* u zwierząt wolno żyjących, a następnie ich charakterystykę molekularną i fenotypową. W literaturze krajowej i zagranicznej dostępnych jest wiele prac dotyczących oporności szczepów *E. coli* na powszechnie stosowane w weterynarii środki przeciwdrobnoustrojowe. Najlepiej poznaną grupą, od której izoluje się takie szczepy, są zwierzęta gospodarskie, objęte obligatoryjnymi monitoringami. Badań nad lekoopornością szczepów *E. coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących jest niewiele, a z założenia zwierzęta te zdecydowanie rzadziej powinny być nosicielami szczepów opornych na leki (jako nie poddawane terapii celowanej), odwzorowując tym samym poziom lekooporności występujący w środowisku. Do grupy zwierząt wolno żyjących zaliczamy również wiele gatunków o wysokim potencjale synantropijnym. Lis rudy, kuna domowa czy norka coraz częściej

podchodzą do gospodarstw i siedzib człowieka celem znalezienia łatwo dostępnych źródeł pożywienia. W ten sposób przyczyniają się do przenoszenia mikroorganizmów opornych na leki na inne zwierzęta, na człowieka, sprzyjają również ich rozprzestrzenieniu w środowisku. W Polsce dane dotyczące występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u szczepów *E. coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących są znikome, co wynika najprawdopodobniej z trudności w dostępie do materiału badawczego. Podjęte badania uważam zatem za ważne i w pełni uzasadnione.

Ocena formalna

Przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr inż. Marceliny Anny Osińskiej jest jednotematyczny cykl 3 artykułów naukowych:

- 1) Wildlife carnivorous mammals as a specific mirror of environmental contamination with multidrug-resistant *Escherichia coli* strains in Poland. Marcelina Osińska, Aneta Nowakiewicz, Przemysław Zięba, Sebastian Gnat, Dominik Łagowski, Aleksandra Trościańczyk. *Microb Drug Resist* 2020, 26, 9, s. 1120-1131. Punkty MEiN: 70,00. Impact factor: 3,431
- 2) Wildlife omnivores and herbivores as a significant vehicle of multidrug-resistant and pathogenic *Escherichia coli* strains in environment. Marcelina Osińska, Aneta Nowakiewicz, Przemysław Zięba, Sebastian Gnat, Dominik Łagowski. *Environ. Microbiol. Rep.* 2020, 12, 6, s. 712-717. Punkty MEiN: 100,00. Impact factor: 3,541
- 3) A rich mosaic of resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from red foxes (*Vulpes vulpes*) in Poland as a potential effect of increasing synanthropization. Marcelina Osińska; Aneta Nowakiewicz, Przemysław Zięba; Sebastian Gnat; Dominik Łagowski; Aleksandra Trościańczyk, *Sci. Total Environ.* 2022, 818, 151834. Punkty MEiN: 200,00. Impact factor: 7.963.

Sumaryczny IF prac wynosi 14,935, a punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki 370 punktów. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich 3 publikacjach. Do pracy dołączone zostały oświadczenia współautorów, z których wynika, że Jej udział w powstaniu poszczególnych artykułów był pierwszoplanowy (75%-80%), a rola wiodąca. Z obowiązku recenzenta zmuszona jestem wskazać na pewne rozbieżności między oświadczeniami współautorów 3

pracy, a informacjami na temat roli każdego ze współautorów, zawartymi w samym artykule. Mniemam, że wynika to z rozdrobnienia funkcji, jakie należy zaznaczyć dla każdego współautora podczas procesu zamieszczania artykułu na platformie wydawniczej. Badania były częściowo finansowane ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznanych na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców, numer grantu: WKD/MN-1/19.

Ocena merytoryczna

Trzy artykuły wchodzące w skład pracy doktorskiej przygotowano w sposób charakterystyczny dla tego rodzaju opracowań naukowych. Po złożeniu do czasopism artykuły te zostały poddane merytorycznej ocenie przez kompetentnych specjalistów. Rolą recenzenta rozprawy doktorskiej jest zatem ocena spójności tematycznej cyklu publikacji i ich wspólna ocena merytoryczna.

W rozdziale „Wstęp” Doktorantka zaznajamia czytelnika ze specyfiką *E. coli*, charakteryzując wybrane patotypy i przybliżając zjawisko lekooporności szczepów należących do tego gatunku. W mojej ocenie jest to dobra analiza zgromadzonego piśmiennictwa, wstęp napisany jest w sposób jasny i zwięzły, stanowi dobrą podbudowę dla przedmiotu badań, uzasadniając jednocześnie potrzebę ich przeprowadzenia. W tej części pracy mgr inż. Marcelina Anna Osińska nie ustrzegła się jednak pewnych błędów edytorsko-redakcyjnych, które z obowiązku recenzenta zmuszona jestem wymienić. „*Escherichia coli*” powinna być pisana pełną nazwą tylko przy pierwszym użyciu, a następnie określana skrótem, a pełna nazwa zamiast skrótu pojawia się na str. 5 Streszczenia, str. 8 Streszczenia w języku angielskim oraz na stronach 10, 13 i 14 tekstu głównego. W przypadku wielu skrótów (np. PAI, UPEC, PMQR, ADSRRS) brakuje ich objaśnienia poprzez przytoczenie pełnej nazwy angielskiej, powinny być one opisane tak jak skrót PCR na str. 22. Na str. 11 brakuje także rozwinięcia skrótów określających toksyny LT, STa i STb szczepów enterotoksycznych *E. coli*. Należałoby również doprecyzować, że w przypadku toksyny LT i powodowanego przez nią wzrostu stężenia cAMP, do światła jelita nadmiernie wydzielane są woda i jony chlorkowe, natomiast absorpcja jonów sodowych ze światła jelita jest zahamowana. Przy charakterystyce szczepów shigatoksycznych *E. coli* (str. 12) Doktorantka nie wspomniała o roli, jaką produkowana przez nie Shiga-like toxin odgrywa we wzroście przepuszczalności naczyń krwionośnych i indukcji choroby obrzękowej u świń. W związku z tym, że szczepy są policzalne, to stosujemy w stosunku do nich wyrażenie „liczba” zamiast „ilość” (str. 16).

Następnie Doktorantka przedstawia uzasadnienie przeprowadzonych badań i cele pracy. Ostatni akapit uzasadnienia jest moim zdaniem niepotrzebny, bardziej pasuje do opisu materiału do badań. Dokonałabym także małej korekty stylistycznej celów nr 1 i 5, tak aby brzmiały:

1. Określenie poziomu występowania lekoopornych szczepów *E. coli* u różnych gatunków zwierząt wolno żyjących w aspekcie porównawczym.
5. Analiza epidemiologiczna szczepów stanowiących największe zagrożenie zdrowia publicznego, tj. opornych na cefalosporyny III generacji i fluorochinolony, w odniesieniu do ogólnodostępnych baz danych.

Wybór metod i technik badawczych, jak również sposób ich zastosowania jest odpowiedni do tego typu badań i uzyskania wiarygodnych wyników. Rozdział „Materiały i metody” został opisany prawidłowo. Brakuje jedynie informacji co było materiałem wyjściowym do izolacji DNA – pojedyncza kolonia? W Tabeli 1 użyłabym także sformułowania „temperatura przyłączania starterów” zamiast „Temp. annealingu”, tym bardziej, że pozostałe nazwy nie mają charakteru anglicyzmów. Nie bardzo również rozumiem, dlaczego w analizie genów wirulencji nie zastosowano w stosunku do szczepów enterotoksycznych starterów dla genu kodującego produkcję enterotoksyny LT, a poszukiwano jedynie genów kodujących produkcję enterotoksyn STa i STb, skoro STa częściej charakteryzuje szczepy izolowane od ludzi, na co wskazywała wcześniej sama Autorka.

Rozdział „Wyniki” posiada strukturę nie do końca korelującą z opisywanymi w poprzednim rozdziale metodami, ale jest czytelny. Na uwagę zasługuje przede wszystkim fakt izolacji od zwierząt towarzyszących dużej liczby bardzo zróżnicowanych szczepów *E. coli*, w tym szczepów wielolekoopornych. Bardzo ciekawe w kontekście wyników badań molekularnych jest zjawisko braku genów warunkujących oporność na daną grupę antybiotyków, przy jednoczesnej lekooporności fenotypowej. Z obowiązku recenzenta zmuszona jestem zauważyć brak wyjaśnienia skrótów użytych w Rycinie 2.

Rezultaty badań własnych zostały omówione i skonfrontowane z wynikami innych autorów w bardzo obszernym objętościowo rozdziale „Dyskusja”. Mgr inż. Marcelina Anna Osińska umiejętnie zinterpretowała uzyskane wyniki. Na uwagę zasługuje bardzo dobre przygotowanie merytoryczne i zaznajomienie z obszerną literaturą, dzięki czemu Doktorantka fachowo konfrontuje wyniki własne z wynikami innych badaczy. Rozdział ten napisany jest ciekawie i

płynnie przechodzi z jednego analizowanego aspektu w kolejny. Nieliczne błędy stylistyczne i interpunkcyjne nie odwracają uwagi od omawianych zagadnień. Nieco niejasny jest fragment kończący str. 42, a zaczynający się od wyrażenia „W przypadku zwierząt drapieżnych...” oraz fragment str. 50 rozpoczynający się od słów „Dominacja genów *gmrS*...”.

Przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie 8 szczegółowych wniosków, które zostały dobrze sformułowane i mają pokrycie w uzyskanych wynikach. Jedynie wniosek nr 4 pozostaje w kontrze ze stwierdzeniem ze str. 53 „Wysoki odsetek występowania szczepów wielolekoopornych i opornych na cefalosporyny III generacji u zwierząt wszystkożernych i mięsożernych, odnotowany w moich pracach wskazuje, że gatunki wolno żyjących zwierząt **bez względu na rodzaj diety** czy zajmowaną niszę środowiskową są potwierdzonym ostatecznym ogniwem kumulującym w wysokim stopniu nie tylko odporne szczepy, ale również geny oporności, które są takie same jak te, które występują w szczepach izolowanych od człowieka czy zwierząt poddawanych terapii antybiotykowej.” Wniosek nr 6 wymaga dopracowania – dzięki zastosowaniu jakiej konkretnie metodyki możliwe jest uzyskanie kilku odrębnych izolatów? Mnie osobiście zabrakło jednego, bardzo ważnego wniosku, mówiącego o braku korelacji między genami warunkującymi lekooporność, a lekoopornością fenotypową u niektórych z badanych szczepów.

Opracowanie kończy się wykazem prac stanowiących rozprawę doktorską, które moim zdaniem równie dobrze mogłoby rozpoczynać całą rozprawę oraz wykazem blisko 130 pozycji dobrze dobranej piśmiennictwa.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, zarówno przedstawione do oceny opracowanie, jak i cykl artykułów stanowiących trzon rozprawy doktorskiej oceniam bardzo pozytywnie. Cykl jest spójny tematycznie i koncepcyjnie, a prezentowane wyniki cenne, o czym świadczy opublikowanie ich w wysoko punktowanych czasopismach o bardzo dużym współczynniku wpływu. Należy podkreślić, że większość badanych gatunków zwierząt wolno żyjących poddawanych było ocenie lekooporności izolowanych od nich szczepów *E. coli* po raz pierwszym w Polsce, co uwiadcza nowatorski charakter przeprowadzonych badań. Zastosowana metodyka odpowiada standardom obowiązującym w tego typu oznaczeniach i nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka wykazała dobre opanowanie warsztatu badawczego i dużą sprawność w prowadzeniu badań oraz interpretacji wyników, które stanowią istotny i oryginalny wkład do

dotychczasowej wiedzy na temat występowania i charakterystyki wielolekoopornych szczepów *E. coli* izolowanych od różnych gatunków zwierząt wolno żyjących.

Stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Marceliny Anny Osińskiej pt. „Występowanie, charakterystyka molekularna i fenotypowa wielolekoopornych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących”, odpowiada wymogom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Przedkładam zatem Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marceliny Anny Osińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą, ze względu na jej bardzo wysoką wartość naukową.

dr hab. Agata Banczerz-Kisiel, prof. uczelni

