



Dr hab. Barbara Bażanów, prof. uczelni
Zakład Mikrobiologii
Katedra Patologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 25.05.2022

Recenzja

**rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marceliny Osińskiej
pt. "Występowanie, charakterystyka molekularna i fenotypowa
wielolekoopornych szczepów Escherichia coli izolowanych od
zwierząt wolnożyjących"**

*wykonana na prośbę Prof. dr hab. Marty Kankofer, Przewodniczącej Rady
Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wyrażoną w
piśmie z dnia 05 kwietnia 2022*



Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe jest złożonym, wieloczynnikowym procesem i jednocześnie jednym z najbardziej istotnych zagrożeń dla zdrowia publicznego na świecie, na który wpływają liczne i różnorodne czynniki. W wielu pracach wykazano związek przyczynowy tego zjawiska z coraz częstszym stosowaniem w medycynie weterynaryjnej antybiotyków do leczenia, zapobiegania chorobom oraz do stymulacji wzrostu jak również z ich nadużywaniem i niewłaściwym stosowaniem w terapii ludzi. Pojawienie się lekooporności bakterii u zwierząt hodowlanych od dawna budzi niepokój, gdyż patogeny te stanowią bezpośrednie i pośrednie zagrożenie dla zdrowia człowieka. Mogą być one przenoszone bezpośrednio ze zwierząt na ludzi i mogą rozprzestrzeniać się do gleby, żywności i wód gruntowych np. poprzez stosowanie obornika na polach uprawnych.

Escherichia coli uznawana jest za mikroorganizm wskaźnikowy dla określenia poziomu występowania drobnoustrojów lekoopornych, z uwagi na jej powszechne występowanie, zajmowanie tej samej niszy co inne patogeny jelitowe i możliwość przenoszenia tą samą drogą. Bakteria ta przyczynia się do rozprzestrzeniania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, gdyż stanowi główny rezerwuwar warunkujących ją genów. Z powyższych względów *E. coli* jest powszechnie stosowana jako biomarker do monitorowania presji selekcyjnej spowodowanej stosowaniem antybiotyków w gospodarstwach hodowlanych i/lub w szpitalach oraz problemów ze spodziewaną lekoopornością ze strony patogenów. Jednakże, mimo szeroko zakrojonych, prowadzonych na całym świecie prac dotyczących tej tematyki, badania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u zwierząt dziko żyjących są, jak dotąd, niewystarczająco udokumentowane, co częściowo wynika z małej dostępności materiału badawczego.

Obecność bakterii będących nosicielami genów antybiooporności u dzikich zwierząt świadczy o tym, że odporne bakterie pochodzące od ludzi lub zwierząt gospodarskich są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Stanowi to zagrożenie dla zdrowia publicznego, ponieważ dzikie zwierzęta mogą być ważnym rezerwuarem oporności na antybiotyki i ogniwem epidemiologicznym pomiędzy człowiekiem, zwierzętami gospodarskimi i



środowiskiem naturalnym. Dlatego też wskazane jest stałe monitorowanie występowania takich bakterii u dzikich zwierząt i ewentualna ocena roli tychże zwierząt jako źródeł i wektorów.

Biorąc pod uwagę aktualność i niszowy charakter problemu, należy uznać temat rozprawy doktorskiej za uzasadniony, a podjęte zadania badawcze za celowe.

Recenzowana praca doktorska obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, wyniki badań i ich omówienie. Ponadto dołączone są kopie trzech opublikowanych w czasopismach indeksowanych w Journal Citation Reports artykułów, stanowiących jednotematyczny cykl:

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 KBN/MNiSW: 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 MNiE/MNiSW: 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 MNiE/MEiN: 200,00. Impact factor: 7.963)



Artykuły te zostały opublikowane na przestrzeni ostatnich trzech lat, w okresie 2020-2022. Łączny IF tych pozycji wynosi 14,935, a punktacja MNIe/MEiN 370. We wszystkich publikacjach Pani mgr inż. M. Osińska jest pierwszym autorem, a jej udział procentowy w przygotowaniu publikacji wynosi 75% w pierwszym i 80% w drugim i trzecim artykule. Zakres prac przeprowadzonych przez Doktorantkę polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu analiz badawczych zawartych w części metodycznej pracy, wizualizacji i dokumentacji wyników i bankowaniu szczepów, udziale w analizie i interpretacji wyników, gromadzeniu literatury i przygotowaniu manuskryptu.

Wytyczone przez Doktorantkę cele, opisane w wyżej wymienionych pracach były bardzo ambitne i obejmowały wielowątkowo zagadnienia związane z lekoopornością. Należały do nich:

1. Określenie poziomu występowania w aspekcie porównawczym lekoopornych szczepów *E. coli* u różnych gatunków zwierząt wolno żyjących.
2. Charakterystyka fenotypowych profili oporności i określenie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko wśród badanych izolatów, ze szczególnym uwzględnieniem typów oporności stanowiących potencjalne zagrożenie zdrowia publicznego.
3. Określenie występowania genetycznych markerów wirulencji determinujących przypuszczalny potencjał zoonotyczny z jednoczesną analizą korelacji pomiędzy opornością a wirulencją.
4. Charakterystyka i ocena podobieństwa genomowego szczepów w aspekcie zróżnicowania szczepów występujących u tego samego osobnika oraz potencjalnych możliwości rozprzestrzeniania się tych samych klonów pomiędzy różnymi osobnikami tego samego gatunku, a nawet wśród różnych gatunków.



5. Analiza epidemiologiczna w odniesieniu do ogólnodostępnych baz danych, szczepów stanowiących największe zagrożenie zdrowia publicznego, tj. opornych na cefalosporyny III generacji i fluorochinolony .

Dzięki realizacji założonych celów, Autorce udało się wyciągnąć logiczne wnioski. Zaawansowane metody badawcze pozwoliły Jej na uzyskanie kilku odrębnych izolatów *E. coli* od tego samego zwierzęcia, co wyraźnie potwierdziło ogromne zróżnicowanie profili oporności szczepów zasiedlających przewód pokarmowy pojedynczych osobników i pozwoliło na skuteczną eliminację szczepów zduplikowanych uzyskanych z pojedynczej badanej próby. Wyniki badań Doktorantki wpłynęły też na wysnucie konkluzji, że zwierzęta wolno żyjące są istotnym rezerwuarem wielolekoopornych szczepów *Escherichia coli* w środowisku, mimo iż szczepy lekooporne izolowane z tej grupy zwierząt cechuje niski, 8% poziom współwystępowania genów wirulencji. Ponadto, jak zauważyła Pani mgr Osińska, obecność genów niosących oporność na poszerzone spektrum substratowe u szczepów *E. coli* koreluje z występowaniem genów PMQR odpowiedzialnych za oporność na fluorochinolony i przenoszonych na drodze wymiany horyzontalnej. Kolejną cenną obserwacją Doktorantki dotyczy badanych typów sekwencyjnych, które okazały się są tożsame z typami sekwencyjnymi występującymi u człowieka, zwierząt towarzyszących i gospodarskich.

Ponieważ stanowiące podstawę pracy artykuły zostały już opublikowane, były one już recenzowane i oceniane pod kątem merytorycznym przez stosowne wydawnictwa, a o ich poziomie świadczy renoma czasopism i wysoki wskaźnik Impact Factor.



Jedynie zastrzeżenia dotyczące opracowania dysertacji, które nasuwają się po lekturze pracy, dotyczą niezbyt fortunnego nazewnictwa grup badawczych. Zamiast „grupa zwierząt mięsożernych, wszystko- i roślinożernych oraz szczepy cefalosporynooporne” proponuję:

1. Szczepy *E. coli* izolowane od zwierząt mięsożernych
2. Szczepy *E. coli* izolowane od zwierząt wszystko- i roślinożernych
3. Szczepy *E. coli* cefalosporynooporne.

Podział zastosowany przez Autorkę sugeruje np., że genów oporności na antybiotyki szukano u zwierząt (Tabela 4). Jest to jednak niewątpliwie skrót myślowy, który w żadnym wypadku nie wpływa na wartość pracy.

Warto byłoby również przeredagować zdanie pojawiające się na str. 14 :

„Najnowsze badania analizujące poziom oporności szczepów *E. coli* wśród zwierząt gospodarskich w sześciu państwach europejskich również wskazują na wyższy udział izolatów opornych na fluorochinolony aniżeli w państwach z innych regionów świata na przykład Hiszpanii, Danii i Niemiec (Leekitcharoenphon i wsp., 2021).” Niewłaściwy szyk zdania, umiejscowił Hiszpanię, Danię i Niemcy poza Europą, ponadto Leekitcharoenphon te właśnie kraje zestawiał z innymi państwami.

Inne drobne błędy stanowią: niepełna nazwa łacińska gęsi gęgawy (*Anser anser*) i nieliczne literówki.

Powyższe uwagi mają głównie charakter redakcyjny i nie podważają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej.



Przedstawioną do oceny pracę doktorską oceniam pozytywnie. Rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami) i zawiera obszerny materiał stanowiący dużą wartość poznawczą. Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy, co więcej zaproponowała ulepszoną metodologię badań, która niewątpliwie może być wykorzystana na szerszą skalę. Ponadto Autorka wykazała się umiejętnością formułowania uzasadnionych i logicznych wniosków.

W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr Marceliny Osińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na duży wkład pracy Doktorantki, duże znaczenie naukowe tematu i sposób przedstawienia wyników wnioskuję również do Przewodniczącej oraz Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

dr hab. Barbara Bażanów, prof. uczelni