

Olsztyn, 28.04.2022 r.

prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj
Katedra Epizootologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

OCENA

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 prof. dr hab. Anety Nowakiewicz w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej,
Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu
Przyrodniczego w Lublinie.

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

Pałeczka okrężnicy, *Escherichia coli* (*E. coli*), jest bakterią wchodzącą w skład fizjologicznej flory jelitowej ludzi i zwierząt. Jednakże, istnieją też patogenne szczepy, które mogą wywoływać zakażenia o ciężkim przebiegu, zwykle dotyczące przewodu pokarmowego, ale również zakażenia pozajelitowe, w tym m. in. układu moczowego czy opon mózgowo-rdzeniowych. *E. coli* jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych oraz zakażeń, które często dotyczą ludzi z ciężkimi chorobami współistniejącymi.

Głównym orężem w walce z chorobami bakteryjnymi są antybiotyki, lecz drobnoustroje na drodze adaptacji wykształcają różnorodne mechanizmy obronne. Szybkie rozprzestrzenianie się genów lekooporności wśród chorobotwórczych szczepów bakterii ma wpływ na wzrost nieskuteczności leczenia zakażeń.

Pałeczki okrężnicy stanowią też marker zanieczyszczenia wody pitnej. Bakterie te są nie tylko dobrym wskaźnikiem stanu sanitarnego, ale odgrywają również rolę indykatora zużycia antybiotyków stosowanych m.in. w medycynie weterynaryjnej. Dowiedziono, że stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych u zwierząt przyczynia się do wzrostu występowania zakażeń u ludzi, jak też wzrostu liczby niepowodzeń w leczeniu i cięższych objawów klinicznych w przebiegu tych zakażeń.

Oporność wielolekowa u bakterii stanowi obecnie jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego na całym świecie. Nadzorowany przez WHO globalny system monitorowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, Global Antimicrobial Surveillance System (GLASS), potwierdza jak poważnym problemem na całym świecie stała się lekooporność. Ponadto zgromadzone dzięki GLASS wyniki badań wykazały, że *E. coli* to jeden z najczęściej wykrywanych gatunków bakterii, które wykształciły lekooporność.

Skażenie środowiska antybiotykami wzrasta w wyniku nieprawidłowego lub nadmiernego ich stosowania oraz problemów z ich utylizacją. Bakterie lekooporne mogą rozprzestrzeniać się i przenosić pomiędzy środowiskiem, zwierzętami a człowiekiem. Horyzontalny transfer genów między drobnoustrojami może zachodzić

również między gatunkami niespokrewnionymi ze sobą i obejmuje także drobnoustroje środowiskowe oraz komensaliczne. Dlatego też podjęcie przez mgr inż. Marcelinę Osińską badań nad oceną występowania *E. coli* wśród zwierząt wolno żyjących oraz ich charakterystykę dotyczącą chorobotwórczości i lekooporności uważam za w pełni uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór trzech publikacji poprzedzony opracowaniem opisującym przeprowadzone badania. Opracowanie to liczy 76 stron i składa się z 8 rozdziałów, takich jak Streszczenie, Summary, Wstęp, Uzasadnienie i cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i Piśmiennictwo.

Rozdziały „Streszczenie” i „Summary zawierają skrócone wersje rozprawy doktorskiej w językach polskim i angielskim.

We wstępie, zawierającym trzy podrozdziały, w tym jednym składającym się z czterech części, Doktorantka przedstawiła charakterystykę *E. coli* i patotypów badanego drobnoustroju z uwzględnieniem szczepów enteropatogennych (EPEC), enterotoksycznych (ETEC), shigatoksycznych (STEC) i powodujących zakażenia pozajelitowe (ExPEC). W podrozdziale zatytułowanym „Lkooporność *Escherichia coli*” mgr inż. Marcelina Osińska opisała narastający problem oporności tej bakterii na krytyczne środki przeciwdrobnoustrojowe.

W rozdziale „Uzasadnienie i cele pracy” Doktorantka w sposób trafny przedstawia argumenty wyboru zwierząt wolno żyjących jako materiału badawczego, który może stanowić wskaźnik realnego występowania lekoopornych *E. coli* w środowisku. W rozdziale tym bardzo szczegółowo zostały przedstawione cele pracy w formie 5 punktów:

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 ogólnosięwiatowych baz danych, szczepów stanowiących największe zagrożenie zdrowia publicznego, tj. opornych na cefalosporyny III generacji i fluorochinolony.

Kolejny rozdział zatytułowany „Materiał i metody” zawiera 3 podrozdziały: „Materiał biologiczny”, „Podstawa prawna prowadzonych badań” i „Metodyka”. Przedmiot badań stanowiły trzy grupy badawcze. Pierwsza zawierała wymazy z prostnicy od 53 wolno żyjących zwierząt mięsożernych, druga od 108 zwierząt wszystkożernych i roślinożernych. Podane zostały też liczby zwierząt poszczególnych gatunków, od których pobrano wymazy. Trzecią grupę badawczą stanowiły 42, wcześniej zgromadzone, oporne na cefatoksym izolaty *E. coli* pochodzące od różnych gatunków zwierząt wolno żyjących. Tu również Doktorantka podała liczbę zwierząt badanych, których było aż 399, chociaż w tym przypadku wydaje mi się, że istotniejsze byłoby podanie liczby

izolatów od poszczególnych gatunków zwierząt. Nasuwa się też pytanie, dlaczego, skoro pierwszą grupę badawczą stanowią zwierzęta mięsożerne, nie wyodrębniono osobnych grup zwierząt wszystkożernych i roślinożernych? Wyniki w grupie zwierząt wyłącznie roślinożernych mogłyby dać interesujący obraz krążenia szczepów lekoopornych w środowisku.

Podrozdział „Metodyka” zawiera opis izolacji szczepów *E. coli*, przebieg wstępnego określenia fenotypowych profili oporności z zastosowaniem metody dyfuzyjno krążkowej, sposoby określania fenotypowych profili oporności za pomocą metody mikrorozcieńczenia, analizę występowania genów oporności, analizę genów wirulencji, typowanie molekularne w oparciu o całkowite genomowe DNA z wykorzystaniem metody ADSRRS fingerprinting oraz typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów (MLST).

Rozdział „Materiał i metody” zawiera trzy tabele i dwa schematy. Tabele przedstawiają sekwencje użytych oligonukleotydów oraz warunki reakcji PCR (Tabela 1), sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji ADSRRS-fingerprinting (Tabela 2) i profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR ADSRRS-fingerprinting (Tabela 3). Schematy natomiast w jasny sposób przedstawiają etapy analizy materiału badawczego grupy 1 i 2 na pierwszym schemacie oraz grupy 3 na drugim. Niestety, nie znalazłam w tekście odnośników do tych tabel i schematów.

Szczegółowy opis metod badań, zwłaszcza interesujący sposób wstępnej selekcji lekoopornych izolatów, jak też metod określania ich profili fenotypowych i genomowych wskazuje na bardzo dobre opanowanie umiejętności „warsztatowych” Doktorantki. Na wysokie uznanie zasługuje też dobór technik wykorzystanych w realizacji pracy.

Rozdział „Wyniki” zawiera sześć podrozdziałów: „Izolacja i identyfikacja szczepów”, „Różnicowanie z wykorzystaniem techniki ADSRRS-fingerprinting”, „Określenie minimalnego stężenia hamującego”, „Występowanie genów oporności”, „Występowanie genów wirulencji” oraz „Analiza typów sekwencyjnych w oparciu o technikę MLST”. Szczegółowy opis uzyskanych rezultatów badań zaopatrzone dokumentacją graficzną w postaci dwóch rycin i jednej tabeli.

Spośród 161 próbek od zwierząt wolno żyjących z 57,8% wyizolowano lekooporne szczepy *E. coli*. Odsetek ten był wyższy w próbkach od zwierząt mięsożernych. Najczęściej stwierdzano oporność na ampicylinę, tetracyklinę i sulfametoksazol. Fenotyp wielolekooporny zaobserwowano u 123 (70,3%) izolatów. Technika ADSRRS-fingerprinting wykazało znaczne zróżnicowanie genomowe otrzymanych izolatów. Interesujące jest, że u wielu izolatów wykazujących fenotypowo oporność na tetracyklinę czy chloramfenikol nie wykryto żadnego z poszukiwanych genów odpowiedzialnych za oporność na te antybiotyki, podczas gdy u części z izolatów wykazano obecność kilku genów odpowiedzialnych za oporność na jeden lek. Analiza MLST natomiast wykazała 28 różnych typów sekwencyjnych, najczęściej przypisywanych do kompleksu klonalnego ST10. Szczególnie duże zróżnicowanie wykazano wśród szczepów pochodzących od lisów, gdzie wśród 37 szczepów oznaczono 26 typów sekwencyjnych.

Ciekawą częścią pracy jest liczący prawie 18 stron rozdział „Dyskusja”, który zawiera krytyczną analizę wyników badań własnych w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Mgr. inż. Marcelina Osińska w rozdziale tym dowiodła umiejętności prowadzenia naukowej polemiki, a odpowiednio dobrane piśmiennictwo świadczy o szerokiej znajomości badanej problematyki.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła 8 wniosków dowodzących osiągnięcia zamierzonych celów.

Rozdział „Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej” zawiera tytuły i dane bibliograficzne artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opublikowanych w czasopismach znajdujących się na liście czasopism punktowanych przez MEiN, takich jak: Microbial Drug Resistance, Environmental Microbiology Reports oraz Science of The Total Environment, których Impact Factor (IF) mieści się między 3,431 a 7,963. Uzyskany sumaryczny IF wynosi 14,935, a liczba punktów wg MNiE – 370. Prace zostały opublikowane w latach 2020 – 2022.

Rozprawę doktorską stanowią następujące publikacje:

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, DOI: 10.1089/mdr.2019.0480. 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, DOI: 10.1111/1758-2229.12886. 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, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.151834. Punkty MNiE/MEiN: 200,00. Impact factor: 7.963.

We wszystkich publikacjach mgr inż. Marcelina Osińska jest pierwszym autorem. Należy przyznać, że badania zostały opublikowane w świetnych czasopismach, a ich sumaryczne punktacja, a zwłaszcza IF są imponujące.

Recenzowaną pracę wieńczy wykaz zawierający 128 pozycji odpowiednio dobranego i aktualnego piśmiennictwa, co wskazuje na umiejętność wyboru materiałów źródłowych koniecznych do analizy i dyskusji uzyskanych wyników.

Na końcu zostały załączone kopie publikacji i oświadczenia autorów potwierdzające wiodący udział w ich powstaniu mgr inż. Marceliny Osińskiej.

Podstawą recenzowanej rozprawy doktorskiej są wcześniej wymienione artykuły. Wszystkie zostały opublikowane w znaczących czasopismach naukowych, co oznacza, że zostały poddane recenzjom. Zatem uwagi, które nasunęły się podczas czytania recenzowanej pracy doktorskiej dotyczą głównie treści opracowania przeprowadzonych badań.

- W pierwszym akapicie wstępu została podana pełna nazwa *Escherichia coli*, a w nawiasie skrót zawierający pierwszą literę nazwy rodzajowej, zatem niepotrzebnie stosowana jest pełna nazwa drobnoustroju naprzemiennie ze skrótem w dalszej części opracowania
- W pracy naprzemiennie stosowane jest określenie materiału do badań jako „próbka” lub „próba”. Tymczasem próba badawcza to pojęcie z dziedziny statystyki, to mała część zbioru reprezentatywna dla całego ogółu. Próbka to część materiału, który podlega bezpośrednio badaniu. Zatem przedmiotem badań jest „próbka”.

- W zasadzie nie powinno się stawiać kropek po tytule tabeli, natomiast tytuły rycin zwykle znajdują się pod nimi. Str. 23, 27, 29, 30, 33, 35, 37
- Na str. 14 znalazło się nieco niefortunne zdanie: „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”. Zdanie to sugeruje pozaeuropejską lokalizację wymienionych krajów.
- Str. 17 – „Niedoszacowanie badań ...” – chyba chodzi o niedoszacowanie wyników
- Str. 33 Rycina 1 – zamiast „po lewo”, „po prawo” powinno być po lewej, po prawej lub z lewej, z prawej.
- Brak w tekście odnośników do większości zamieszczonych tabel i rycin.
- W całej pracy Doktorantka często odnosi się do wyników otrzymanych w publikacji I, II lub III. Wyniki otrzymano w rezultacie badań opisanych w poszczególnych publikacjach.

Przedstawione uwagi mają w większości charakter porządkowy i nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej. Nie mają też wpływu na jej pozytywną ocenę.

Reasumując, należy stwierdzić, że wykonane przez mgr inż. Marcelinę Osińską badania dostarczyły ciekawych i cennych wyników poznawczych oraz aplikacyjnych, zasługujących na pozytywną ocenę.

Niewątpliwie jednym z cenniejszych efektów pracy jest rozszerzenie wiedzy na temat wielolekoopornych szczepów *E. coli* u różnych gatunków zwierząt wolno żyjących. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Marceliny Osińskiej pt. „Występowanie, charakterystyka molekularna i fenotypowa wielolekoopornych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących” odpowiada ustawowym warunkom stawianym rozprawom doktorskim określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marceliny Osińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierując się niezaprzeczalną wartością merytoryczną i aplikacyjną pracy wnoszę o jej wyróżnienie.

Olsztyn, 28.04.2022 r.



prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj