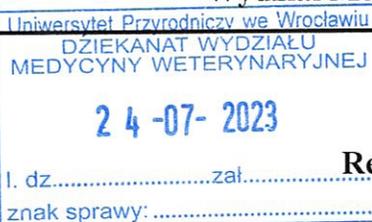


**Prof. dr hab. Łukasz Adaszek**  
**Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych**  
**Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie**



**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**lek. wet. Darii Płókarz**

**„Epidemiologia zakażeń *Pseudomonas aeruginosa* w populacji psów i kotów na terenie miasta Wrocławia”**

Układ redakcyjny ocenianej dysertacji odpowiada wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 62 strony wydruku komputerowego, w tym spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy doktorskiej, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski końcowe, bibliografię, spis tabel i spis wykresów. Dokumentacja jest bardzo bogata i obejmuje 24 tabele i 7 wykresów umiejętnie włączonych w tekst pracy.

Praca dotyczy istotnego problemu klinicznego jakim są zakażenia *P. aeruginosa* u psów i kotów. Drobnoustroje te są izolowane zarówno od zdrowych jak i chorych zwierząt. Z uwagi na ich potencjał zoonotyczny stanowią także obiekt zainteresowania medycyny człowieka. Od psów i kotów drobnoustroje te najczęściej izolowane są z przypadków ostrego i przewlekłego zapalenia zewnętrznego kanału słuchowego, skóry, zapalenia spojówek, dolnych dróg moczowych, czy bakteryjnego zapalenie wsierdzia.

W przesłanej do oceny pracy doktorskiej lek. wet. Daria Płókarz przedstawiła wyniki badań poświęconych wybranym aspektom epidemiologii zakażeń *Pseudomonas aeruginosa* w populacji psów i kotów na terenie miasta Wrocławia. Doktorantka przestudiowała antybiotykooporność wyizolowanych szczepów drobnoustrojów, ich zdolność do produkcji biofilmu oraz obecność u poszczególnych izolatów wybranych genów wirulencji. Niewielka ilość doniesień odnośnie tego typu badań w Polsce, stanowi wystarczający i uzasadniony powód podjęcia przez Doktorantkę badań. Decyzję o realizacji przedstawionych w pracy badań podjęła ona z pełną świadomością spodziewanych trudności zwłaszcza związanych z nakładem pracy oraz interpretacją znacznej ilości wyników badań klinicznych, bakteriologicznych, i molekularnych, ale i z nadzieją że uzyskane wyniki przyczynią się do ustalenia algorytmu postępowania diagnostycznego i terapeutycznego zakażeń *P. aeruginosa*.

W tym kontekście podjęcie przez lek. wet. Darii Płókarz badań dotyczących zagadnień zaprezentowanych w tytule pracy należy uznać za trafne i w pełni uzasadnione zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym.

Pracę rozpoczyna, poprzedzony streszczeniem, sześciostronicowy wstęp, w którym Doktorantka przedstawiła aktualne informacje na temat antybiotykooporności *P. aeruginosa*, mechanizmów tworzenia i funkcji biofilmu produkowanego przez te drobnoustroje oraz molekularnego uwarunkowania jego wytwarzania, a także przedstawiła inne czynniki wirulencji bakterii. Wstęp, choć nie jest długi, wskazuje na dobrą znajomość przez Doktorantkę badanej tematyki i piśmiennictwa. Jest on tak napisany, że uzasadnia celowość prowadzenia zaproponowanych przez Doktorantkę badań i pozwala na sformułowanie ich ostatecznego celu, który logicznie wypływa z przedstawionego we wstępie opisu.

Doktorantka postawiła sobie do realizacji cztery cele badawcze tj.: ocenę zdolności do tworzenia biofilmu przez szczepy *P. aeruginosa* oraz określenie stopnia ich biofilmowania w oparciu o metodę fenotypową; ocenę antybiotykooporności fenotypowej szczepów *P. aeruginosa* uwzględniającą antybiotyki rekomendowane przez CLSI dla medycyny weterynaryjnej oraz klasę karbapenemów; analizę występowania wybranych genów wirulencji izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od zwierząt wykazujących objawy kliniczne zakażenia tym gatunkiem bakterii; porównanie gatunkowe wybranych cech profilu wirulencji szczepów *P. aeruginosa* w populacji psów i kotów. Choć ich liczba wydaje się duża, to jednak nie mogły one zostać zaprezentowane inaczej, by nie pomniejszyć znaczenia pracy. Natomiast sam rozdział „Cel pracy” wydaje się zbyt obszerny. Pierwsza jego strona dotycząca zakażeń szpitalnych *P. aeruginosa* oraz uzasadnienia celowości prowadzonych badań powinna zostać przeniesiona do rozdziału „Wstęp”. W punkcie 2 doktoratu należało jedynie w mojej ocenie, pozostawić cztery cele pracy bez zbędnego opisu.

W Rozdziale „Materiał i Metody”, liczącym 10 stron Autorka opisała użyte w pracy materiały oraz metodyki badawcze. Przedstawiła charakterystykę grupy badawczej, zasadę selekcji szczepów bakterii do badań, metodologię badań molekularnych (identyfikacji gatunkowej i wykrywania genów wirulencji), ocenę zdolności tworzenia biofilmu oraz ocenę antybiotykowrażliwości. Rozdział ten kończy przedstawienie opisu statystycznej analizy wyników. Metodyka badań została dobrana poprawnie, aczkolwiek mam pewne zastrzeżenia co do izolacji DNA bakterii. Doktorantka posłużyła się tu jedynie metodą termiczną. Nie zastosowała żadnego buforu do ekstrakcji oraz nie wykorzystwała powszechnie dostępnych dzisiaj komercyjnych zastawów do izolacji kwasów nukleinowych. Nie jest to błędem, aczkolwiek wydajności izolacji DNA takim sposobem jest znacznie niższa. Zmieniłbym także

tytuł podrozdziału 3.7 „Arbitralne wyznaczenie cut-off”. Takie sformułowanie tytułu nasuwa pytanie, dlaczego Doktorantka wartość cut-off wyznaczała arbitralnie? Czy nie było żadnych danych literaturowych w tym względzie? W moim przekonaniu wystarczyłoby, gdyby tą część pracy zatytułować „Wyznaczanie cut-off”.

Wyniki badań przedstawiono na 17 stronach, w postaci tabeli i wykresów, starannie opracowanych i czytelnych.

Niestety w tej części pracy brak jest opisu uzyskanych wyników badań w postaci tekstu. Wszystkie podrozdziały prezentują tylko tabelaryczne i graficzne przedstawienie wyników. Ta część pracy powinna wyglądać inaczej i należałoby ją przeredagować. Doktorantka powinna opisać interpretację wyników robiąc w tekście odnośniki do tabel i wykresów. Czytelnik nie byłby wówczas „zmuszony” samodzielnie interpretować danych zawartych w tabelach.

Pomimo tego, te „niefrasobliwie” przedsawione przez Doktorantkę wyniki są naprawdę interesujące. Wykazała Ona, że największy odsetek szczepów opornych badanych bakterii został stwierdzony w klasie fluorochinolonów w zakresie od 17,3% w przypadku ciprofloksacyny do 83% w przypadku enrofloksacyny. Oporność w klasie karbapenemów sięgała od 4,8% dla meropenemu do 14% dla imipenemu. Prawie wszystkie szczepy *P. aeruginosa* posiadały geny *exoT* (97,8%) i *lasB* (93,4%), podczas gdy najniższa prewalencja została stwierdzona dla genu *exoU* (17,3%) i *plcH* (17,3%). Szczepy pochodzące od psów, które posiadały gen *toxA* znacząco częściej były odporne na ceftazydym, podczas gdy izolaty posiadające gen *exoU* wykazywały znacząco częściej oporność na marbofloksacyne i amikacyne. Szczepy pochodzących od kotów, które posiadały gen *exoU* znacząco częściej były odporne na enrofloksacyne. Zdolność do tworzenia biofilmu stwierdzono u 90,6% izolatów od psów i 86,4% izolatów pochodzących od kotów. W szczepach *P. aeruginosa* pozyskanych od psów i kotów najczęściej stwierdzano gen *ppyR* (97,2% u psów i 98,3% u kotów), następnie odpowiednio: *pslA* (60,8% i 57,6%), *fliC* (60,4% i 69,5%), *nan1* (45,3% i 44,1%) i *pelA* (40,1% i 33,9%). Szczepy *P. aeruginosa* izolowane od psów, formujące biofilm istotnie częściej niż nieposiadające tej zdolności wykazywały obecność genu *fliC*, zaś w przypadku szczepów od kotów izolaty formujące biofilm istotnie częściej nie posiadały genu *nan1*.

W liczącym 5 stron rozdziale „Dyskusja” Doktorantka podkreśliła, wagę i unikalność prowadzonych badań. Wyniki badań własnych umiejętnie skonfrontowała z analogicznymi danymi zamieszczonymi w dostępnym piśmiennictwie. Bardzo interesującym wydają się być spostrzeżenia odnośnie współwystępowania u *P. aeruginosa* oporności na fluorochinolony i aminoglikozydy oraz obecności genu *exoU*. Dodatkowo lek. wet. Daria Płókarz w swojej pracy potwierdziła również występowanie genu *exoU* w szczepach *P. aeruginosa* oraz oporności na marbofloksacynę oraz amikacynę. Innym ciekawym spostrzeżeniem są różnice w antybiotykoodporności szczepów omawianych bakterii, w zależności od ich geograficznego pochodzenia.

Lek. wet. Daria Płókarz, poprawnie i umiejętnie podjęła próbę krytycznej analizy i oceny uzyskanych wyników, konfrontując je z literaturą źródłową. Dowiodła nie tylko bardzo dobrej znajomości badanej problematyki, ale również umiejętności weryfikacji wyników badań własnych w kontekście wyników uzyskanych przez innych autorów. W tej części pracy Doktorantka w zasadzie przedyskutowała każdy aspekt prowadzonych badań – od badania antybiotykowrażliwości, poprzez badanie czynników wirulencji, w tym zdolności do tworzenia biofilmu. W wielu miejscach dyskusji Autorka powtarza jednak wyniki badań własnych, które były już prezentowane wcześniej, zamiast skupić się wyłącznie na skonfrontowaniu ich z obserwacjami innych badaczy.

Praca zakończona jest sześcioma wnioskami, które logicznie wynikają z kontekstu doktoratu. Na miejscu Doktorantki unikałbym stosowania we wnioskach sformułowań: „może to sugerować...”. Taka forma wskazuje, iż Doktorantka nie jest pewna swoich wyników. Większość przedstawionych wniosków można było zakończyć po pierwszym zdaniu, bez konieczności ich rozwijania.

Wykaz piśmiennictwa jest bogaty (liczy 65 pozycji), co świadczy o zdolności doboru właściwych materiałów źródłowych do analizy wyników i dyskusji w ramach tematyki będącej przedmiotem badań.

Reasumując stwierdzam, że przedstawione w pracy zagadnienia stanowią ważne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej epidemiologii zakażeń *Pseudomonas aeruginosa* w populacji psów i kotów. Uzyskane wyniki są w mojej ocenie wartościowe zwłaszcza z uwagi na fakt, iż jest to jedno z niewielu tego typu opracowań przedstawiających związek pomiędzy antybiotykowrażliwością i występowaniem genów (i czynników) wirulencji u omawianych drobnoustrojów. Praca zawiera elementy nowatorskie, została wykonana metodycznie poprawnie, a wyniki badań mają duże znaczenie poznawcze.

Oczywiście szczegółowa analiza rozprawy ujawnia pewne niedociągnięcia. Obok uwag zawartych w recenzji sugeruję, aby w przyszłości Doktorantka bardziej precyzyjnie podchodziła do stylistycznej strony własnych publikacji.

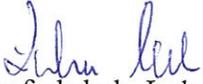
- na stronie tytułowej, po tytule pracy znajduje się kropka, której być nie powinno;
- w całym tekście wielokrotnie używane są „zangielszczane” terminy, które mają swoje odpowiedniki w języku polskim np. str. 22 „primer” – powinno być „starter”, str. 46 „stoi to w opozycji” – powinno być stoi to w „sprzeczności”;
- w kilku miejscach tekstu występują powtórzenia słów np. str. 47 „nie stwierdziłam stwierdzono”.

Tego typu błędy stylistyczne i edytorskie powinny zostać wychwycone przed oddaniem pracy do druku.

Przedstawione uwagi mają w większości charakter porządkowy i nie wpływają na pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy. Doktorantka włożyła wiele pracy w wykonanie badań, wywiązując się w pełni z zadań określonych w celach badawczych.

W konkluzji stwierdzam, że praca doktorska pt.: **”Epidemiologia zakażeń *Pseudomonas aeruginosa* w populacji psów i kotów na terenie miasta Wrocławia”** odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust.1. ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego przedkładałam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet Darię Płókarz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 10 lipca 2023

  
Prof. dr hab. Łukasz Adaszek,