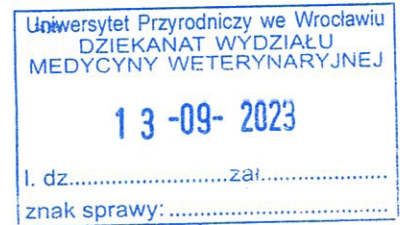


Warszawa, 20.08.2023

Dr hab. Magdalena Rzewuska, prof. uczelni  
Katedra Nauk Przedklinicznych  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie



## RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Darii Płókarz

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

wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Krzysztofa Rypuły

w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 27 czerwca 2023 r.

Rozprawa doktorska przedstawiona do oceny dotyczy zagadnień ważnych nie tylko z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej, ale również szeroko pojętej ochrony zdrowia publicznego. Jej tematyka jest bardzo aktualna, mimo że *Pseudomonas aeruginosa*, bakteria będąca obiektem badań Doktorantki, jest jednym lepiej opisanych drobnoustrojów. Jednak z uwagi na powszechne występowanie i różnorodność zasiedlanych niszy ekologicznych, dużą zdolność adaptacji do wielu środowisk, nieraz o ekstremalnych warunkach, a jednocześnie na chorobotwórczość dla zwierząt i ludzi, pałeczki *P. aeruginosa* stanowią ciągle duże zagrożenie dla zdrowia, a liczne ich właściwości pozostają nadal nieznanne. Odnosi się to zwłaszcza do zjadliwości oraz lekooporności, szczególnie wysokiej u tego gatunku. Także źródła i charakter oportunistycznych zakażeń wywoływanych przez *P. aeruginosa* oraz interakcje patogen-gospodarz nie są jeszcze w pełni wyjaśnione. Niezwykle cenne są zatem badania zmierzające do lepszego poznania mechanizmów zjadliwości i oporności oraz zależności między nimi u tych bakterii. Kluczowe jest również rozpoznanie czynników wpływających na selekcję i rozprzestrzenianie się wielolekoopornych szczepów, które mogą przenosić się pomiędzy ludźmi i zwierzętami. Dlatego uważam wybór problematyki pracy doktorskiej dokonany przez

Panią lek. wet. Darię Płókarz za uzasadniony i ważny. Jego podstawy wraz z bieżącymi danymi literaturowymi zostały przedstawione we wstępie rozprawy.

Rozprawa doktorska Pani lek. wet. Darii Płókarz została napisana w formie opracowania monograficznego. Przedstawione są w niej badania oryginalne przeprowadzone przez Doktorantkę, przy czym, jak podano na początku pracy, część uzyskanych wyników została wcześniej opublikowana w formie artykułu:

Płókarz D.; Czopowicz, M.; Bierowiec, K.; Rypuła, K. Virulence Genes as Markers for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation in Dogs and Cats. *Animals* 2022; 12:422. <https://doi.org/10.3390/ani12040422>.

Doktorantka zaznaczyła także na początku rozprawy, że niektóre informacje, zawarte głównie we wstępie, zostały wcześniej przedstawione w przeglądowej publikacji:

Płókarz D., Rypuła K. A One Health Perspective on the Human-Pets *Pseudomonas aeruginosa* Transmission. *Applied Microbiology: Open Access*, 2022; Volume 8: Issue 4.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 62 strony wydruku komputerowego i ma układ właściwym dla tego typu dysertacji naukowej. Tytuł rozprawy odpowiada treści pracy. Streszczenia, w języku polskim i angielskim, zamieszczone są na początku pracy, poprzedzone spisem treści i wykazem skrótów. Dalej treść podzielona jest w czytelny sposób na rozdziały: 1. Wstęp (5,5 str.), 2. Cel pracy, 3. Materiały i Metody (8 str.), 4. Wyniki (17 str.), 5. Dyskusja (5 str.), 6. Wnioski końcowe, 7. Literatura (65 pozycji; podane według kolejności cytowania; piśmiennictwo odpowiednio dobrane, obejmujące w większości publikacje z ostatnich 10 lat dotyczące tematyki pracy doktorskiej). Na końcu pracy znajdują się: spis tabel (24 pozycje) i spis wykresów (7 pozycji).

Praca napisana jest w języku polskim, poprawnie, chociaż Doktorantka nie uniknęła pewnych błędów pisowni (np. nazwy genów powinny być pisane małą literą i kursywą, co nie zawsze było przestrzegane, zwłaszcza w tabelach) i błędnych sformułowań (tj. na str. 6 „bakteria oportunistyczna” – powinno być patogen oportunistyczny; na str. 14 „wici” – powinno być rzęski; na str. 12 poprawna nazwa powinna być Europejska Agencja Leków). W pracy są także nieścisłości i tzw. skróty myślowe, które nieco utrudniają jej odbiór, np.:

- ✓ na str. 28 „Odsetek procentowy szczepów *P. aeruginosa* wykazujących określone stopnie biofilmowania łącznie u psów i kotów.” – powinno być „...łącznie wyizolowanych od psów i kotów”;

- ✓ na str. 32 „Brak istotnego związku między stopniem biofilmowania a lokalizacją.” – powinno być sprecyzowane lokalizacją czego;
- ✓ na str. 43 „...oporności na marbofloksacynę (p=0,025) i amikacynę (p=0,056) u psów oraz genu *exoU* i oporności na enrofloksacynę (p=0,054) u kotów.” – powinno być „...szczepów od psów...szczepów od kotów”;
- ✓ dla gentamycyny stosowane są dwa skróty: CN (poprawny) i GENTA (np. na str.41);
- ✓ na str. 48 „Autorzy Ci użyli lizogenego (LB) w hodowli biofilmu.” – co to oznacza?

Ponadto, za niewłaściwe uważam użycie słowa „biofilmowanie”, które nie istnieje w języku polskim, a oznacza to samo co „tworzenie biofilmu”. Według recenzenta zupełnie niepotrzebnie wprowadzono w pracy pojęcie „stopień biofilmowania”, bo oznacza ono to samo co „intensywność tworzenia biofilmu”, która może być określana w stopniach.

Rozdział „Wstęp” jest ciekawym, zwartym opracowaniem przeglądu literatury naukowej dotyczącej przede wszystkim właściwości pałeczek *P. aeruginosa* związanych z ich chorobotwórczością. Doktorantka wskazuje na coraz większe problemy w terapii zakażeń wywołanych przez te oportunistyczne patogeny u zwierząt, które wynikają między innymi z powiększania się populacji szczepów opornych na powszechnie stosowane w weterynarii chemioterapeutyki, w tym fluorochinolony. Rozpatrując te zagadnienia w kontekście koncepcji Jedno Zdrowie (One Health), Autorka zwraca uwagę na zagrożenie jakie mogą stanowić dla człowieka zjadliwe i wielolekooporne szczepy *P. aeruginosa*, których rezerwuarem i źródłem są zwierzęta, a szczególnie zwierzęta towarzyszące. W rozdziale tym Doktorantka wskazuje na istniejące luki w wiedzy na ten temat i na konieczność dalszych badań. Na tej podstawie wyznaczyła cztery cele badawcze pracy doktorskiej:

1. Ocena zdolności do tworzenia biofilmu przez szczepy *P. aeruginosa* oraz określenie stopnia ich biofilmowania w oparciu o metodę fenotypową;
2. Ocena antybiotykooporności fenotypowej szczepów *P. aeruginosa* uwzględniająca antybiotyki rekomendowane przez CLSI dla medycyny weterynaryjnej oraz klasę karbapenemów;
3. Analiza występowania wybranych genów wirulencji izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od zwierząt wykazujących objawy kliniczne zakażenia tym gatunkiem bakterii;
4. Porównanie gatunkowe wybranych cech profilu wirulencji szczepów *P. aeruginosa* w populacji psów i kotów.

Ich zasadność nie budzi wątpliwości, chociaż mam pewne zastrzeżenia do ich sformułowania. W celu drugim wskazano na antybiotyki (powinno być chemioterapeutyki

przeciwdrobnoustrojowe) rekomendowane przez CLSI dla medycyny weterynaryjnej – należy uściślić, że nie są to rekomendacje do stosowania konkretnych leków a wytyczne do oznaczania lekowrażliwości. Jeśli chodzi o cel trzeci, to określenie „...zwierząt wykazujących objawy kliniczne zakażenia tym gatunkiem bakterii” jest niefortunne, ponieważ sugeruje, że w przypadku zakażeń wywołanych przez *P. aeruginosa* występują typowe objawy, a na ogół tak nie jest. Natomiast, za słuszne uważam wyselekcjonowanie do badań szczepów wyizolowanych od zwierząt z objawami klinicznymi zakażenia bakteryjnego, w przypadku, którego za czynnik etiologiczny uznano *P. aeruginosa*. Takie podejście jest ważne w kontekście częstej obecności tej bakterii jako postronnego zanieczyszczenia materiału klinicznego.

Rozdział „Materiały i Metody”, składający się z dziewięciu podrozdziałów, obejmuje szczegółowy opis kolekcji szczepów użytych do badań oraz procedur wykonywanych oznaczeń. W pracy Doktorantka wykorzystała 271 szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych w dwóch komercyjnych laboratoriach diagnostycznych z różnego materiału klinicznego pobranego od psów (212 szczepów) i kotów (59 szczepów). Wstępna identyfikacja izolatów została potwierdzona przez Doktorantkę oznaczeniem podstawowych właściwości fenotypowych oraz w teście PCR dla dwóch lipoprotein błony zewnętrznej *P. aeruginosa* (dlatego byłoby lepiej, gdyby podrozdziały 3.2 i 3.4 zostały połączone pod wspólnym tytułem „Potwierdzenie identyfikacji gatunkowej”). Wyniki tych oznaczeń nie zostały jednak przedstawione w rozdziale „Wyniki”. Kolejno opisane jest wykrywanie genów wirulencji/zjadliwości techniką PCR. Badane geny, sekwencje starterów i wielkości amplikonów są przedstawione w Tabeli 1. Jednak nie zostały opisane warunki reakcji, i chociaż są odniesienia do referencyjnych publikacji, to w tego typu dysertacji powinna być podana przynajmniej temperatura przyłączania starterów dla każdej reakcji. Następnie przedstawiona jest metoda badania zdolności bakterii do tworzenia biofilmu. Doktorantka zastosowała metodę wybarwiania biofilmu fioletem krystalicznym, który następnie jest uwalniany z komórek bakterii, a jego ilość jest oceniana spektrofotometrycznie i na tej podstawie ustala się zdolność do tworzenia biofilmu oraz jego grubość/wielkość. Metoda ta jest właściwie dobrana, ale zupełnie nie jest zrozumiały opis kontroli ujemnej zastosowanej w tym doświadczeniu – Autorka podaje, że użyła jałowe podłoże BHI do pomiarów absorbancji – prosiłabym o wyjaśnienie tej kwestii. W dalszej części tego rozdziału znajduje się opis oznaczania lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną oraz metod stosowanych do analizy statystycznej wyników.

Otrzymane wyniki badań zostały skrupulatnie przeanalizowane przy zastosowaniu odpowiednich metod i wnikliwie zinterpretowane przez Doktorantkę, z uwzględnieniem wzajemnych relacji pomiędzy oznaczanymi czynnikami. Doktorantka określiła zależności między występowaniem poszczególnych determinantów chorobotwórczości u badanych szczepów, a także ich pochodzeniem. Należy podkreślić, że mimo dużej liczby danych Autorka umiejętnie je opracowała i zaprezentowała w czytelny sposób. Zostały one przedstawione w rozdziale „Wyniki” (podzielonym na 5 podrozdziałów) w postaci tabel i wykresów, pod którymi zamieszczone są płynące z nich wnioski. Uwagi krytyczne odnoszą się w tej części pracy do tabel 7 i 9, które zawierają te same dane, chociaż mają inne tytuły i inne wnioski, a także do tabeli 12 i wykresu 5, które pokazują te same dane.

Jedną z ważniejszych właściwości *P. aeruginosa* badanych w ocenianej pracy była zdolność do tworzenia biofilmu, którą wykryto u ok. 90% badanych szczepów, co potwierdza jej istotny związek z chorobotwórczością tej bakterii. Natomiast intensywność tworzenia biofilmu („stopień biofilmowania”) była zróżnicowana. Z przeprowadzonych badań wynika, że geny *ppyR* oraz *fliC* są silnymi determinantami wytwarzania biofilmu u szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych od psów i kotów. Natomiast, wydaje się, że żaden z badanych genów związanych z biofilmem nie ma wpływu na intensywność jego tworzenia. Uzyskane wyniki wskazały, że pochodzenie (gatunek gospodarza oraz lokalizacja zmian chorobowych, z których wyizolowany był szczep) nie ma wpływu na zdolność do i intensywność tworzenia biofilmu. Z kolei, co ciekawe szczepy wyizolowane od starszych psów wykazywały wyższą intensywność produkcji biofilmu niż izolaty od psów młodych.

Jeśli chodzi o obecność pozostałych genów wirulencji u badanych szczepów, to u najwyższego odsetka z nich wykryte zostały geny toksyn ExoT i ExoY oraz gen elastazy B, a u najniższego odsetka gen toksyny ExoU oraz gen hemolitycznej fosfolipazy C. Analiza wykazała niewielkie różnice w częstości występowania niektórych genów zjadliwości u izolatów od psów w porównaniu do izolatów od kotów, ale nie było żadnych różnic w odniesieniu do miejsca, z którego pochodził izolat. Szkoda, że Doktorantka analizowała jedynie prewalencję poszczególnych genów zjadliwości a nie przedstawiła w pracy genotypów zjadliwości i nie podała, które z nich dominują w badanej populacji szczepów *P. aeruginosa*.

Bardzo niepokojącym zjawiskiem, które ukazują wyniki oznaczania lekowrażliwości w tej pracy, jest wysoki odsetek szczepów *P. aeruginosa* opornych na fluorochinolony, w szczególności na enrofloksacynę, przy czym izolaty od psów były oporne na tę klasę chemioterapeutyków częściej niż izolaty od kotów. Autorka odnotowała również pewne różnice w profilach oporności w zależności od lokalizacji zmian chorobowych, z których izolowane

były badane szczepy. Warte uwagi jest też odnotowane współwystępowanie genu *exoU* i oporności (fenotypowej) na fluorochinolony oraz genu *toxA* i oporności (fenotypowej) na ceftazydym. Ta obserwacja nasuwa pytanie, jak w tych przypadkach położone są względem siebie geny warunkujące zjadliwość i oporność?

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka interesująco i wyczerpująco omówiła uzyskane wyniki, porównując je z danymi opisanymi przez innych badaczy, jednocześnie wskazując na różną liczbę badanych próbek oraz lokalizację geograficzną izolacji bakterii, jako najważniejsze potencjalne przyczyny obserwowanych rozbieżności wyników. Warte uwagi jest, że w populacji szczepów *P. aeruginosa* badanych w tej pracy, rzadziej stwierdzano obecność genów *toxA* i *plcH* niż w innych badaniach, co sugeruje niższą ich toksyczność. Jeśli chodzi o współwystępowanie niektórych genów zjadliwości i oporności fenotypowej na pewne chemioterapeutyki, to ciekawym aspektem dyskusji byłoby ustalenie na podstawie analizy sekwencji genomów *P. aeruginosa*, np. dostępnych w bazach danych tj. GenBank, czy wspomniane geny położone są blisko siebie, czy może są na wspólnym elemencie mobilnym? Czy Autorka podjęła próby wyjaśnienia czym te zjawiska są uwarunkowane?

Po analizie i dyskusji wyników Doktorantka wyciągnęła sześć końcowych wniosków. Są one prawidłowo sformułowane, chociaż mam pewne wątpliwości w przypadku wniosku 2:

„Szczepy *P. aeruginosa* zdolne do tworzenia biofilmu, izolowane od kotów istotnie rzadziej posiadają gen *nanI* niż szczepy niewykazujące takich właściwości ( $p=0,017$ ). Obecność tego genu może, więc stanowić czynnik wpływający na występowanie formy planktonicznej.” – Nie jest jasne, jaki związek ma to twierdzenie z pochodzeniem szczepu?

## **Podsumowanie**

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani lek. wet. Darii Płókarz dowodzi dojrzałości naukowej i szerokiej wiedzy Autorki. Praca została dobrze zaplanowana i zorganizowana. W celu rozwiązania wybranych problemów badawczych Doktorantka dobrała właściwą metodykę badań, a uzyskane wyniki, poddała wnikliwej analizie statystycznej i szeroko przedyskutowała w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych. Pozwoliło to na sformułowanie logicznych końcowych wniosków, które dostarczają nowych, wartościowych informacji dotyczących fenotypowego i genotypowego zróżnicowania szczepów *P. aeruginosa* w zależności od ich pochodzenia – miejsca izolacji/typu zakażenia i gatunku gospodarza, a także wskazują na konieczność dalszych badań w tym kierunku. Ponadto, dane przedstawione

w recenzowanej pracy uzupełniają wiedzę o właściwościach szczepów *P. aeruginosa* powodujących zakażenia u psów i kotów w Polsce. Dzięki temu praca ma też istotne znaczenie praktyczne, ponieważ naświetla problem lekooporności patogenów bakteryjnych i sygnalizuje lekarzom weterynarii zagrożenia płynące z nadużywania chemioterapeutyków u zwierząt towarzyszących człowiekowi, zwłaszcza fluorochinolonów z uwagi na szybko narastającą oporność i potencjalnie też zjadliwość szczepów *P. aeruginosa*.

W mojej opinii rozprawa doktorska Pani lek. wet. Darii Płókarz jest wartościowym opracowaniem o istotnych walorach poznawczych. Zatem, mimo uwag i zastrzeżeń wskazanych z obowiązku recenzenta, mających w większości charakter porządkowy, które nie umniejszają jej merytorycznej wartości, oceniam rozprawę doktorską Pani lek. wet. Darii Płókarz pozytywnie.

Stwierdzam, że recenzowana dysertacja lek. wet. Darii Płókarz pt. „Epidemiologia zakażeń *Pseudomonas aeruginosa* w populacji psów i kotów na terenie miasta Wrocławia” spełnia wymogi art. 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Magdalena Rzewuska, prof. SGGW