

prof. dr hab. Krzysztof Rypuła
Katedra Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 30 listopad 2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Olgi Goławskiej
pt.: „**Charakterystyka wybranych bakterii jelitowych
występujących u obcych gatunków żółwi**”
wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii/Zakład Analiz Omicznych
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego –
Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
pod kierunkiem
prof. dr hab. Dariusza Wasyla i
dr Magdaleny Zajac - promotora pomocniczego.

Podstawą wykonania recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 24 marca 2016 roku dotycząca wykonania recenzji rozprawy doktorskiej mgr Olgi Goławskiej pt. „Charakterystyka wybranych bakterii jelitowych występujących u obcych gatunków żółwi”.

Badania przedstawione w niniejszej dysertacji zostały zrealizowane w ramach środków pozyskanych z Narodowego Centrum Nauki na realizację badań pt.: „Inwazyjne gatunki żółwi jako źródło i wektor patogenów zwierząt i ludzi” - nr 2013/11/B/NZ7/01690.

Tematyka badań podjętych przez Doktorantkę dotyczy drobnoustrojów powodujących zachorowania u ludzi, których źródłem są dzikie zwierzęta. Choroby ludzi i zwierząt powstałe w wyniku kontaktu bezpośredniego lub pośredniego są globalnym problemem zdrowia publicznego. Międzynarodowa Organizacja Zdrowia szacuje, że ponad 60% wszystkich chorób zakaźnych to zoonozy, z powodu których rocznie umiera w skali świata wiele milionów ludzi. Miniona pandemia COVID-19, pokazała jak groźne są zoonozy i jak ważny w transmisji czynnika zakaźnego jest organizm zwierzęcy. Rezerwuuar płazów i gadów dotychczas był nam nieznany, i jest obszarem zainteresowań naukowców dopiero w po wspomnianej pandemii. Także wyniki badań są dopiero prezentowane w czasopismach naukowych, jak i materiałach konferencyjnych. Wiemy, że pałeczki *Salmonella* izolowane od gadów wywołują ciężkie objawy chorobowe u osób z grup ryzyka, tj. dzieci poniżej 5. roku życia, osób starszych i pacjentów z niedoborami immunologicznymi oraz kobiet ciężarnych. Jednak nie wiemy, dlaczego u gadów objawy chorobowe nie występują, natomiast transmisja na człowieka doprowadza do zakażeń, mogących kończyć się zgonem. W USA zagadnienie salmonelloz człowieka powiązanych z gadami (RAS, ang. *reptile associated salmonellosis*), ma swoje restrykcje i zalecenia już od 1975 roku, które mają zmniejszyć liczbę zachorowań wśród ludzi. W Europie natomiast temat ten jest słabo poznany. Jednym ze wskazywanych czynników, wpływających na wirulencję bakterii izolowanych od gadów, jest temperatura ich wzrostu.

Gady jako zwierzęta posiadające zdolność termoregulacji, przechodząc w stan hibernacji, podczas której temperatura ich ciała znacznie się obniża, są wówczas pod tym względem innym gospodarzem dla bakterii niż ludzie. To wskazuje, że podjęty przez Doktorantkę temat jest ważny i wpisuje się w koncepcję jednego zdrowia - ONE HEALTH.

Pani mgr Olga Goławska w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej podjęła się charakterystyki bakterii izolowanych z przewodu pokarmowego żółwi importowanych do Polski i odławianych ze środowiska na terenie kraju, określenia ich przynależności taksonomicznej, cech wirulencji oraz wrażliwości na chemioterapeutyki.

Przygotowując niniejszą dysertację Doktorantka zachowała układ przyjęty dla tego typu opracowań tj.: spis treści, wykaz użytych skrótów i oznaczeń, wstęp, cel i uzasadnienie badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo liczące 266 pozycji. Integralną częścią pracy są dwa aneksy: Aneks A – zawierający tabele, ryciny i zdjęcia gatunków żółwi, opis ich odłowu, badania klinicznego oraz Aneks B zawierający wykaz starterów użytych w reakcjach PCR, parametry reakcji, numery alleli genów oporności z bazy GenBank oraz programy użyte do analizy bioinformatycznej.

We wstępie, Doktorantka przedstawiła herpetofaunę w Polsce, regulacje prawne umożliwiające i ograniczające handel dzikimi zwierzętami oraz charakterystykę występowania bakterii z rodzaju *Salmonella*, gatunku *Escherichia coli* oraz bakterii, które w literaturze są opisywane jako drobnoustroje mogące być istotne jako czynnik zoonotyczny i stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt: *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Aeromonas* sp. oraz wirusy, grzyby i pasożyty.

Cele pracy określone zostały w sześciu punktach, które zostały zrealizowane, a wyniki przedstawione w kolejnym rozdziale wraz z tabelami i rycinami zawartymi w aneksie A.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione wg kolejności opisu drobnoustrojów w rozdziale wstęp. Wynikiem podjętych badań było:

- uzyskanie 1589 izolatów bakterii pochodzących od 268 żółwi reprezentujących 12 gatunków obcych pochodzących z importu lub odłowionych ze środowiska naturalnego;
- identyfikacja 78 szczepów *Salmonella* sp. należących do czterech podgatunków gatunku *S. enterica*: *enterica* (62,8%), *salame* (5,1%), *diarizone* (25,6%) oraz *houtenae* (5,1%);
- analiza sekwencji genów metabolizmu *Salmonella* (n=42) przyporządkowanych następnie do 16 typów MLST i analiza ich polimorfizmu w obrębie badanych serowarów reprezentowanych przez więcej niż jeden szczep wykazała różnice w sekwencjach nukleotydowych, które przedstawiono na rycinach 13, a, b, c, e, f i g. Różnice te dotyczyły od 22 do 47 pz w sekwencjach nukleotydowych;
- brak oporności szczepów *Salmonella* izolowanych od żółwi odławianych na chemioterapeutyki w 72,3%;
- izolacja 64 szczepów *E. coli*, pochodzących od żółwi padłych (56,3%) i odławianych (15,1%); które charakteryzowały się różnorodnością typów ST, a pokrewieństwo filogenetyczne (polimorfizm pojedynczych nukleotydów) między szczepami wyniosło 44642, a dla 4 szczepów o tych samych typach sekwencyjnych ST117, ST2126, ST714 oraz ST2178 odpowiednio zero, pięć i pięć oraz 12 nukleotydów;
- co najmniej jeden szczep *E. coli* był odporny na jeden z badanych środków przeciwdrobnoustrojowych, a wszystkie izolaty pochodzące od żółwi importowanych były odporne na: cefalosporyny, beta-laktamy oraz chinolony. Wykazana oporność ostatniej

grupy była wynikiem mutacji chromosomalnych w regionie warunkującym oporność na chinolony QRDR;

- tylko 3 izolaty *E. coli* pozyskane od żółwi odławianych posiadały gen oporności na aminoglikozydy, beta-laktamy, sulfonamidy, streptomycynę, tetracykliny, trimetoprim oraz fluorochinolony;
- w poddanych sekwencjonowaniu szczepach *E. coli* wykazano obecność markerów patogenności i były to geny: kodujące fimbrie, bakteriocyny, czynnik martwiczy, czynnik zwiększający przeżywalność, białka transportujące przez błony komórkowe. Ponadto szczepy te posiadały od dwóch do dziewięciu genów wirulencji;
- w badaniach identyfikowano inne bakterie, które zaliczono do 13 rzędów, wśród których najliczniejsze były *Enterobacteriales* (45,2%), *Pseudomonadales* (20,8%) oraz *Aeromonales* (15,9%);
- przeprowadzone badania wykazały obecność niespotykanych dotąd klonów bakteryjnych u żółwi, które mogą być źródłem gatunków i klonów bakterii dla środowiska w Polsce.

W rozdziale dyskusja Doktorantka prezentuje wyniki badań własnych, konfrontując je z wynikami dostępnymi w piśmiennictwie, wskazując różnice w uzyskanych wynikach, jak i wyniki zbieżne. Różnorodność izolatów pozyskanych w badaniach własnych i dostępne dane literaturowe przemawiają za faktem, że żółwie są źródłem bogatej mikroflory, której jedynie część poznano w przeprowadzonych badaniach. Jednakże i te dane uzupełniają dotychczasową fragmentaryczną wiedzę na temat mikroflory żółwi, która może być przydatna w badaniu zależności drobnoustrojów, ich zmienności oraz potencjalnych zagrożeń dla ekosystemów, do których wprowadzane są te gatunki zwierząt. Tu wskazać można na fakt, że *E. coli* nie jest składnikiem naturalnej flory przewodu pokarmowego żółwia oraz łatwość z jaką żółwie ulegają zakażeniu m.in. szczepami *Salmonella*, z których *S. Enteritidis* ma największe znaczenie w wywołaniu salmonellozy u człowieka, choć i tu badania są sprzeczne ze sobą z powodu okresowego siewstwa pałeczek *Salmonella*.

Wnioski z przeprowadzonych badań Doktorantka zebrała w 4 punktach, będących podsumowaniem wykonanych badań.

Mimo, iż duże części pracy zostały opisane w raporcie z realizacji projektu, to podczas przygotowywania manuskryptu do druku Doktorantka nie uniknęła błędów, także o charakterze edytorskim:

str. 7 – czego dotyczy myśl w zdaniu cyt.: ...”o czym świadczy zaobserwowane w Korei żółwia”....;

str. 8 – cyt.: ...”negatywny wynik badania”..., raczej ujemny wynik badania, choć w słowniku języka polskiego obie formy są dopuszczalne;

str. 9 – cyt.: ...”W badaniach wymazów z kloaki obserwuje się bakterie” ..., bakterie izoluje się a nie obserwuje;

str. 11 – cyt.: ...”W przypadku pasożytów”..., powinno być pasożytów, w takich sytuacjach nie używany spolszczenia słów angielskich;

str. 2, 10 – cyt.: ...”Pasożyty, wirusy, grzyby i pleśnie”..., pleśnie zalicza się do królestwa grzybów;

str. 13 – cyt.: ...”także infekcja u półrocznego niemowlęcia”..., w języku polskim zakażenie;

str. 13 – cyt.: ...”Ostatni przykład pokazuje, że do zarażenia się”..., w opisanej sytuacji mówimy o bakteriach tak więc mowa jest o zakażeniu. W odniesieniu do pasożytów mówimy o zarażeniu.

- str. 17 – punkt 1 i 3 można połączyć, ponieważ dostarczenie dowodów o występowaniu drobnoustrojów chorobotwórczych to ich izolacja i tym samym opis częstości ich występowania.
- str. 18 – cyt.: ...”potencjalnych związków epidemicznych z bakteriami”..., autorka nie wykonywała badań u ludzi będących właścicielami badanych żółwi lub osobami, które miały kontakt z nimi, zatem dokonanie takiej oceny możliwe jest jedynie w oparciu o literaturę, ale i te powiązania są czysto hipotetyczne.
- str. 29 – cyt.: ...”bakterie te obserwowano wśród żółwi padłych”..., bakterie izolowano od żółwi padłych, a możemy je obserwować pod mikroskopem;

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Olgi Goławskiej pt. “Charakterystyka wybranych bakterii jelitowych występujących u obcych gatunków żółwi” dotyczy ważnego i aktualnego zagadnienia z punktu zdrowia ludzi i zwierząt, którym są zwierzęta dzikie, zarówno bytujące w środowisku zewnętrznym, jaki i w warunkach domowych. Praca ta spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 z późn. zm. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 poz. 1669), tym samym wnioskuję do Rady Naukowej PIWet-PIB o dopuszczenie Pani mgr Olgi Goławskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Wrocław, 30 listopada 2023

.....
prof. dr hab. K. Rypuła