

Prof. dr hab. Andrzej Koncicki
Katedra Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

Olsztyn, 10.11.2019 r.

Ocena rozprawy doktorskiej

lekarza weterynarii **Jarosława Wilczyńskiego** pt. „**Charakterystyka molekularna czynników wirulencji oraz lekowrażliwość szczepów *Escherichia coli* (APEC) izolowanych od drobi na terenie Polski zachodniej**” wykonanej w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Wernickiego i promotora pomocniczego dr hab. Dagmary Stępień-Pyśniak

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo dziekana prof. dr hab. Andrzeja Wernickiego z dnia 27.09.2019 r. (W. Dz. 531-1/2016-2017) zgodnie z Uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 26.09.2019 r.

Bakterie *Escherichia (E.) coli* stanowią element prawidłowej flory bakteryjnej przewodu pokarmowego zwierząt, a większość szczepów nie jest chorobotwórcza. Chorobotwórcze dla ptaków szczepy *E. coli*, określane jako APEC (Avian Pathogenic *E. coli*), charakteryzują się bardzo zróżnicowanym stopniem zjadliwości. Dlatego w większości przypadków kolibakterioza jest schorzeniem wtórnym jako konsekwencja zaburzeń homeostazy (obniżenie odporności) organizmu na różnym tle. Najczęściej pierwotnym czynnikiem, który predysponuje organizm ptaka do wystąpienia kolibakteriozy są uszkodzenia układu oddechowego, zwłaszcza górnych dróg oddechowych, na tle złych warunków chowu (nie przestrzeganie zasad dobrostanu), szczególnie nadmiernego zapylenia i zbyt wysokiego stężenia gazów szkodliwych, ale także nadmiernej obsady ptaków na metr kwadratowy powierzchni kurnika, przegrzanie itp. Obok immunosupresji natury niezakaźnej w intensywnym chowie ptaków ważną rolę w predysponowaniu do wtórnych zakażeń pałeczkami *E. coli* odgrywają infekcje różnymi wirusami i bakteriami oraz inwazje pasożytów, które obok zmian w układzie oddechowym prowadzą także do zakażeń o przebiegu uogólnionym. W tych warunkach do zakażenia ptaków pałeczkami *E. coli* na ogół dochodzi drogą

układu oddechowego, rzadko przewodu pokarmowego, a kolibakterioza, która może przybierać różne postacie jest jedną z najpoważniejszych przyczyn strat ekonomicznych w produkcji drobiarskiej. Za szczególnie chorobotwórcze dla drobiu, najczęściej izolowane od ptaków chorych, uważane są serotypy: 01:K1, 02:K1 oraz 078:K80, chociaż nie są to jedyne serotypy izolowane z przypadków kolibakteriozy u drobiu.

Drugim, niezwykle aktualnym o wymiarze globalnym problemem, związanym między innymi z pałeczkami *E. coli*, jest narastająca lekooporność drobnoustrojów. Niewłaściwe stosowanie i nadużywanie preparatów przeciwbakteryjnych w różnych obszarach medycyny, w weterynarii, hodowli, rolnictwie, a także w przemyśle przyczyniło się do pojawienia się i rozprzestrzeniania, na bardzo szeroką skalę, opornych drobnoustrojów dysponujących coraz sprawniejszymi mechanizmami lekooporności. Problem antybiooporności, ze względu na zagrożenie dla zdrowia publicznego, stał się w ostatnim czasie przedmiotem licznych działań podejmowanych przez Światową Organizację Zdrowia i Parlament Europejski a w ślad za tym także przez Ministerstwo Zdrowia naszego kraju. Efektem tych działań jest wdrożenie „Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków”, który ma charakter interdyscyplinarny i dotyczy stosowania chemioterapeutyków w różnych dziedzinach gospodarki. Realizacja założeń tego programu ma na celu zwalczanie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Należy także nadmienić, że ptaki mogą być nosicielami enterokrwotocznych szczepów *E. coli* 0157:H7, niebezpiecznych dla zdrowia człowieka.

Stwierdzam zatem, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w nurt przedstawianej powyżej problematyki i dotyczy niezwykle aktualnego zagadnienia.

Oceniana rozprawa ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich. Manuskrypt liczy 94 strony wydruku komputerowego. Napisana jest zwięzłym, zrozumiałym językiem, chociaż nie ustrzeżono się drobnych niezręczności. Podkreślić należy obszerny materiał dokumentacyjny wyników badań składający się z 14 rycin, 9 tabel i 4 wykresów. Ponadto 10 tabel zamieszczono w rozdziale „Materiały i Metody”. Przegląd piśmiennictwa oparto na 96 starannie dobranych pracach naukowych, głównie anglojęzycznych, gdyż tylko 3 cytowane opracowania są wydane w języku polskim. Spośród 96 zamieszczonych w wykazie piśmiennictwa prac, 67 zacytowano w rozdziale „Wstęp”. Dokumentację umiejętnie wkomponowano w tekst rozprawy.

Rozdział „Wstęp” poprzedzony jest wykazem zastosowanych skrótów oraz streszczeniem w językach polskim i angielskim. W obszernym „Wstępie”, podzielonym na 5 rozdziałów i 16 podrozdziałów Doktorant bardzo szczegółowo omówił charakterystykę pałeczek *E. coli* patogennych dla ptaków, postaci kolibakteriozy przez nie wywoływane, strukturę antygenową szczepów APEC i ich czynniki zjadliwości oraz mechanizmy lekooporności. Wstęp dowodzi bardzo dobrej znajomości problematyki oraz piśmiennictwa z tego zakresu i wprowadza szczegółowo w zagadnienia, których dotyczy dysertacja.

Z analizy cytowanego w tym rozdziale piśmiennictwa przekonywująco wynika cel pracy.

Głównym celem badań była analiza fenotypowych i genotypowych cech chorobotwórczości oraz ocena stopnia lekooporności u izolatów *E. coli* pozyskanych z przypadków klinicznych kolibakteriozy występujących u różnych gatunków drobiu na terenie Polski, chociaż z tytułu rozprawy wynika, że izolaty pochodziły od drobiu utrzymywanego na terenie Polski zachodniej.

Dla zrealizowania założeń rozprawy prowadzono izolację i identyfikację rodzajową pałeczek *E. coli* z zastosowaniem klasycznych metod mikrobiologicznych, w tym analizę podstawowych cech biochemicznych oraz wstępną identyfikację izolatów testem opartym na technice PCR w czasie rzeczywistym (Real time PCR). Dla określenia częstotliwości występowania poszczególnych serotypów *E. coli* prowadzono badanie serologiczne metodą aglutynacji szkiełkowej z wykorzystaniem surowic anti-*E. coli* w kierunku antygenów otoczkowych 01,02, 08, 018 i 078. Materiał do izolacji genomowego DNA z pałeczek *E. coli* stanowiła płynna hodowla bakteryjna. Technika PCR wykrywano 8 genów kodujących czynniki wirulencji (*iss*, *irp2*, *iucD*, *cvi/cva*, *astA*, *papC*, *tsh* i *vat*). Analizę lekowrażliwości badanych szczepów *E. coli* na najczęściej stosowane w terapii chorób bakteryjnych drobiu chemioterapeutyki prowadzono metodą mikrorozcieńczeń. Przeprowadzono również analizę porównawczą występowania genów zjadliwości i lekowrażliwości u izolatów *E. coli* w zależności od gatunków i typów użytkowych drobiu oraz występowania genów wirulencji wśród izolatów pochodzących od piskląt i kurcząt brojlerów. Dodatkowo określano korelację pomiędzy nasileniem zmian anatomopatologicznych a obecnością genów wirulencji oraz występowaniem poszczególnych genów zjadliwości u szczepów *E. coli* z określonym serotypem. Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej.

Badania przeprowadzono na 290 izolatach pałeczek *E. coli* uzyskanych z próbek chorobowo zmienionych narządów (serce, wątroba, jama stawowa [nie podano jaka], worki powietrzne, śledziona) pobranych od ptaków padłych w okresie od października 2015 do maja 2017 roku. Próbkę pobierano od padłych ptaków, które dostarczano do Weterynaryjnego Laboratorium Diagnostycznego Lab-Vet Sp. z o.o. w Tarnowie Podgórnym.

W tabelach 6-1.1 i 6-1.2 podano liczby izolatów pałeczek *E. coli* od poszczególnych gatunków drobiu z różnych województw Polski zachodniej, centralnej i północno-wschodniej. Szkoda, że w tych danych nie uwzględniono wieku ptaków. Pomimo to stwierdzam, że badania przeprowadzono na wystarczającej liczbie szczepów pałeczek *E. coli* wyizolowanych od różnych gatunków ptaków by można było wyciągnąć właściwe wnioski. Uwagę zwraca nowoczesna i różnorodna metodyka badań, która w opinii recenzenta nie budzi zastrzeżeń i jest w pełni wystarczająca do realizacji postawionych celów, a zakres wykonanych badań świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktoranta warsztatu badawczego.

W świetle powyższego stwierdzam, że poprawnie zaplanowane badania wykonano stosując tradycyjne metody mikrobiologiczne i nowatorskie metody biologii molekularnej, co pozwoliło uzyskać bardzo interesujące wyniki.

Rozdział „Omówienie wyników”, liczący 9 stron, zawiera krytyczną analizę wyników badań własnych w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. W tym rozdziale Doktorant dowiódł umiejętności prowadzenia naukowej dyskusji i doboru odpowiednich prac naukowych z bogatego piśmiennictwa z tego zakresu, wykazując przy tym bardzo dobrą znajomość problematyki, której rozprawa dotyczy.

Wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych badań wnioski w liczbie 7 są poprawne, aczkolwiek na ogół nie określa się przynależności wyizolowanych pałeczek *E. coli* do biotypów na podstawie rozkładu lizyny i ornityny w szeregu biochemicznym, są natomiast wzorce fermentacji węglowodanów. Dlatego należało do tych biotypów przypisać izolowane serotypy (wniosek 1). Podobnie we wniosku 7 zamiast określenia „3 grupa zmian anatomopatologicznych” należało użyć sformułowania „..... wśród przypadków przebiegających z bardzo wyraźnymi zmianami anatomopatologicznymi, co świadczyło o uogólnionym procesie chorobowym”. Uważam, że Doktorant na podstawie uzyskanych wyników badań powinien sformułować końcowy wniosek praktyczny, który mógłby brzmieć następująco: *W świetle przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że wyizolowanie z przypadków chorobowych od drobiu, a tym*

bardziej od piskląt jednodniowych pałeczek E. coli, co ma często miejsce w praktyce, bez szczegółowej analizy tych izolatów pod względem cech chorobotwórczości, zwłaszcza określenia obecności genów wirulencji, nie jest wystarczające do rozpoznania kolibakteriozy wymagającej wdrożenia terapii z zastosowaniem chemioterapeutyków.

Recenzowaną pracę doktorską oceniam pozytywnie ze względu na jej następujące walory:

- stanowi ona pierwsze w kraju tak szczegółowe opracowanie naukowe dotyczące charakterystyki biochemicznej i genotypowej pałeczek *E. coli* wyizolowanych z klinicznych przypadków kolibakteriozy od różnych gatunków ptaków użytkowych;
- badania zrealizowano z zastosowaniem tradycyjnych i nowoczesnych metod badawczych, co podnosi jej wartość naukową;
- wiarygodność praktyczną uzyskanych wyników podnosi fakt użycia w badaniach dużej liczby szczepów *E. coli* wyizolowanych z klinicznych przypadków kolibakteriozy drobiu;
- potwierdzono, że duży problem w awiopatologii stanowi narastanie lekooporności u pałeczek *E. coli*, co jednocześnie dowodzi, że w chowie intensywnym drobiu należy ograniczać stosowanie chemioterapeutyków a większy nacisk kłaść na dobrostan i bioasekurację;
- leczenie bezwzględnie powinno być poprzedzone wykonaniem antybiogramu;
- dla właściwej diagnozy należy u wyizolowanych szczepów określać występowanie genów wirulencji.

W mojej opinii rozprawa lek. wet. Jarosława Wilczyńskiego stanowi bardzo wartościowe opracowanie naukowe dotyczące aktualnego problemu badawczego a zastosowanie przez Doktoranta różnorodnych metod badawczych świadczy o Jego wszechstronnym przygotowaniu do prowadzenia diagnostyki chorób ptaków. Praca bez wątplenia zawiera elementy postępu w diagnostyce chorób bakteryjnych drobiu i odpowiada wymogom naukowym i formalnym stawianym rozprawom doktorskim.

Z obowiązku wnikliwego recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę Doktorantowi na następujące, wcześniej nie wymienione jej niedociągnięcia:

- ✓ należy dokonać korekty tytułu rozprawy wykreślając słowo „zachodniej”;

- ✓ w odniesieniu do materiału biologicznego zamiast słowa „próby” należy używać „próbki”;
- ✓ jeżeli jest coś policzalne to nie należy używać słowa „ilość” a „liczba” np. liczba szczepów;
- ✓ wielokrotnie błędnie cytowano pozycje piśmiennictwa, np. na str. 14 powinno być Poulin i Combes, na str. 15 Casadevall i Pirofski (w wykazie piśmiennictwa pod poz.13 figuruje błędnie Casadewall A., Pirofski Infection L. A.), na str. 20 powinno być Heller i Drabkin a nie Heller i wsp; na str. 25 powinno być Mikucki i wsp. oraz Dho M. i Lafont;
- ✓ w wykazie piśmiennictwa nie zamieszczono cytowanej na str. 79 pracy Monte i wsp. 2017;
- ✓ cellulitis to zapalenie skóry i tkanki podskórnej (str. 17);
- ✓ u ptaków nie ma jamy brzusznej, jest natomiast jama ciała (str. 18);
- ✓ ND to nie pomór drobiu a rzekomy pomór drobiu (str. 18);
- ✓ w odniesieniu do bakterii używamy określenia „oporność” a nie odporność (str. 22, 25);
- ✓ zamieszczony na str. 67 w rozdziale "Wyniki" fragment tekstu, cyt. „Według definicji niektórych autorów.....” powinien znaleźć się w omówieniu wyników;
- ✓ w tab. 7-9 na stronie 71 nie podano co oznaczają cyfry w nawiasach;
- ✓ w wykazie piśmiennictwa nie stosowano obowiązujących skrótów nazw czasopism.

Przedstawione uwagi krytyczne, które mają wyłącznie charakter porządkowy lub uzupełniający, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy i nie wpływają na jej jednoznacznie pozytywną i wysoką ocenę.

W konkluzji wyrażam opinię, że rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka molekularna czynników wirulencji oraz lekowrażliwość szczepów *Escherichia coli* (APEC) izolowanych od drobiu na terenie Polski zachodniej” ze względu na aktualną problematykę naukową oraz ciekawe i przydatne dla praktyki awiopatologicznej wnioski odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz.1789), dlatego przedkładam Radzie Dyscypliny

Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie lek. wet.
Jarosława Wilczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Andrzej Koncicki