

Puławy, dn. 30 listopada, 2020 r.

Dr hab. Grzegorz Tomczyk, profesor Instytutu
Państwowego Instytut Weterynaryjny
- Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Izabeli Jagiełło-Podębskiej

**pt. „Występowanie oraz charakterystyka patogennych szczepów *E.coli*
izolowanych od wybranych gatunków drobiu ze szczególnym uwzględnieniem
lekooporności”**

**wykonana na zlecenie Rady Dyscypliny Weterynaria, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie,
(pismo RD/Wet./531-3/2020)**

Zakażenia u drobiu wywołane przez bakterię *Escherichia coli* są zagadnieniem złożonym. Bakterie te, a szczególnie szczepy APEC (Avian Pathogenic *Escherichia Coli*), mogą być odpowiedzialne u ptaków za wystąpienie szeregu odrębnych jednostek chorobowych takich jak; zapalenie pępka i woreczka żółtkowego u piskląt (wszystkich gatunków ptaków), cellulitis (głównie u kurcząt brojlerów), enteropatii przewodu pokarmowego opisywanych jako kolibakterioza układu pokarmowego, kolibakteriozy układu oddechowego (głównie jako zapalenie worków powietrznych wklajające zakażenia mykoplazmowe), zapalenia układu rozrodczego w tym jąder u kogutów i jajowodu z otrzewną u kur, ostrej posocznicowej postaci uogólnionej kolibakteriozy określanej jako *Colisepticemia*; co oznacza, że zakażenie *E.coli* jest problemem zdrowotnym u drobiu totalnym na każdym etapie i we wszystkich kierunkach produkcji drobiarskiej. Zdolność tej bakterii do tak szerokiego obszaru patologii zdrowia ptaków wynika z szeregu jej cech genetycznych i antygenowych a warunkują to czynniki zjadliwości, adhezyny, toksyny, upośledzanie wchłaniania żelaza, odporność na układ immunologiczny gospodarza. Powszechność tych zakażeń w masowej produkcji drobiu i warunki sprzyjające pasażowaniu się tej bakterii poprzez liczne organizmy ptaków w stadzie i w pokoleniach (zakażenia transowarialne) sprzyjają narastaniu cech oporności na substancje antybiotyczne i pojawianiu się problemów terapeutycznych w przypadku podjęcia koniecznego

leczenia. Oprócz wymienionych zdolności *E.coli* do wywoływania swoistych samoistnych jednostek chorobowych u drobiu ma ona zdolność do wnikania szeregu zakażeń innymi patogenami zarówno bakteryjnymi (*Clostridium sp.*, *Ornitobacterium rhinotracheale*, mykoplazmy) jak i wirusowych: powikłanie dla syndromu obrzęku głowy (ang. SHS-swolen head syndrome) IB, ND, IBD, pneumowirusy, enterowirusy; zmieniając przebieg tych schorzeń i obraz anatomopatologiczny co często determinuje niezamierzone błędni w postępowaniu lekarsko-diagnostycznym. Dodatkowo duże zainteresowanie naukowców wzbudza w ostatnich latach pojawianie się szczepów werotoksycznych i wybitnie lekoopornych *E.coli*. Daje to szeroką orientację dla czytającego pracę w zakresie problemu zdrowotnego jakim są kolibakteriozy drobiu tj. stanu zdrowia ptaków po zakażeniu tymi bakteriami i ewentualnego wpływu także na zdrowie konsumentów. W ostatnich latach obserwuje się progresywną presję konsumencką związaną z maksymalną eliminacją antybiotyków w leczeniu drobiu, który jest źródłem mięsa i jaj. Celem tych działań jest między innymi opracowanie alternatywnych systemów produkcji drobiu eliminujące lub ograniczające stosowanie antybiotyków oraz uniknięcie zakażeń i rozwoju chorób wywoływanych między innymi przez *E.coli*, które w przeszłości wymagały konieczności użycia antybiotyków a obecnie pojawia się problem narastania na nie lekooporności. Stosowanie antybiotyków co do których odnotowuje się dynamiczne narastanie oporności (co w rzeczy samej powinno eliminować je z użycia) dotyczy także problemu pozostałości tych substancji w żywności zwierzęcego pochodzenia jako niekorzystnego zagrożenia dla konsumentów.

Powyższe, było między innymi przesłanką do podjęcia przez Doktorantkę Panią **mgr inż. Izabelę Jagiełło-Podębską** stosownych badań zawartych w przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej.

Dokonując merytorycznej oceny dysertacji można stwierdzić, iż praca ma klasyczny układ rozprawy doktorskiej, a jej treść odpowiada tytułowi.

Oceniając rozprawę doktorską Pani mgr inż. Izabeli Jagiełło-Podębskiej od strony formalnej, można skonstatować, że zawiera ona 131 stron tekstu, w tym 14 tabel, 10 rycin, 5 fotografii oraz wykaz aż 184 pozycji piśmiennictwa. Dodatkowo uzupełnieniem jest wykaz skrótów i 2 streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Supplement. Układ pracy jest typowy dla prac doktorskich. Pracę napisano w układzie prac klasycznych (monograficzna) i mimo jej znacznej objętości, jest ona czytelna i przejrzysta dla czytającego (poprawna wartość stylistyczna).

Wstęp obejmuje dane literaturowe projektujące podjęty temat badań. W ogólnym odczuciu czytającego pracę jest on zbyt obszerny chociaż równocześnie świadczy o przygotowaniu się Doktorantki do wysunięcia tez pracy i o posiadaniu szerokiej wiedzy nt. roli *E.coli* w patologii. Autorka przytacza tu zakres wiedzy (dość szczegółowe dane) nt. bakterii *E.coli* i jej roli w patologii ludzi i zwierząt a szczególnie w aviopatologii, w tym szczegółowe omówienie odrębnych jednostek

chorobowych tła zakaźnego z udziałem *Escherichii coli* wywoływanych przez tzw. szczepy APEC, wpływu zakażeń tym zarazkiem u drobiu i ew. na zdrowie człowieka oraz szeregu innych danych konfrontowanych z dobrze dobranymi zasobami literatury z tego zakresu. Pozwoliło to Doktorantce wysunąć tezy i zaplanowanie badań własnych z wykorzystaniem zebranego materiału biologicznego w trakcie wykonywanych laboratoryjnych badań diagnostycznych, pochodzącego od drobiu różnych gatunków i kierunków produkcji.

Tabele, ryciny i fotografie są czytelne dzięki czemu jasno i klarownie udokumentowano wyniki badań z rozdziałem na poszczególne etapy dotyczące badań zgodnie z zaplanowanymi celami.

Doktorantka dobrze wywiązała się z podjętego trudu badań zarówno w sferze laboratoryjnej i badawczej.

Recenzent pragnie zwrócić uwagę, że dokonano oceny co najmniej trzech tez pracy. Celem tych badań była próba scharakteryzowania szczepów *Escherichia coli* pozyskanych od ptaków i mogących mieć istotną rolę w patologii drobiu poprzez określenie szeregu ich cech takich jak cechy fenotypowe (morfologiczne, biochemiczne i serologiczne), ich identyfikację metodami molekularnymi (badanie profili genowych w zakresie wirulencji i zdolności wytwarzania toksyn Stx1 i Stx2) oraz badanie (w tym molekularne) w zakresie cech lekooporności na wybrane antybiotyki. W zakresie oceny występowania czynników wirulencji izolatów *E.coli* techniką PCR i Multiplex PCR, Doktorantka dokonała szerszego niż nawet zakładała w celu pracy zidentyfikowania genów kodujących zdolność do wytwarzania toksyn. Zatem określiła nie tylko geny kodujące wytwarzanie toksyny Stx1, Stx2 ale także fimbria (41,F4,F5, F6, F18) , intyminy i toksyny ST-I i ST-II.

Przynależność gatunkową *E.coli* Doktorantka potwierdziła dokładnymi badaniami fenotypowymi w tym mikrobiologicznymi i biochemicznymi a także z wykorzystaniem nowoczesnej metody spektrometrii mas-MALDI-TOF MS oraz z wykorzystaniem monospecyficznych surowic testowych O1,O2 i O78 dla antygeny somatycznego O, dzięki czemu sklasyfikowała szczepy wg ich przynależności do określonych grup serotypowych. Potwierdziła, że szczepy różnią się pod względem wytwarzania hemolizyny i innych cech biochemicznych jak zdolność do fermentacji sorbitolu. Aż u 62 (85%) szczepów potwierdzono zdolność do fermentacji sorbitolu. Najwyższy odsetek szczepów hemolizujących występował wśród izolatów pozyskanych od kurcząt brojlerów (46.7%) i kur reprodukcyjnych (20%) niższy od drobiu wodnego (13,3%) a najniższy u indyków (6,7%). Wykorzystując spektrometrię mas Autorka wykazała, że wszystkie 73 szczepy nie różniły się znacznie w zakresie widma mas (wartości identyfikacji) i przynależały one do tego gatunku. Kolejne badania izolatów oparte o tradycyjną ale ciągle użyteczną metodę serologiczną - aglutynację płytową (ang. SPA) pozwoliły wykazać, że najczęściej w pozyskanym przez Autorkę materiale bakterii *E.coli* dominuje serotyp O78 i O2 (obecne odpowiednio wśród 37 i 31,5% izolatów). Serotyp O2 najczęściej występował u kurcząt brojlerów.

Niezwykle istotnym elementem pracy było określenie lekooporności szczepów wobec najczęściej stosowanych w terapii drobiu środków przeciwbakteryjnych opartej o ocenę profilu antybiotykowego. Wśród istotnych wyników należy wskazać, że taka substancja jak kolistyna mimo już wieloletniego dość powszechnego stosowania jej w terapii drobiu ciągle bo aż w wobec 100% szczepów zachowuje skuteczność w aktywności antybiotycznej. Podobnie 4 inne substancje aktywne, przy czym dodać należy, że tylko gentamycyna może mieć ewentualne zastosowanie w terapii drobiu. Podobnie ciągle akceptowalna i zadawalająca wydaje się (80,8%) aktywność amoksycyliny/kwas klawulonowy, natomiast stwierdzono stosunkowo w niskim odsetku obecność szczepów (bo 61,6%) wrażliwych na florfenicol, dość powszechnie stosowany przez awiopatologów (ten lek nie ma długiej historii stosowania w terapii drobiu). Należy jednak zauważyć, że te dwie powyższe substancje są najczęściej używane w leczeniu enteropatii u drobiu wysokoprodukcyjnego w tym enteropatii na tle zakażeń *E.coli*. Niepokojącym wydaje się stwierdzenie wysokiej oporności szczepów pochodzących od kurcząt (58,8%) i od kur niosek (100%) na enrofloksacynę. Ten lek jest ciągle w powszechnym użyciu co może prowadzić do poszerzenia puli opornych szczepów także u innych gatunków drobiu. Dodatkowo Doktorantka wykazała, obecność szczepów wykazujących tzw. wielooporność (tj. oporność na więcej niż dwie substancje antybiotyczne) i to co może być niepokojące to, że te cechy wielooporności wykazało w odniesieniu do 8 z 25 badanych antybiotyków. Cennym efektem badań podjętych przez Doktorantkę jest przeprowadzona charakterystyka genetyczna/analiza genotypowa w zakresie występowania wśród szczepów *E.coli* genów zjadliwości warunkujących chorobotwórczość opartej o zdolności do wytwarzania toksyn wykazując, że tylko nieliczne z nich posiadają zdolność wytwarzania toksyny Stx1 oraz genu odpowiedzialnego za czynnik fimbrialny F18.

W kolejnych badaniach Doktorantka podjęła próbę oceny związku obecności genów oporności na wybrane antybiotyki. Na podstawie badań z wykorzystaniem reakcji Multiplex-PCR wykazała, że wśród badanych szczepów obecność genów oporności była zróżnicowana od posiadania przez szczepy tylko jednego genu oporności poprzez posiadanie 4 genów (większość szczepów) do szczepu (1), który posiadał aż osiem genów oporności a wśród tych genów dominował gen *dhfrV* występujący u 74% szczepów. Wśród tych wyników istotnym wydaje się brak genu oporności *bla_{TEM}* odpowiedzialnego za oporność na antybiotyki betalaktamowe. Geny oporności na antybiotyki stwierdzano najczęściej wśród szczepów izolowanych od kurcząt i kaczek rzeźnych co może świadczyć, że w trakcie tuczu tych ptaków może następować podniesienie zjadliwości i oporności *E.coli*, co w istocie obserwowane jest spontanicznie przez awiopatologów w warunkach terenowych kiedy to kolejne nawroty kliniczne kolibakteriozy w konkretnym obiekcie przebiegają z wyższymi stratami ptaków w stadzie a także z coraz słabszymi efektami leczenia.

Pod względem merytorycznym poszczególne części opracowania można uznać za poprawne i jasno opisane w ocenianej dysertacji. Zobrazowano to w tabelach i w dobrej jakości rycinach w zależności od zastosowanego testu i metody. Pewnym rozszerzeniem w prezentacji wyników jest dołączenie w pkt.10. Suplementu w postaci

2 Załączników. Z założenia mają one zawierać dane z wyników badania oporności wyizolowanych szczepów na wybrane antybiotyki. Mimo, że szczególnie Załącznik 2 zawiera szczegółowe dane to dla czytającego pracę sprawia wrażenie zbyt ich nadmiernego zagęszczenia. Być może należałoby przyjąć inną formułę prezentacji wyników, niemniej nie rzutuje to na wartość treści tu zawartej. Uzupełnieniem są też włączone do treści fotografie dokumentujące wykonanie badań.

Pan mgr inż. Izabela Jagiełło-Podębska opracowała przedstawioną dysertację doktorską na stosunkowo dobrym poziomie dając tym samym dowód dojrzałości naukowej, która wyraża się zarówno w umiejętności wysuwania hipotez, jak też przeprowadzania prawidłowego postępowania analitycznego i opracowania wyników w formie odpowiadającej wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. W moim odczuciu znajduje dodatkowe uznanie z powodu, iż Pani mgr inż. Izabela Jagiełło-Podębska nie jest pracownikiem jednostki naukowej (uczelnie czy instytuty naukowe) a pracuje w usługowym laboratorium diagnostycznym i pewnie jest obciążona szeregiem bieżących obowiązków także o charakterze administracyjnym.

Autorka po zakończeniu badań sformułowała bardzo trafnie siedem wniosków. Moim zdaniem treść wniosku siódmego nie powinna jednak pomijać użycia w diagnostyce kolibakteriozy dotychczas stosowanych klasycznych metod.

Ze względu na fakt, że do obowiązków recenzenta należy podkreślenie nie tylko walorów opracowania ale zwrócenie uwagi także na pewne usterki oraz niedociągnięcia, niekiedy istotne przed niewątpliwie planowanym publikowaniu pracy, przytaczam niektóre swoje uwagi:

- zdaniem Recenzenta Autorka używa niezbyt fortunnych sformułowań np. str. 7 Wykaz skrótów jest „Procent” we właściwym brzmieniu oznacza „Odsetek”, dodatkowo w rozdziale Wykaz skrótów można zrezygnować z opisu tzw. „Skrótów oczywistych” jak Stopnie Celsjusza, Dwutlenek węgla, mikrolitr, ew. PCR.

-niezrozumiały jest dla Recenzenta układ (kolejność) cytowanego piśmiennictwa, zwykle jest to układ alfabetyczny, niekiedy wg roczników publikowania. W pracy natomiast nie jest zachowana żadna z tych zasad

- cytowana poz. 6 dotyczy podręcznika, pod redakcją M. Mazurkiewicza wyd.II 2011, co do którego wznowiono kolejne wydanie „Choroby drobiu”, tym razem pod redakcją A.Wieliczko, 2019.

Dodatkowo w mojej ocenie użyto niewłaściwej terminologii fachowej jak:

- str. 46. Zwierzęta padłe- lepiej przy tej tematyce jaki obejmuje praca należy używać terminu "padłe ptaki"

- str. 46. Materiał; „pobraných od 3 stad kur reprodukcyjnych” w Wynikach; str. 85 „ 2 izolaty pochodziły od kurcząt brojlerów a jeden od kur niosek towarowych”

- str. 76 podobnie „ pochodzących od kur niosek towarowych”

-str. 90 stwierdzenie „ w całej populacji analizowanych szczepów” należy jednak używać terminu „puli szczepów”, albowiem populacja to ludzka lub zwierzęca a nie bakteryjna

Doktorantka nie ustrzegła się też (co często się zdarza) tzw. „literówek” w tekście oraz błędów stylistycznych jak np. :

str. 105 we Wniosek 4 „odpowiedzialne za oporność za trimetoprim” – powinno być „na trimetoprim”,

a także błędów interpunkcyjnych jak: brak odstępu, kropki, przecinki itp.

Nie są to błędy, które wpływałyby na merytoryczny status i wartość pracy, mają tu jedynie wymiar estetyki tekstu. Wskazaniem zatem byłoby użycie tzw. „pocziwego” słowa polskiego i oczywiście nie tylko z tego powodu powinny te usterki ulec korekcie przed publikowaniem fragmentów pracy.

Mimo stwierdzonych powyżej uchybień i nieścisłości w druku pracę oceniam wysoko pod względem merytorycznym (łącznie z doбором właściwych założeń badań) a głównie wyboru odpowiedniej metodologii i wykorzystanie wystarczającej liczebności materiału biologicznego pobranego do zrealizowania i wykonania analiz. W ostatnich latach obserwuje się progresywną presję konsumencką związaną z maksymalną eliminacją antybiotyków w leczeniu drobiu. Praca ma zatem także aspekt aplikacyjny bowiem potwierdzenie w niej dynamicznego wzrostu wśród szczepów *E.coli* lekooporności wskazuje na konieczność korekt w postępowaniu lekarsko-weterynaryjnym w zakresie ograniczenia stosowania antybiotyków w produkcji drobiarskiej co stoi pod dużą presją konsumencką jeśli chodzi o produkty drobiarskie, które są jest źródłem mięsa i jaj.

W celu pracy założono aspekty poznawcze badań co niewątpliwie osiągnięto i udokumentowano wynikami a także skonfrontowano w rozdziale Dyskusja ze stanem wiedzy w tym zakresie. Bardzo obszerna dyskusja i porównanie wyników własnych z innymi świadczy o dojrzałości Doktorantki w zakresie umiejętności oceny efektów swoich badań. Analiza tych wyników jest też odpowiedzią na postawione własne tezy i znajduje to odzwierciedlenie w stanie obecnej wiedzy z tego zakresu.

Zatem, **pracę oceniam pozytywnie i przedkładam wniosek Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynarii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Izabeli Jagiello-Podębskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego**, ponieważ oceniana praca doktorska odpowiada warunkom określanym w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki zgodnie z art. 13. pkt. 1. Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003r nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Dr hab. Grzegorz Tomczyk, prof. Instytutu