



UNIwersytet  
PRZYRODNICZY  
WE WROCLAWIU

KATEDRA EPIZOOTIOLOGII Z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

Wrocław 29.11.2020 r.

Prof. dr hab. Andrzej Gawęł  
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków  
i Zwierząt Egzotycznych  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej magister inżynier Izabelli Jagiełło- Podębskiej

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

wykonanej pod kierunkiem

Prof. dr hab. Renaty Urban-Chmiel

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 30.09.2020 roku, zgodne z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 24.09.2020r.

Kolibakterioza jest jedną z najczęściej notowanych chorób bakteryjnych diagnozowanych w stadach drobiu. Pałeczki *Escherichia coli* zaliczane do rodziny *Enterobacteriaceae* są Gram-ujemnymi, względnie beztlenowymi bakteriami nie wytwarzającymi przetrwalników, dość opornymi na czynniki środowiska i stanowią mikroflorę przewodu pokarmowego ssaków i ptaków. Bakterie te pełnią w jelitach bardzo wiele pozytywnych funkcji, np. biorą udział w



produkcji witamin z grupy B, C, K i kwasu foliowego, uczestniczą w trawieniu pokarmu, a także hamują wzrost bakterii chorobotwórczych dla organizmu gospodarza. Jednak szereg czynników takich jak: stres, nieodpowiednia dieta, brak dezynfekcji i higieny oraz antybiotykoterapia mogą wpływać na zaburzenia równowagi fizjologicznej mikroflory jelitowej, przyczyniając się do namnożenia patogennych szczepów *E. coli*. Znaczna część prac dostępnych zarówno w literaturze krajowej jak i zagranicznej, poświęcona jest patogennym szczepom *E. coli* izolowanym od ludzi, bydła i prosiąt, natomiast niewiele publikacji dotyczy szczepów patogennych dla drobiu - APEC (ang. *Avian Pathogenic Escherichia coli*). Szczepy APEC są odpowiedzialne m.in. za występowanie stanów zapalnych worka osierdziowego i worków powietrznych, zapalenie woreczka żółtkowego czy posocznicy, stanowiąc przyczynę znacznych strat ekonomicznych w hodowli drobiu.

Magister inżynier Izabella Jagiełło- Podębska podjęła wieloetapowe badania, mające na celu poszerzenie wiedzy na temat charakterystyki szczepów *Escherichia coli* izolowanych od drobiu w Polsce, zarówno w aspekcie ich cech fenotypowych, jak i genotypowych, ze szczególnym uwzględnieniem lekooporności.

Manuskrypt ocenianej rozprawy ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich i liczy 131 stron wydruku komputerowego. Dokumentację dysertacji stanowi 14 tabel, 10 rycin i 5 fotografii umiejętnie wkomponowanych w tekst rozprawy oraz 2 załączniki suplementu dotyczące lekooporności – rycina i tabela.

„Wstęp” obejmujący 32 strony składa się z 7 podrozdziałów i zawiera informacje dotyczące charakterystyki bakterii *Escherichia coli*, klasyfikację szczepów, ich rolę w przewodzie pokarmowym, zakażenia powodowane przez pałeczkę okrężnicy u ludzi i zwierząt z wyszczególnieniem zakażeń drobiu oraz możliwość transmisji *E.coli* z drobiu na ludzi.

Celem pracy doktorskiej mgr inż. Izabelli Jagiełło-Podębskiej była izolacja oraz kompleksowa charakterystyka szczepów *Escherichia coli* pozyskanych od różnych gatunków drobiu, ze szczególnym uwzględnieniem klasyfikacji serologicznej oraz oporności szczepów na wybrane substancje przeciwbakteryjne. W badaniach przeprowadzono:



- fenotypową charakterystykę szczepów *E. coli*, w oparciu o standardowe mikrobiologiczne procedury ze szczególnym uwzględnieniem morfologicznej, biochemicznej oraz serologicznej oceny badanych izolatów
- identyfikację molekularną metodą spektrometrii mas MALDI-TOF MS oraz charakterystykę genotypową czynników wirulencji ze szczególnym uwzględnieniem zdolności badanych szczepów do wytwarzania toksyn Stx1 i Stx2 z wykorzystaniem technik PCR
- ocenę profilu antybiotykowego *E. coli* z wykorzystaniem testu MIC połączoną ze szczegółową analizą genetyczną szczepów w zakresie występowania genów oporności na wybrane chemioterapeutyki i antybiotyki

Rozdział „Materiały i metody” obejmujący 17 stron maszynopisu, składa się z 6 podrozdziałów obejmujących tematy takie jak: metody izolacji i identyfikacji szczepów *E. coli*, analizy serologiczne, lekowrażliwość szczepów i charakterystykę genetyczną izolatów oraz wykaz podłoży mikrobiologicznych i odczynników użytych do przeprowadzonych analiz. Z 73 stad drobiu z województwa wielkopolskiego pozyskano 73 izolaty *E.coli* które poddane zostały dalszym badaniom mikrobiologicznym, biochemicznym, genetycznym i ocenie z użyciem spektrometrii mas. Część badań wykonanych zostało w laboratorium Vet-Lab Brudzew, a część w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Rozdział „Wyniki” obejmuje 28 stron i podzielony jest na 5 podrozdziałów opisujących analizę fenotypową izolatów, identyfikację szczepów *E.coli* metodą spektrometrii mas, klasyfikację serologiczną izolatów, ocenę lekooporności na podstawie szeregu rozcieńczeń i charakterystykę genetyczną izolatów. Z użyciem MALDI TOF potwierdzono, iż badane 73 izolaty należą do gatunku *E.coli*. Doktorantka przedstawiła analizę fenotypową izolatów z klasyfikacją serologiczną i szerokie badania lekooporności szczepów pałeczki okrężnicy. Doktorantka stwierdziła występowanie genów oporności na liczne grupy substancji przeciwbakteryjnych u szczepów izolowanych od drobiu, wśród badanych izolatów nie stwierdzono tylko genu oporności dla betalaktamów (bla TEM). Doktorantka potwierdziła także



obecność genów zjadliwości u niewielkiej liczby izolatów, u 3 szczepów stwierdzono gen *Stx1*, a u 2 gen *FedA* dla fimbrii 18.

„Dyskusja” jest omówieniem uzyskanych wyników badań w odniesieniu do danych zawartych w dostępnym piśmiennictwie i świadczy o znajomości literatury z omawianego tematu. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są zbliżone do wyników uzyskanych przez badaczy z innych krajów i potwierdzają, że do najczęściej izolowanych od drobiu serotypów należą O78 i O2. Nie można jednak wskazać jednego określonego profilu *E.coli* wywołującego kliniczne przypadki kolibakteriozy. Niepokojąca jest notowana oporność izolatów *E.coli* na leki dobrze penetrujące do tkanek, mogące skutecznie działać w obrębie zainfekowanych narządów wewnętrznych - ponad 30% szczepów było opornych na najczęściej stosowany u drobiu lek – enrofloksacynę, a ponad 50% izolatów na amoksyycynę.

Doktorantka podsumowuje efekty badań w rozdziale „Wnioski” w 7 punktach (cytując):

1. Przedstawione badania potwierdziły występowanie szczepów APEC u różnych gatunków drobiu zlokalizowanych głównie w obrębie 3 serotypów O1, O2, O78, przy czym najwyższy odsetek badanych izolatów (37%) należał do serotypu O78.
2. Wszystkie badane szczepy *E. coli* cechowały się występowaniem 100% oporności na co najmniej 8 z 25 badanych antybiotyków, co potwierdza występowanie istotnego problemu wielooporności szczepów APEC izolowanych od wszystkich gatunków drobiu produkcyjnego na terenie kraju.
3. Uzyskane izolaty cechowała obecność zróżnicowanych profili fenotypowych w zakresie lekooporności, a identyczne profile obserwowano jedynie w przypadku 3 szczepów pochodzących od kurcząt brojlerów i 3 szczepów uzyskanych od kaczek rzeźnych.
4. Wśród analizowanych szczepów APEC najczęściej występującymi genami lekooporności były geny *dhfrV* (74%) i *sulI* (60%), odpowiedzialne za oporność na trimetoprim i sulfonamidy, które potwierdzono u >60% izolatów.



5. Występowanie genów odpowiedzialnych za wytwarzanie toksyny Stx1 obserwowano jedynie u 3 szczepów *E. coli*, zaś fimbrii F18 u 2 szczepów APEC, przy czym obecność fimbrii F18 jako nielicznie występującej u tych szczepów może stanowić ważny element diagnostyczny.
6. Określenie dominującego genotypu APEC u drobiu na podstawie analizy profiliw lekooporności oraz genetycznej w zakresie detekcji genów oporności i wytwarzanych czynników wirulencji może stanowić ważny element diagnostyczny, co jest niezbędne przy opracowywaniu i produkcji nowych środków terapeutycznych i szczepionek przeciwko kolibakteriozie.
7. Badania molekularne są jednym z najważniejszych elementów diagnostyki przyczynowej kolibakteriozy u drobiu umożliwiającej nie tylko wykrycie czynników zjadliwości bakterii, ale także monitoring lekooporności w stadzie.

Kolejne rozdziały obejmują streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Spis piśmiennictwa jest szeroki, prawidłowo dobrany uwzględniający 184 pozycje literaturowe, w tym 22 najnowsze prace z lat 2019-2020.

W mojej ocenie rozprawa mgr inż. Izabelli Jagiełło-Podębskiej wnosi nowe dane dotyczące charakterystyki szczepów pałeczki okrężnicy izolowanych od drobiu. Problem badawczy jest istotny i aktualny, a zastosowane metody badawcze są zróżnicowane i uzyskane wyniki dostarczają wielu cennych informacji. Praca bez wątplenia poszerza wiedzę na temat charakterystyki izolatów *E.coli* u drobiu i odpowiada wymogom naukowym i formalnym stawianym rozprawom doktorskim.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednakże zwrócić uwagę na następujące wątpliwości i niedociągnięcia:

1. Dla recenzenta nie jest jasna ilość badanych stad i pozyskanych szczepów *E.coli*. W rozdziale „Materiały i metody” jest mowa o badanych 73 stadach drobiu z których wyizolowano 73 szczepy, gdy w dyskusji Doktorantka pisze o 80 stadach i 73 izolatach zakwalifikowanych jako APEC (sugeruje to że były także szczepy fizjologiczne AFEC) .
2. Na jakiej podstawie kwalifikowano izolaty jako APEC? Jeśli uznać, że szczepy APEC to szczepy wywołujące kolibakteriozę u ptaków w postaci zapalenia pępka i woreczka żółtkowego,



kolibakteriozę układu oddechowego czy rozrodczego w przebiegu której dochodzi do zmian zapalnych manifestujących się obecnością złogów włókniaka (na otrzewnej, osierdziu, workach powietrznych, torebce wątroby), stany zapalne skóry i tkanki podskórnej (cellulitis) itd., to należałoby uzupełnić tabelę 2 o obserwowane zmiany sekcyjne. Kilka szczepów było izolowanych z tchawicy – jakie zmiany sugerujące kolibakteriozę były obserwowane w tchawicy? Czy na pewno to izolaty APEC? Szczepy *E.coli* można uznać za APEC jeśli powodują sepsę – reizolacja z narządów mięsnych – w czasie sekcji nietrudno o kontaminacje komensalnymi szczepami z przewodu pokarmowego, izolaty z tchawicy to zapewne komensale z kurzu. Warto zastanowić się również nad dodatkową informacją czy z pobranych narządów wyrastał wyłącznie szczep *E.coli*, czy izolowano także inną mikroflorę. Uzupełniona w ten sposób tabela nie będzie budzić wątpliwości recenzentów powstałej w przyszłości publikacji.

3. Czy przy wykonywaniu badań PCR w kierunku genów zjadliwości i oporności korzystano z kontroli dodatnich? Bez kontroli dodatnich dla poszczególnych genów, trudno zweryfikować negatywne wyniki reakcji - nie ma pewności że reakcja przebiegła prawidłowo i brak prążka jest efektem braku genu. Wyłącznie obecność prążka w kontroli pozytywnej i brak w pozostałych próbkach może potwierdzić prawidłowość przeprowadzonej reakcji PCR. W przypadku reakcji pozytywnych, zbliżona wielkość produktu jest niewystarczająca, jednakże uzyskany produkt można sekwencjonować i porównać z wynikami w dostępnych bazach (np. GenBank). W trakcie przygotowania wyników do publikacji należy bezwzględnie uzupełnić informacje na temat kontroli pozytywnych reakcji, by uniknąć wątpliwości co do wiarygodności uzyskanych wyników.

4. Recenzent rozumie, iż w ocenie profilu lekooporności Doktorantka korzystała z „komercyjnych płytek antybiogramowych zaprojektowanych przez Laboratorium weterynaryjne Vet-Lab Budzew których produkcja została zlecona niemieckiej firmie Merlin Diagnostyka GmbH”, jednakże należy sprawdzić, czy wszystkie użyte leki służą do zwalczania zakażeń *E.coli*. W rozdziale 1.6.4 „Leczenie kolibakteriozy u drobiu” Doktorantka prawidłowo wymienia grupy leków używanych w zwalczaniu choroby: fluorochinolony, polimyksyny, sulfonamidy, tetracykliny, antybiotyki betalaktamowe i fenikole i opisuje ich zasady działania, skąd więc w



badaniach użycie szerszej palety leków np. makrolidów? Użycie do badań substancji przeciwbakteryjnych niestosowanych do zwalczania *E.coli* prowadzi do błędnych wniosków na temat lekooporności szczepów. Przed przygotowaniem publikacji należy zweryfikować otrzymane wyniki pod kątem substancji używanych do zwalczania *E.coli* ze szczególnym uwzględnieniem tych używanych u drobiu.

5. W rozdziałach „Wyniki” i „Dyskusja” konieczne jest zweryfikowanie danych dotyczących odsetka izolatów, gdyż doszło do błędów w obliczeniach i tym samym w przedstawieniu wyników na rycinach (np. wśród 3 badanych szczepów pochodzących od kur reprodukcyjnych 20% szczepów wytwarzało hemolizynę, co daje 0,6 szczepu). Pomocne byłoby stworzenie tabeli z liczbami szczepów i następnie odsetkami. Poprawek wymagają więc ryciny 2 i 3.

Poza wyszczególnionymi uwagami, występują również mniejsze niedociągnięcia wymagające poprawek przed przygotowaniem publikacji:

Nie wszystkie wymienione przez Doktorantkę substancje przeciwbakteryjne to antybiotyki – antybiotyk to substancja pochodzenia naturalnego, natomiast sulfonamidy czy fluorochinolony nie są antybiotykami. W pracy należałoby używać określenia „antybiotyki i chemioterapeutyki” lub „substancje przeciwbakteryjne”. Doktorantka nie jest lekarzem weterynarii, stąd liczne błędy w terminologii lekarsko-weterynaryjnej.

Wstęp:

Str. 14. Czym są podłoża diagnostyczno-wybiórcze?

Str. 28. Należy przereklamować niezrozumiałe dla czytającego zdanie „Chorobotwórcze szczepy *E. coli* stanowią nie tylko bezwzględne patogeny jelitowe (IPEC), ale mogą występować również jako patogeny pozajelitowe (ExPEC, ang. *Extraintestinal pathogenic E. coli*), należące do prawidłowej flory jelitowej organizmu, gdzie bytują jak komensale”

Str. 29. Zakażenie kolibakteriozą – należy zmienić gdyż zakażenie dotyczy patogenu *E.coli*. Nie można zakazić się chorobą – kolibakteriozą

Str. 29. „wysycenie powietrza drobnoustrojami chorobotwórczymi” – należy zmienić na „obecność drobnoustrojów chorobotwórczych w powietrzu”, pojęcie wysycenie jest terminem chemicznym a nie mikrobiologicznym



Str. 29. Część zdań jest prawdopodobnie niewłaściwie przetłumaczonych z języka angielskiego.

Należy przeredagować zdania:

„bakterie dobrze namnażają się na zarodkach kurzych, co przy wadliwej dezynfekcji jaj wylęgowych skutkuje zakażeniem pęcherzyka żółtkowego w końcowym okresie inkubacji”

„Patogenne szczepy *E.coli* zanieczyszczające skorupy jaj są odpowiedzialne za zwiększoną śmiertelność piskląt nawet do wieku 3 tygodni”

Niuanse dotyczą także terminologii weterynaryjnej – ptaki spożywają paszę, nie karmę, brak całkowitego zrostu powłok, nie brak końcowego zrostu, zakażenie *E.coli*, nie zarażenie (zarażenie dotyczy pasożytów), ogniska martwicy, nie guzki martwicze, oraz „płyn włóknikowy”, u kurcząt brojlerów nie ma ras – są linie, układ rozrodczy, nie narząd rozrodczy (str 30-40).

Materiały i metody:

Str. 49. Czy szczepy przechowywano w kriobankach komercyjnych? Czym są szklane kulki w roztworze krioprotektantu i czy są przeznaczone do zabezpieczania szczepów?

Zdaniem Recenzenta zbędne jest opisanie protokołu izolacji DNA komercyjnego zestawu do izolacji oraz dokładny opis oceny wyizolowanego materiału genetycznego (zamiast szczegółowej tabeli 12, wystarczyłoby podać zakres uzyskanych stężeń DNA)

Str. 60. Recenzenta ciekawi ocena ilości preparatu (ilości DNA?) przez „porównanie intensywności fluorescencji badanego prążka do zastosowanego markera” – nie ma niestety w wynikach żadnych dalszych informacji na ten temat. Intensywność fluorescencji zależy od wielu czynników, ilości matrycy, primerów, obecności czynników inhibitujących reakcje itp.

Wyniki:

Str. 85 Ryc. 7 – słaba jakość zdjęcia – prążki dla Stx1 niewidoczne na wydruku

Str. 87 Ryc. 9 – Słabo rozdzielone prążki utrudniające prawidłowy odczyt wielkości produktów

Dyskusja:

Str. 96 „W prezentowanej pracy doktorskiej przeprowadzona szczegółowa ocena wrażliwości izolatów *E. coli* na 25 antybiotyków, wykorzystywanych najczęściej w leczeniu drobiu..”

nie wszystkie analizowane substancje stosuje się do zwalczania *E.coli*, a tym bardziej u drobiu





Str. 97 Chiny i Brazylia nie są krajami trzeciego świata – Chiny to czołówka technologiczna i w obu krajach nastąpił duży rozwój w ostatnich latach. Oba kraje mają dużo wyższy produkt krajowy brutto niż Polska.

Proponuję usunięcie punktów 6 i 7 z rozdziału „Wnioski”, gdyż nie odnoszą się w żaden sposób do uzyskanych przez Doktorantkę wyników.

**Podsumowując, mimo wymienionych niedociągnięć Doktorantka uzyskała wiele wartościowych wyników, które należy opracować pod kątem przyszłych publikacji naukowych uwzględniając życzliwe uwagi recenzenta.**

Zaprezentowana dysertacja spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego przedkładam wniosek o dopuszczenie mgr inż. Izabelli Jagiello-Podębskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Andrzej Gawęł