

dr hab. Kinga Wieczorek, prof. nadzwyczajny  
Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach

## OCENA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Anny Dudzic

**pt. „Ocena właściwości litycznych bakteriofagów swoistych dla *Escherichia coli* i *Campylobacter* spp. izolowanych z przewodu pokarmowego ptaków”**

**przygotowanej w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków, Instytutu  
Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
pod kierunkiem dr hab. Renaty Urban-Chmiel, prof. nadzwyczajnego UP w Lublinie**

W ostatnich latach obserwowany jest stały wzrost oporności bakterii na antybiotyki i dotyczy to zarówno drobnoustrojów izolowanych od zwierząt jak i ludzi. Oporność na niektóre grupy substancji przeciwbakteryjnych wśród drobnoustrojów izolowanych od zwierząt sięga nawet 90%, czego przykładem może być oporność *Campylobacter* na fluorochinolony. W związku z powyższym istnieje silna potrzeba poszukiwania alternatywnych metod zwalczania infekcji bakteryjnych a jedną z takich metod może być zastosowanie bakteriofagów. W badaniach z tego zakresu bardzo dobrze wpisuje się przedstawiona do oceny praca. Dotyczy ona charakterystyki fagów swoistych dla *E. coli* oraz *Campylobacter*. Praca ma duże walory poznawcze ze względu na izolacje fagów i określenie ich miana oraz zakresu gospodarza. Ponadto może też mieć znacznie aplikacyjne w zakresie zastosowania wyizolowanych fagów w ograniczeniu występowania wyżej wymienionych drobnoustrojów u drobiu. Dodatkowo, tego typu badania pozwalają na lepsze poznanie dynamiki rozprzestrzenienia się populacji *E. coli* oraz *Campylobacter* bytujących u drobiu. Zakres badań prezentowanych w pracy nie dotyczy tylko oceny właściwości litycznych fagów, ale jest bardzo szeroki i obejmuje m.in. izolację bakterii, ocenę ich lekowrażliwości, a także izolację i analizę morfologiczną fagów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w prezentowanej pracy potraktowano omawiany problem bardzo szeroko, a dodatkowo badania oparto na samodzielnie wyizolowanych szczepach bakteryjnych i bakteriofagach. Szczególnie izolacja fagów *Campylobacter* nie jest zadaniem łatwym ze względu na to, że drobnoustrój ten wymaga dość specyficznych warunków hodowli, a częstotliwość występowania fagów jest niewielka. Pomimo tego uzyskano fagi należące do dwóch różnych rodzin, z których fagi

swoiste dla *Campylobacter*, należące do rodziny *Siphoviridae* wyosobniono po raz pierwszy. Warto zaznaczyć, że dobór zastosowanych metod i zakres prowadzonych badań był dobrze przemyślany. Ponadto, szersze potraktowanie tematu pozwoliło na bardziej wnikliwą analizę zagadnienia, a tym samym zwiększyło wartości poznawcze pracy. Skuteczne zastosowanie fagów do ograniczenia występowania bakterii jest możliwe jedynie dzięki odpowiedniemu ich doborowi, dlatego tak istotne są badania dotyczące kompleksowej charakterystyki bakteriofagów, które są tematem prezentowanej do oceny pracy.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma układ typowy dla takich opracowań i liczy łącznie 127 stron maszynopisu. Składa się ona z następujących części: strona tytułowa, podziękowania, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wykaz tabel i rycin, wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo (łącznie 130 pozycji), a także streszczenie w językach polskim i angielskim. Ponadto w pracy umieszczono 24 ryciny oraz 16 tabel.

Tytuł pracy doktorskiej w sposób jasny i zwięzły przedstawia zasadniczy cel prowadzonych badań oraz wskazuje na jakim materiale były one prowadzone. We wstępie przedstawiono natomiast podstawowe informacje na temat bakteriofagów, w tym dane dotyczące ich odkrycia oraz taksonomii ze szczególnym uwzględnieniem rzędu *Caudovirales*. Szczegółowo opisano także cykle życiowe bakteriofagów. Ponadto przedstawiono informacje na temat korzyści i trudności jakie mogą wynikać z zastosowania fagów w leczeniu ludzi i zwierząt, a także ich wykorzystania w hodowli drobiarskiej oraz przy produkcji żywności. Dwa podrozdziały poświęcono na omówienie infekcji wywoływanych przez *E. coli* oraz *Campylobacter*. Łącznie „Wstęp” liczy 24 strony i jego objętość jest właściwa dla całości rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, że podrozdziały „Wstępu” w sposób syntetyczny i staranny przedstawiają poszczególne zagadnienia, a omawiane treści uzupełniono pasującymi do nich dwiema tabelami i również dwiema rycinami. Całość poparto właściwie dobranym piśmiennictwem. Świadczy to o dobrym przygotowaniu teoretycznym autora, w tym znajomości aktualnego piśmiennictwa z omawianego tematu.

Kolejną częścią rozprawy jest jasno sformułowany jej cel, który został dodatkowo podzielony na 3 główne etapy prowadzonych badań. Pozwala to na pełne zrozumienie istoty celu podjętych badań, a także założonego sposobu ich realizacji. Należy zaznaczyć, że przyjęta kolejność prowadzonych badań jest w pełni uzasadniona.

W rozdziale „Materiał i metody” zawarto szczegółowe informacje na temat zastosowanych pożywek mikrobiologicznych. Ponieważ są one stosowane rutynowo w



hodowli drobnoustrojów, a także zawierają dane producentów oraz numery katalogowe. Zbędnym wydaje się podawanie ich składu. Na kolejnych stronach tego rozdziału zawarto informacje na temat pozostałych odczynników i testów diagnostycznych stosowanych w badaniach, a także w sposób przejrzysty opisano zastosowaną metodykę badawczą. Przedstawiono między innymi kolejne etapy izolacji *E. coli* oraz *Campylobacter*. W sposób szczegółowy zaprezentowano izolację bakteriofagów oraz określenie ich aktywności litycznej. W pracy zastosowano bardzo różnorodne metody badawcze takie jak transmisyjna mikroskopia elektronowa, PCR, spektrometria mas MALDI-TOF oraz technikę mikrorozcieńczeń do oceny profilu antybiotykooporności *E. coli* oraz *Campylobacter*. Wykorzystano także szereg metod niezbędnych do namnażania bakteriofagów, miareczkowania oraz zagęszczania lizatu fagowego, a także oznaczania miana i określania spektrum aktywności litycznej fagów. Tak różnorodny panel zastosowanych metod badawczych pozwolił na kompleksową charakterystykę szczepów bakteryjnych oraz bakteriofagów. Ponadto przyjęta metodyka badań pozwala na dogłębne i rzetelne zrealizowanie celu pracy. Wymagało to od Doktorantki dużego zaangażowania i nakładu zarówno pracy jak i czasu związanego najpierw z poznaniem poszczególnych metod, a następnie z doskonaleniem umiejętności ich wykonania i przeprowadzenia niezbędnych modyfikacji w toku badań. Zakres metod badawczych zastosowanych w pracy świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu technicznym Doktorantki do pracy laboratoryjnej, ponieważ niektóre z nich, w tym techniki związane z charakterystyką bakteriofagów, wymagają dużego doświadczenia i wiedzy z tego zakresu. Należy jednak dodać, że w omawianym rozdziale zabrakło informacji na temat sposobu wykonania analizy skupień bakteriofagów swoistych dla *E. coli*, która została umieszczona w rozdziale „Wyniki”.

Realizację poszczególnych celów badawczych przedstawiono w kolejnym rozdziale („Wyniki”). Można go podzielić na dwie nieformalne części. Pierwsza z nich opisuje izolację i charakterystykę szczepów *E. coli* i swoistych dla nich fagów, a druga dotyczy tych samych zagadnień, ale w odniesieniu do *Campylobacter*. W trakcie badań wyizolowano 96 szczepy *E. coli* oraz 34 lizaty fagowe. W wyniku analizy biochemicznej uzyskano 9 różnych profili w obrębie badanych szczepów oraz wykazano, że najwięcej z nich charakteryzowało się opornością na fluorochinolony. W prezentowanych wynikach zabrakło informacji dotyczącej czy i w jakim zakresie stwierdzono wielooporność oraz jakie profile oporności zidentyfikowano w badanej grupie *E. coli*. Uwaga ta dotyczy również przedstawionych w dalszej części wyników badań dotyczących oceny wrażliwości na wybrane antybiotyki *Campylobacter*. W dalszych etapach pracy Doktorantka oznaczyła m.in miano bakteriofagów

*E. coli*, które wahało się w zakresie od  $1,2 \times 10^5$  do  $2,8 \times 10^{11}$  pfu/ml. Ponadto na podstawie analizy morfologii bakteriofagów, zaklasyfikowano je do dwóch rodzin w obrębie rzędu *Caudovirales*. Analiza została udokumentowana poprzez zamieszczenie w pracy zdjęć z mikroskopu elektronowego preparatów wybranych fagów. W wyczerpujący sposób przedstawiono także wyniki badań będących głównym celem pracy, czyli zakres działania litycznego bakteriofagów. Ważnym i dobrze udokumentowanym elementem prowadzonych badań była analiza wielkości fragmentów restrykcyjnych genomów fagów swoistych dla *E. coli* oraz *Campylobacter*. Dla pierwszej grupy szczepów, na podstawie jej wyników wykonano dodatkowo analizę skupień profili restrykcyjnych. W przypadku fagów swoistych dla *Campylobacter* nie była ona możliwa ze względu na zbyt małą liczbę izolatów. Jak wspomniano wyżej, druga część prezentowanych wyników dotyczyła *Campylobacter* i swoistych dla nich fagów. W ramach prowadzonych badań 31 szczepów na podstawie testu PCR zaklasyfikowano do gatunku *C. jejuni* oraz 17 zidentyfikowano jako *C. coli*. W kolejnym etapie prowadzonych badań Doktorantka określiła wrażliwość tych izolatów na wybrane antybiotyki. Zaskakujący wydaje się być otrzymany bardzo wysoki odsetek szczepów opornych na gentamycynę, chloramfenikol oraz erytromycynę, nienotowany w dotychczas publikowanych pracach. W dalszych częściach pracy Doktorantka prezentuje wyniki badań związane z izolacją bakteriofagów swoistych dla *Campylobacter* (uzyskano 4 takie fagi) oraz oznaczeniem ich miana, aktywności litycznej, analizy morfologicznej, a także zakresu gospodarza. Ponadto wykonano analizę wielkości fragmentów restrykcyjnych z zastosowaniem 4 enzymów. Wszystkie wspomniane wyżej wyniki zostały w sposób wyczerpujący i bardzo staranny udokumentowane w postaci rycin i tabel. Wskazują one niską częstotliwość występowania fagów swoistych dla *Campylobacter*, a także na niskie miano wyizolowanych fagów (od  $10^1$  do  $10^3$  pfu/ml). Bakteriofagi te charakteryzowały się jednak szerokim spektrum litycznym. Ponadto, o czym wspomniano już wyżej zostały one zaklasyfikowane do dwóch różnych rodzin.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka omówiła na 10 stronach maszynopisu uzyskane wyniki odnosząc je do aktualnych danych dostępnych w piśmiennictwie. W sposób systematyczny i przejrzysty komentuje Ona poszczególne zagadnienia wykazując się znajomością aktualnego piśmiennictwa oraz bardzo dobrymi umiejętnościami we właściwym doborze cytowanych pozycji. Należy jednak zaznaczyć, że niektóre stwierdzenia powinny być poddane weryfikacji. Trochę na wyrost wydaje się być wniosek, mający co prawda potwierdzenie w literaturze, ale nie wynikający bezpośrednio z prowadzonych badań, że bakterie należące do gatunków *E. coli* oraz *C. jejuni* i *C. coli* występują powszechnie w



zróznicowanych środowiskach hodowlanych. Zbyt daleko idący jest również wniosek, że bardzo wysoki odsetek szczepów *Campylobacter* opornych na erytromycynę „wynika ze wzrastającego zjawiska lekooporności wśród tych szczepów w efekcie powszechnego stosowania tego antybiotyku w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych u ludzi”. W oparciu o uzyskane wyniki sformułowano 6 wniosków, które w syntetycznej formie podsumowują pracę i nawiązują do jej celu.

Oprócz przekazanych wyżej uwag należy także wspomnieć o pewnych niedociągnięciach natury stylistyczno-edytorskiej jakich nie ustrzegła się Doktorantka podczas pisania pracy. Ich korekta pozwoli według Recenzenta na poprawę przejrzystości pracy. Są to:

1. Str. 12 jest „tufusu” powinni być tyfusu.
2. Str. 22, ryc. 2, schemat powinien mieć opisy w języku polskim, dodatkowo jest zbyt mały.
3. Str. 22, brak zacytowania właściwej pozycji piśmiennictwa przy stwierdzeniu „Dane statystyczne opublikowane...”
4. Str. 29, jest „w zakresie mian od  $10^6$  do  $10^3$  pfu/ml” powinno być od  $10^3$  do  $10^6$  pfu/ml.
5. Str. 36, powinien być skrót EFSA, a nie pełna nazwa, która jest wyjaśniona na str. 22.
6. Str. 38, sformułowanie „surowców konsumpcyjnych” można zastąpić słowem żywność.
7. Str. 48, bardziej precyzyjne byłoby podanie liczby godzin inkubacji, zamiast sformułowania „przez całą noc”.
8. W rozdziale „Materiał i metody” wskazane byłoby dodanie wykazu szczepów referencyjnych i materiałów odniesienia stosowanych w badaniach.
9. Str. 63, jest „przy użyciu barwienia Grama” bardziej właściwe byłoby „przy użyciu barwienia metodą Grama”.
10. Str. 106, sformułowanie „nieco słabsze rezultaty” jest mało precyzyjne.

Wspomniane wyżej uwagi nie mają jednak istotnego wpływu na całościową bardzo dobrą ocenę przygotowanej rozprawy doktorskiej.

W posumowaniu pragnę podkreślić, że Doktorantka podjęła się opracowania trudnego i wymagającego dużej wiedzy teoretycznej, a także wysokich umiejętności i doświadczenia w pracy laboratoryjnej tematu. Recenzowana rozprawa doktorska znacząco pogłębia wiedzę z zakresu bakteriofagów swoistych dla *E. coli* oraz *Campylobacter*, a izolowanych z przewodu pokarmowego ptaków. Lekarka weterynarii Anna Dudzic w sposób jasny formułowała cel główny pracy oraz poszczególne zagadnienia badawcze. Prawdłowo dobrała metody, które pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników. Dokumentacja badań w postaci rycin i tabel

została wykonana starannie, a przy omawianiu wyników Doktorantka wykazała się znajomością aktualnego piśmiennictwa.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani lekarz weterynarii Anny Dudzic pt. „*Ocena właściwości litycznych bakteriofagów swoistych dla Escherichia coli i Campylobacter spp. izolowanych z przewodu pokarmowego ptaków*” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, i przekazuję Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysokie walory wnioskuję w wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Puławy, 18.08.2015

dr hab. Kinga Wieczorek, prof. nadzwyczajny