

Prof. dr hab. Andrzej Wernicki
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 24.08.2015r.

Ocena rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Anny Dudzic pt. „Ocena właściwości litycznych bakteriofagów swoistych dla *Escherichia coli* i *Campylobacter* spp., izolowanych z przewodu pokarmowego ptaków”, wykonanej w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków, Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt pod opieką naukową Pani dr hab. Renaty Urban-Chmiel, prof. nadzw. UP w Lublinie

Odkrycie substancji antybakteryjnych miało na zawsze ograniczyć występowanie groźnych dla zdrowia i życia infekcji. Od czasu odkrycia w roku 1928 penicyliny przez Alexandra Fleminga, wprowadzono do lecznictwa ludzi i zwierząt wiele nowych antybiotyków. Ich nadmierne, często nieuzasadnione stosowanie i nieodpowiednie dawkowanie stało się przyczyną wielu nieoczekiwanych problemów współczesnej medycyny i weterynarii. Najpoważniejsze z nich, to stale rosnąca liczba drobnoustrojów opornych na stosowane antybiotyki, w tym także leki ostatniej szansy. Zjawisko to, dotyczy obecnie wszystkich gatunków bakterii, a także w mniejszym lub większym stopniu stosowanych antybiotyków. W tej sytuacji niezbędnym wydaje się ściśle przestrzeganie rygorów skutecznej i bezpiecznej antybiotykoterapii, prowadzenie nadzoru i kontroli lekooporności, drobnoustrojów izolowanych od ludzi i zwierząt przeznaczonych do produkcji żywności, zwierząt domowych, wolnożyjących, środowiska bytowania, a także poszukiwanie nowych metod walki z bakteriami. Opracowywane strategie obejmują głównie działania na rzecz zakazu stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych jako stymulatorów wzrostu zwierząt oraz opracowanie dobrych praktyk hodowlanych, ograniczających ryzyko wystąpienia lekooporności. Niezbędne jest także zwiększenie potencjału badawczego w doskonaleniu genetycznym zwierząt celem identyfikacji markerów związanych ze wzmacnianiem odporności wrodzonej, poszukiwaniu nowych środków przeciwdrobnoustrojowych, badań nad rolą bakterii występujących u zwierząt w przenoszeniu lekooporności na florę bakteryjną występującą u ludzi i badań

potencjalnego ryzyka z tym związanym oraz innych strategii profilaktyki i leczenia chorób zakaźnych zwierząt.

Aktualnie realizowane strategie związane z przewycięzeniem oporności na antybiotyki opierają się na alternatywnym w stosunku do antybiotyków wykorzystaniu bakteriofagów, ich enzymów litycznych, nowych szczepionek, białek lub peptydów wykazujących właściwości bakteriobójcze lub bakteriostatyczne, a syntetyzowanych przez bakterie, rośliny, bezkręgowce, kręgowce i ssaki. Dotychczas opisano około tysiąca takich substancji, wśród których najważniejszą grupą z punktu widzenia możliwości wykorzystania terapeutycznego są stabilizowane cysteiną, peptydy kationowe, nazywane naturalnymi antybiotykami, a także substancje pro-, pre- oraz symbiotyczne korzystnie wpływające na organizm gospodarza poprzez potęgowanie rozwoju prozdrowotnych mikroorganizmów jelitowych i eliminację szczepów patogennych. Innym sposobem istotnego zmniejszenia stosowania antybiotyków jest stosowanie terapii fotodynamicznej, nanocząsteczek srebra oraz bakteriofagów, które stanowią ważną alternatywę dla konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych.

Bakteriofagi, stosowane jako środki lecznicze, mają wiele zalet w stosunku do konwencjonalnych metod leczenia. Stosowane w terapii *Campylobacter jejuni* brojlerów zastosowano po raz pierwszy w 2005 r., przez Wagenaar i wsp., oraz Loc Carrillo i wsp. Niezaprzeczną zaletą zastosowanej terapii jest obecność fagów w tym samym środowisku, łatwość izolacji, specyficzność, a tym samym nie niszczenie prawidłowej, fizjologicznej flory jelit. Ponadto, rozprzestrzeniają się samodzielnie i ustępują samoistnie, mnożąc się tak długo, jak wrażliwe są obecne bakterie. Ogólną liczbę bakteriofagów w biosferze zdefiniowanych jako wirusy mogące infekować i zabijać bakterie, szacuje się na około 10^{31} (Hendrix i wsp. 1999).

Oprócz terapeutycznego zastosowania bakteriofagów, są one także wykorzystywane w celach profilaktycznych zmniejszenia liczby patogenów w żywności, takich jak np. mięso drobiowe oraz jako preparaty wykorzystywane do dezynfekcji środowiska zakładów przetwórstwa istotnie poprawiając bezpieczeństwo żywności.

Campylobacter jejuni i *Campylobacter coli*, odpowiadają za większość przypadków bakteryjnego zapalenia żołądka i jelit u ludzi. W Wielkiej Brytanii np. w roku 2009, wg danych Europejskiego Urzędu Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority), odnotowano ponad 65 000 zgłoszonych przypadków, z czego ponad 195 000 w całej Unii Europejskiej przy czym rzeczywista liczba przypadków

wg Strachan i Forbes, 2010 może być znacznie większa osiągając około 450 000 w Wielkiej Brytanii.

Recenzowana rozprawa doktorska, przedstawiona jest, w formie oprawionego wydruku komputerowego, ma układ typowy dla tego typu opracowań przygotowywanych na stopień naukowy doktora. Dysertacja napisana jest poprawną polszczyzną z prawidłowym użyciem terminologii fachowej. Liczy 127 stron maszynopisu, w którym wyodrębniono; wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, które poza częścią opisową zilustrowano 24 rycinami oraz 16 tabelami, 10 stronicową dyskusję, wnioski w liczbie sześciu oraz wykaz wykorzystanego piśmiennictwa, które obejmuje 130 pozycji aktualnych publikacji w zdecydowanej większości anglojęzycznych, z których 41 pozycji stanowią prace zamieszczone w czasopismach opublikowanych po roku 2008, co potwierdza aktualność podjętej przez Autorkę problematyki badawczej oraz świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym doktorantki do realizacji założonych celów badawczych. Rozprawę kończy jednostronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim.

Manuskrypt rozpoczyna wykaz skrótów, w którym Doktorantka popełniła wiele błędów, które naniesiono w egzemplarzu pracy będących w posiadaniu recenzenta. Wykaz należy także wzbogacić o skróty takie jak MIC, FDA, EFSA, ETEC. W liczącym 27 stron „Wstępie” Autorka na podstawie danych z piśmiennictwa przedstawiła aktualne informacje dotyczące zagadnień związanych z celem wykonanych badań. W siedmiu zamieszczonych podrozdziałach przedstawiła charakterystykę bakteriofagów przedstawiając ich taksonomię, cykle życiowe, zagadnienia terapii fagami ludzi oraz zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem infekcji wywoływanych przez *E. coli* oraz *Campylobacter* spp. a także możliwości wykorzystania fagów w ochronie i konserwacji żywności. W mojej ocenie jest to bardzo poprawna analiza zgromadzonego, aktualnego piśmiennictwa będącego jak sądzę inspiracją do podjęcia badań objętych tematem zrealizowanej rozprawy doktorskiej. Wskazuje to także na zrozumienie oraz wnikliwą analizę zagadnień tematycznie związanych z wykonaną pracą doktorską.

Za cel badań, Doktorantka postawiła sobie izolację oraz charakterystykę morfologiczną i molekularną bakteriofagów swoistych dla *E. coli* oraz *Campylobacter* spp., izolowanych od drobiu ze zróżnicowanych środowisk hodowlanych. Celem pracy była ponadto ocena aktywności litycznej oraz spektrum działania

bakteriobójczego uzyskanych fagów. W mojej ocenie z celu pracy należy wyeliminować izolację i charakterystykę fagów izolowanych od innych gatunków zwierząt gospodarskich, gdyż ten aspekt badań został potraktowany w pracy dość fragmentarycznie.

W rozdziałach „Materiał” i „Metody”, Doktorantka w syntetyczny sposób przedstawiła skład zastosowanych podłoży mikrobiologicznych, buforów, testów biochemicznych, innych materiałów wykorzystanych w badaniach oraz opis technik stosowanych w ich realizacji. Przyjęty przez układ doświadczenia jak też zastosowane metody izolacji i identyfikacji *E. coli*, *Campylobacter* spp., wykorzystujące metodę spektrometrii mas MALDI-TOF oraz swoistych bakteriofagów oceniam bardzo pozytywnie. Uważam, że zastosowane metody gwarantowały prawidłową realizację badań, a tym samym prawidłową analizę uzyskanych wyników. Uwaga recenzenta do tej części pracy dotyczy braku informacji dotyczącej powiększenia zastosowanego w mikroskopie elektronowym.

Uzyskane przez Autorkę wyniki badań zostały przedstawione na 38 stronach maszynopisu. Przy ich prezentacji Doktorantka posługuje się formą opisową oraz graficzną, ujętą w formie tabelarycznej i bardzo dobrej jakości fotografii. Uwaga recenzenta dotyczy ryc.6, str. 67, która nie jest zgodna z opisem, z uwagi na brak łysinek szczepu referencyjnego. Mało czytelny jest także obraz ryc. 7 (str.68).

Bardzo pozytywnie oceniam rozdział - „Dyskusja”, w którym Doktorantka wykazała dużą znajomość zawartej w pracy problematyki badawczej. Swobodnie konfrontuje uzyskane wyniki badań własnych z najnowszymi danymi piśmiennictwa, precyzyjnie, a zarazem wielostronnie ustosunkowuje się do analizowanych zjawisk. W ocenach tych jest obiektywna, nierzadko nawet krytyczna, co dobrze rokuje w jej przyszłej pracy naukowej. Tekst mimo złożoności poruszanej problematyki jest ponadto bardzo łatwy w odbiorze przez czytającego.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły Autorce na wyciągnięcie 6 wniosków, które w większości obejmują zagadnienia zawarte w pracy. W mojej ocenie, zarówno kolejność jak i treści zawarte w niektórych wnioskach należy poddać modyfikacji. Np. zasadność wniosku pierwszego nie znajduje potwierdzenia w materiałach i metodach, gdyż izolowane szczepy pochodziły z środowisk hodowlanych, a nie jak to wynika z treści wniosku z produktów drobiarskich przeznaczonych do konsumpcji dla ludzi. Także wniosek szósty nie wynika z analizy wyników uzyskanych ze zrealizowanej pracy doktorskiej, a z analizy piśmiennictwa.

Krytyczne uwagi zawarte w ocenie dysertacji doktorskiej nie mają wpływu na jej wysoką ocenę merytoryczną. Doktorantka wywiązała się w sposób bardzo zadawalający z realizacji podjętych badań zawartych w założeniach i celach pracy. Koncepcja badań jest nowatorska, a uzyskane wyniki posiadają znaczący aspekt poznawczy i praktyczny. Zaplanowany zakres badań został zrealizowany w sposób właściwy, przy zastosowaniu nowoczesnych metod badawczych.

W oparciu o powyższe, podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza jest zagadnieniem niezwykle aktualnym i uzasadnionym, mającym zarówno walory poznawcze jak i aspekty aplikacyjne istotne z punktu widzenia lekarsko-weterynaryjnego.

Dostrzeżone nieścisłości zostały naniesione w recenzowanym egzemplarzu pracy do ewentualnego wykorzystania przez Autorkę przy przygotowaniu pracy do druku. Reasumując należy stwierdzić, że przedłożona do recenzji praca doktorska, pomimo przedstawionych uwag krytycznych prezentuje wysoką wartość merytoryczną. Na podstawie przedstawionej oceny stwierdzam, że Doktorantka opanowała w pełni zasób wiedzy, pozwalający na realizację badań w zakresie wymaganym od pracownika ze stopniem naukowym doktora, a oceniana praca doktorska posiada dużą wartość naukową i praktyczną.

Pomijając niedociągnięcia, łatwe do skorygowania przed opublikowaniem pracy stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Ocena właściwości litycznych bakteriofagów swoistych dla *Escherichia coli* i *Campylobacter* spp. izolowanych z przewodu pokarmowego ptaków” dostarcza podstaw dla uzasadnionego wniosku, że Autorka wykazała znajomość przedmiotu, korzysta swobodnie z aktualnego piśmiennictwa, umiejętnie dobierając i kojarząc fakty potrafi również swobodnie posługiwać się odpowiednimi technikami, a także formułować poprawnie wnioski. W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Anny Dudzic do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnoszę o wyróżnienie ocenianej dysertacji stosowną nagrodą JM Rektora UP w Lublinie.

Prof. dr hab. Andrzej Wernicki