

prof. dr hab. Dariusz Wasyl

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Mikrobiologii, Zakład Analiz Omiczych

Al. Partyzantów 57

24-100 Puławy

**Recenzja rozprawy doktorskiej dr n. farm. Tomasza Nowaka pt. „Identyfikacja i charakterystyka antygenowa oraz profile lekowrażliwości i wirulencji szczepów *Erysipelothrix rhusiopathiae* izolowanych od drobiu wodnego w Polsce”**

**promotor: dr hab. Marta Dec, prof. uczelni**

Podstawa formalna: Uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (pismo RD/Wet/5100-6/2022 z dnia 30 czerwca 2023).

**1. Ocena rozprawy doktorskiej na zgodność z wymogami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668, ze zmianami)**

Układ rozprawy jest typowy dla monografii, która liczy 162 strony i obejmuje wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusję i wnioski. Praca jest zaopatrzona w wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. W rozdziałach dotyczących materiału i metod oraz wyników umieszczono liczne tabele i ryciny.

Zawarte we wstępie elementy potwierdzają ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie weterynaria. Informacje dotyczące struktury i skali produkcji drobiu wodnego w Polsce, czy też znaczenia różycy jako choroby odzwierzęcej znajdują potwierdzenie w doświadczeniu zawodowym wynikającym również z afiliacji Autora. Dowodem ogólnej wiedzy teoretycznej jest prezentacja przedmiotu badań – włoskowca różycy – w kontekście wywoływanych objawów klinicznych, diagnostyki, identyfikacji zarazka i czynników odpowiedzialnych za jego wirulencję.

Podjętym problemem naukowym rozprawy doktorskiej jest występowanie i diagnostyka różycy drobiu wodnego w Polsce oraz charakterystyka izolatów *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Zaprezentowane dane literaturowe obejmujące zarówno pozycje współczesne, jak i publikacje sięgające lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku, dotyczą głównie kwestii diagnostyki i charakterystyki zarazka w kontekście różycy świń. Ograniczona liczba publikacji na temat różycy drobiu obejmujących głównie opisy przypadków potwierdza, iż podjęty temat badań stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania Art. 187 Ustawy.

**2. Ocena rozprawy doktorskiej dotycząca zakresu i przyjętego sposobu oryginalnego rozwiązania problemu naukowego**

Wysoko oceniam wybór problemu naukowego. Zasadność przeprowadzenia badań potwierdzają również braki w naukowej literaturze przedmiotu oraz ograniczona świadomość

możliwości występowania zakażeń włoskowcem różycy u gatunków innych niż świnia. Za szczególnie cenne postrzegam praktyczne aspekty pracy, wynikające z wieloletnich doświadczeń Autora dotyczących diagnostyki klinicznej i laboratoryjnej różycy ale i innych chorób drobiu. Osobiste doświadczenia Doktoranta wskazują również na ryzyko zawodowe lekarzy weterynarii i hodowców związane z zoonotycznego charakteru zarazka (ryc. 1.3).

Zdefiniowane cele pracy obejmują:

- ocenę sezonowości występowania różycy, z uwzględnieniem grup wiekowych i produkcyjnych obu gatunków ptaków,
- analizę zmian anatomo-patologicznych obserwowanych u zakażonych gęsi i kaczek, a także
- identyfikację i charakterystykę fenotypową i genotypową *E. rhusiopathiae*.

Cele zostały doprecyzowane w dziewięciu celach szczegółowych.

Postawione cele Doktorant realizował z wykorzystaniem ponad 300 próbek – ptaków pochodzących z 99 gospodarstw utrzymujących stada gęsi rzeźnych ( $n = 66$ ), reprodukcyjnych ( $n = 27$ ) oraz nielicznych ( $n=6$ ) stad reprodukcyjnych kaczek badanych w ciągu trzech lat (2019 – 2021). Badaniom sekcyjnym towarzyszyło pobieranie próbek do badań laboratoryjnych obejmujących badania mikrobiologiczne narządów wewnętrznych i tkanek. Wybór wątroby, śledziony, mięśnia sercowego, mózgu i stawów oraz postępowanie przy pobieraniu z nich próbek analitycznych potwierdzają kliniczny charakter badań ukierunkowanych na wykrycie bakteriemii. Hodowle mikrobiologiczne prowadzono z wykorzystaniem nioselektywnych pożywek agarowych inkubowanych w standardowych warunkach w atmosferze z dodatkiem  $CO_2$ . Uzyskane izolaty identyfikowano przy użyciu komercyjnego testu diagnostycznego opartego o technikę Real-Time PCR. Identyfikację grupy około 60 szczepów wybranych do dalszych badań potwierdzono dodatkowo przy użyciu techniki spektrometrii mas MALDI – TOF oraz kolejnego testu komercyjnego – kart GP systemu VITEK® 2. Tą grupę szczepów poddano sero-(geno-)typowaniu techniką PCR i oznaczaniu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe techniką mikrorozcieńczeń w bulionie metodą własną. Charakterystykę genotypową ukierunkowaną na geny oporności i wirulencji wykonano z wykorzystaniem dedykowanych reakcji PCR i sekwencjonowania sangerowskiego otrzymywanych ampikonów. Analizę sekwencji wykonano z zastosowaniem ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych, a same sekwencje zdeponowano w bazie Genbank. Bliżej niesprecyzowaną grupę szczepów poddano charakterystyce genotypowej przy użyciu metody losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD) oraz analizy pozagenowych fragmentów palindromowych (rep-PCR).

Zaproponowane podejście metodyczne jest właściwe dla realizacji planowanych celów, jednakże w ocenie recenzenta:

- w kontekście sezonowości produkcji drobiu wodnego oraz reprezentatywności próbki niewłaściwie sformułowano cel dotyczący sezonowości występowania zakażeń;
- nie przedstawiono danych dotyczących częstości występowania zakażeń drobiu włoskowcem różycy;
- w celach badań nie uwzględniono wątku oceny metod, który zajmuje istotną część prezentacji wyników, dyskusji i wniosków.

Powyższe zastrzeżenia szerzej przedstawiam w polemicznej części recenzji.



Rozdział dotyczący prezentacji wyników stanowi blisko jedną trzecią objętości manuskryptu i zawiera liczne zestawienia tabelaryczne i ryciny, które wyczerpująco obrazują zrealizowane badania. Znacząco mniej obszerny, bo liczący 18 stron rozdział dyskusji wyników Doktorant rozpoczyna analizą występowania różnicy i potencjalnych źródeł zarazka. W tym kontekście ponownie uwidacznia się wspomniany wcześniej brak prezentacji własnych obserwacji dotyczących częstości występowania zakażeń drobiu wodnego włoskowcem różycy. Stąd też deklarowana zwiększona zachorowalność w sierpniu i wrześniu oparta wyłącznie na liczbie przypadków izolacji ma raczej charakter hipotezy niż stwierdzenia opartego na twardych dowodach naukowych. Tym bardziej, że sierpień nie jest miesiącem, w którym dochodzi do spadku temperatury i wystąpienia czynników pogodowych, które zgodnie z cytowaną literaturą predysponują do wzrostu zachorowalności drobiu na różycę (str. 129).

W kontekście praktycznym szczególnie cenny jest opis dotyczący zmian anatomopatologicznych w przebiegu różycy. Szkoda tylko, iż ten fragment dyskusji Doktorant ograniczył przede wszystkim do przeglądu literatury, deprecjonując niejako szczegółowo przedstawione (tabela 4.2) i udokumentowane fotograficznie (ryciny 4.3 – 4.5) wyniki badań własnych. Ich interpretacja, dotycząca między innymi różnic w obrazie klinicznym obserwowanym u gęsi i kaczek, błędnie stanowi element rozdziału pt. Wyniki, a nie Dyskusja.

Stosunkowo obszerny fragment dyskusji dotyczy oporności włoskowca na środki przeciwdrobnoustrojowe, która określana jest w dysertacji terminami „antybiotykooporność” i „lekooporność” jednoznacznie wskazującymi na praktyczne inklinacje tej części badań. Zastrzeżenia do niej przedstawiłem w części polemicznej recenzji.

Kolejny praktyczny aspekt rozprawy wynika z potwierdzenia rozbieżności struktury genu *spaA* badanych szczepów i szczepu szczepionkowego R32E11. Zawierająca ten szczep szczepionka Eryseng®, zgodnie z kartą charakterystyki produktu leczniczego weterynaryjnego, jest zarejestrowana dla świń jako jedyne gatunku docelowego. Jednakże – jak podaje Doktorant – produkt jest stosowany zgodnie z zasadą „kaskady” u drobiu, przynosząc ograniczone efekty. Istniała zatem przesłanka, iż szczepienie zamiast efektu protekcyjnego, może przyczyniać się do wystąpienia klinicznej różycy gęsi i kaczek. Przedstawione przez Doktoranta wyniki badań jednoznacznie wykluczają taką możliwość. Jednocześnie Autor rozprawy idzie krok dalej i z uwagi na fakt, że geny *spa* kodują antygeny immunoprotekcyjne, formułuje hipotezę dotyczącą braku efektu immunizacji drobiu. Szkoda tylko, że ten aspekt nie został precyzyjnie sformułowany w celach badań.

W kontekście naukowo – poznawczym warto podkreślić, jak zauważa sam Doktorant, unikatowość zebranej kolekcji szczepów. Wynika ona nie tylko z różnorodności stwierdzonych sero-(geno-)typów, ale również liczby zgromadzonych szczepów, których tylko część wykorzystano w badaniach. Daje to możliwość kontynuowania badań naukowych w zakresie szczegółowej charakterystyki i zróżnicowania filogenetycznego populacji *E. rhusiopathiae* przy użyciu aktualnie dostępnych metod sekwencjonowania genomowego, a nie tylko rep-PCR i RAPD, których moc dyskryminacyjną i powtarzalność oceniono w pracy jako ograniczone i niskie. Szczególnie, że przedstawiona w dysertacji pionierska charakterystyka genetycznych podstaw wirulencji wykazała zmienność i zależną od sero-(geno-)typu strukturę genów *spaA/B/C*. Ten aspekt pracy mógłby stanowić element odrębnego rozdziału dysertacji dotyczącego dalszych kierunków badań.



W mojej ocenie najmniejszą wartość poznawczą ma fragment kończący dyskusję, który prezentuje typowanie epidemiologiczne włośkowca przy użyciu rep-PCR i RAPD. Obie techniki znajdowały zastosowanie w charakterystyce niektórych grup bakterii w końcu XX wieku, ale obecnie złotym standardem w dochodzeniach epidemicznych i charakterystyce czynników zakaźnych jest sekwencjonowanie genomowe. Co prawda w dysertacji wykazano przydatność rep-PCR do rozróżnienia szczepów posiadających geny *spaA* i *spaB*, jednak sam Doktorant wskazuje na niską powtarzalność metody RAPD. Ten element badań postrzegam zatem bardziej jako prezentację warsztatu metodycznego Autora niż rzeczywistą możliwość wykorzystania tych technik w dochodzeniu epidemicznym. Fragment ten zwraca jednak uwagę na inną wadę techniczną dysertacji: przy rep-PCR i RAPD Autor wspomina o etapie optymalizacji reakcji PCR (str. 71), który pominięto w przypadku innych etapów badania wykorzystujących technikę PCR.

Dysertację kończy rozdział prezentujący liczne – bo aż dziewięć – rozbudowane wnioski. Zastrzeżenia dotyczące ich treści zawarłem w poniższej polemice.

### **3. Polemika i uwagi krytyczne**

#### Ocena częstości występowania choroby w badaniach epidemiologicznych

„Określenie rozkładu notowanych przypadków różycy (...) w poszczególnych przedziałach roku kalendarzowego” nosi znamiona badań epidemiologicznych realizowanych w celu oceny częstości występowania/prewalencji choroby. Jako takie wymagają opisu liczebności populacji z której pochodzi próba badana. W recenzowanej dysertacji zabrakło informacji dotyczących liczby badanych w laboratorium przypadków zachorowań gęsi i kaczek podejrzanych o wystąpienie choroby. Nie można zatem wykluczyć, że w lutym choroba występowała w 100% stad objętych badaniami (tj. 4/4), a we wrześniu, np. przy hipotetycznych 500 badaniach i 28 izolatach, wartość ta wyniosłaby zaledwie 5,6% (rycina 4.1.A). Zatem okrojony sposób przedstawienia materiałów nie pozwala w pełni zinterpretować wyników.

W nawiązaniu do powyższego oraz szczegółowo przedstawionej we wstępie sezonowości chowu gęsi i kaczek, za niewłaściwy należy uznać cel badań dotyczących występowania przypadków w poszczególnych przedziałach roku kalendarzowego. Wrażenie nieprawidłowości wzmacnia dodatkowo nieprecyzyjne zdefiniowanie tych przedziałów, które w tekście są określane miesiącami lub porami roku (jesień), a w rycinie 4.1.B pojawia się półrocze – okres nieodpowiadający sezonowości chowu gęsi (wylęgi od marca do lipca).

Wsparciem tezy dotyczącej sezonowości występowania zachorowań byłby selektywny wybór szczepów uwzględniający termin ich izolacji. Nie zgadzam się bowiem ze sformułowaniem dotyczącym „reprezentatywnego” wyboru 60 spośród 128 dostępnych szczepów (s. 86, rozdział 4.3.1). Doktorant nie podał kryteriów wyboru, który w mojej ocenie ma charakter arbitralny. Jestem przekonany, że przy wyborze szczepów kierowano się dostępnymi informacjami dotyczącymi ich źródła, objawów chorobowych itp., jednak w pracy zabrakło jednak opisu tego elementu.

#### Oznaczenie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe – lekooporności w kontekście klinicznym

Niezależnie od celu badania – epidemiologicznego czy klinicznego – oznaczenie oporności/antybiotykooporności wymaga zachowania zasad dobrej praktyki laboratoryjnej.



Niezależnie od użytej metody bezwzględnie wymagana jest interpretacja wyników w oparciu o merytorycznie uzasadnione kryteria interpretacji. Niestety, w przypadku wielu patogenów zwierząt kryteria te nie są wyznaczone lub, jak w przypadku *Erysipelothrix rhusiopathiae*, są dostępne dla pojedynczych tylko substancji czynnych. Niedopuszczalne jest jednak „adoptowanie” kryteriów interpretacji nawet jeżeli substancje reprezentują tę samą klasę antybiotyków (str. 60 – 61). Z perspektywy ponad ćwierćwiecza doświadczenia zawodowego recenzenta w obszarze badań nad opornością wynika, że substancje o niemal identycznej strukturze chemicznej mogą diametralnie różnić się właściwościami fizyko-chemicznymi i farmakodynamicznymi. Uzasadnienie wyboru niektórych substancji do monitoringu i wykrywania oporności na określone klasy antybiotyków podają dokumenty techniczne Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności, w których opracowaniu brał udział recenzent (m. in. EFSA Journal 2008, 141: 1-44). Z doświadczeń udziału projektach międzynarodowych (One Health EJP IMPART, ENOVAT Cost Action), których celem było m. in. zgromadzenie danych niezbędnych do wyznaczenia przez EUCAST brakujących kryteriów interpretacji, jasno wynika, iż jest to proces długotrwały, żmudny, niezmiernie selektywny i wymagający udziału co najmniej kilku ośrodków badawczych. Stąd też wniosek 6 dotyczący możliwości wykorzystania danych zawartych w dysertacji przez CLSI czy EUCAST uważam za niezasadny i nieodzwierciedlający wymagań proceduralnych tych organizacji.

W zaistniałej sytuacji możliwe jednak było wykorzystanie dostępnego na stronie EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)) formularza ECOFFinder i próba wyznaczenia kryteriów interpretacji na potrzeby badań własnych. Oczekuję, że Doktorant użyje tego narzędzia do weryfikacji przynajmniej części „zaadoptowanych” kryteriów, a wyniki i wnioski z tej weryfikacji przedstawi w trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej.

Nadinterpretacją wydaje się stwierdzenie, iż jednomodalny rozkład wartości MIC wskazuje na oporność naturalną *E. rhusiopathiae* (str. 100). Do takiego stwierdzenia niezbędne jest wskazanie molekularnych podstaw zjawiska. Może ono wynikać z nabytych mechanizmów oporności u wszystkich badanych szczepów, co jest obserwowane np. przy klonalnym szerzeniu się patogenów, lub błędów metodycznych związanych z np. wrażliwością niektórych substancji czynnych na światło lub zdolnością do ich wiązania się tworzywem sztucznym mikropłytki.

Doktorant nieprecyzyjnie podaje informacje, iż określone geny kodują („nadają”) oporność na określone „antybiotyki”/środki przeciwdrobnoustrojowe (tab. 3.12). Zarówno geny z rodziny *aac*, jak i *aph* kodują, odpowiednio, acetylotransferazy i fosfotransferazy, odpowiadające za oporność krzyżową na całą grupę aminoglikozydów. Z kolei geny *tet* warunkują oporność na tetracykliny, a nie tylko tetracyklinę. Gen *gyrA* koduje gyrazę i nie jest genem oporności. Niezręczne jest pogrupowanie genów wg pozycji piśmiennictwa, a nie klasy substancji przeciwbakteryjnej, czy też niepodanego w tabeli mechanizmu oporności (np. *tetM* – modyfikacja białek rybosomalnych, *tetK* – pompa typu efflux). Genem oporności nie jest również *int-Tn* (tab. 4.10), który koduje integrację transpozonu. Celowe byłoby też uzasadnienie, dlaczego w bezpośrednim sąsiedztwie genów oporności, badaniami objęto również geny integrazy i transpozonów. Podjęcie tego wątku ubogaciłoby dyskusję o horyzontalne szerzenie się mechanizmów oporności.



Z perspektywy epidemiologa zajmującego się opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe niewłaściwe są zawarta we wniosku 4 rekomendacje dotyczące

- stosowania klas antybiotyków o szerokim spektrum działania (np. fenikole) jako pierwszego wyboru w leczeniu różycy, szczególnie gdy Autor nie zwraca uwagi na konieczność wykonania antybiogramu oraz
- leczenia różycy u człowieka, która wykracza poza dziedzinę weterynarii.

Niestety zaprezentowane w dysertacji podejście do problemu oporności bakterii tj. nieprawidłowa interpretacja wyników jej oznaczania i niezgodne ze sztuką rekomendacje terapeutyczne, są stosunkowo powszechne w klinicznym podejściu tak nauk weterynaryjnych, jak i medycznych. Walnie przyczynia się to do nieprawidłowego stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych, których skutkiem jest generowanie oporności i coraz mniejsza skuteczność w leczeniu zakażeń bakteryjnych zwierząt i człowieka.

### Struktura merytoryczna dysertacji

Badania naukowe wymagają precyzyjnego określenia celów, doboru niezbędnych do ich realizacji materiałów i metod, generowania i interpretacji wyników oraz sformułowania wniosków odpowiadających na hipotezy zawarte w celach badań. W recenzowanej rozprawie istnieje pewna rozbieżność pomiędzy wnioskami i celami badań.

Przedstawione wnioski są niezmiernie rozbudowane, zawierają elementy:

- wyników (np. wniosek 1 – „nierównomierny rozkład przypadków różycy”, wniosek 4 – „ze względu na wrażliwość wszystkich badanych szczepów na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe”),
- metod (wniosek 2 – „trzy zastosowane w tych badaniach metody”),
- dyskusji (wniosek 3 w całości, wniosek 4 – „w terapii pierwszego rzutu nie należy brać pod uwagę ...”, wniosek 6 – „rekomendacje” dotyczące klas środków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych w leczeniu różycy).

Zawarte we wnioskach tezy nie znajdują odzwierciedlenia w postawionych celach badań, w szczególności kwestia:

- przydatności metod diagnostycznych do identyfikacji włoskowca różycy (wniosek 2 i 9); Co prawda cele obejmują identyfikację włoskowca, ale nie ocenę metod. We wniosku 9. Doktorant stwierdza iż „metody rep-PCR i RAPD mogą znaleźć zastosowanie w (...) dochodzeniu epidemiologicznym”, pomimo iż wykazał niską moc różnicującą i ograniczoną powtarzalność tych metod;
- rekomendacji terapeutycznych (wnioski 4, 5, 6) przy celach ograniczonych do określenia lekowrażliwości i mechanizmów oporności;
- udostępnienia danych nt. lekowrażliwości organizacjom opracowującym kryteria interpretacji antybiogramów;

Jednym z celów badań było określenie zmienności mechanizmów wirulencji, w tym różnorodności białka SpaA. W dotyczących tego elementu wnioskach 7 i 8 Doktorant nie odpowiada bezpośrednio na to pytanie, a stwierdza jedynie że „określenie genotypowych profili wirulencji nie pozwala na zróżnicowanie szczepów” włoskowca. Dalsza część wniosku 7 oraz wniosek 8, szczególnie część dotycząca opracowania szczepionki przeciwko różycy gęsi i kaczek, nie są właściwymi wnioskami, a stanowią element dyskusji dotyczący dalszych kierunków badań. W mojej ocenie i z doświadczenia recenzenta wynika, że umieszczenie tego

elementu jako odrębnego rozdziału dysertacji byłoby wartością dodaną pracy. Dowiodłoby, że Doktorant nie ogranicza się jedynie do rozwiązania problemu naukowego, lecz perspektywicznie patrzy na możliwości wykorzystania uzyskanych wyników zarówno w obszarze naukowym, jak i praktycznym.

W przypadku uznania powyższych zastrzeżeń za zasadne, proszę o przedstawienie w trakcie obrony pracy doktorskiej przeformułowanych celów, wniosków i ewentualne wskazanie obszarów dalszych badań.

### Struktura techniczna dysertacji

W mojej opinii, która znajduje też potwierdzenie w wymaganiach redakcyjnych licznych czasopism naukowych, podział pracy na rozdziały dotyczące materiałów i metod, wyników i dyskusji wymaga konsekwencji w treści rozdziałów i sposobie jej prezentacji. Pomimo podziału manuskryptu na odpowiednie rozdziały, Doktorant nie zachował konsekwencji w ich treści, np.:

- w Metodach podane są elementy:
  - wyników (np. „ze względu na uzyskanie dla dwóch szczepów” – str. 62),
  - dyskusji (np. informacje nt. specyficzności starterów, które powinny być przedstawione jako ograniczenie stosowanych metod);
- w Wynikach zawarte są, i częstokroć powtórzone, informacje o:
  - materiałach, np.:
    - liczba izolatów – str. 86, 88),
    - charakterystyka szczepów Fujisawa i R32E11 (str. 111 – 112);
  - metodach, np.:
    - kryteria stosowane przy interpretacji wyników MALDI-TOF (str. 88). Podana na tym etapie informacja o utracie 3 szczepów powinna znaleźć się w materiałach, a utracone szczepy należało wykluczyć z analiz z uwagi na brak możliwości odtworzenia oznaczenia. Tym bardziej, że w związku z subiektywnym wyborem szczepów, można było je zastąpić innymi. Obecna sytuacja skutkuje sformułowaniem iż „ogromna większość badanych izolatów (n=57)” (str. 90) w praktyce oznacza, że wszystkie badane izolaty wykazywały aktywność arylamidazy,
    - ocena powtarzalności wyników identyfikacji przy użyciu testów VITEK® (str. 95);
  - elementy dyskusji takie jak:
    - informacja o wykorzystywaniu aktywności arylamidaz do różnicowania enterokoków, streptokoków i gronkowców (str. 90, rozdz. 4.3.3.),
    - uzasadnienie dla oceny powtarzalności wyników identyfikacji przy użyciu kart biochemicznych (str. 95),
    - „ciekawość” dotycząca różnic w wartości procentowej identyfikacji szczepów wraz z wyjaśnieniem potencjalnej przyczyny – algorytmu oprogramowania VITEK®2 Compact (str. 92),
    - uzasadnienie potrzeby siły dyskryminacyjnej metod identyfikacji bakterii (str. 96),
    - interpretacja wykrycia równoczesnego zakażenia serotypami 5 i 8 (str. 98),



- wyjaśnienie mechanizmu oporności związanego z genami *tetM*, *lnuB*, wątpliwości dotyczące roli genu *aadK* w oporności włoskowca różycy na aminoglikozydy (str. 103),
- wyjaśnienie przyczyn różnic w wielkości genu *spaA* (str. 111),
- podanie funkcji genu *gyrA* (str. 104).

W manuskrypcie zauważalny jest również pewien brak konsekwencji, czy też systematyczności dotyczących opisu warsztatu metodycznego. Zbliżone parametry reakcji PCR („Warunki PCR”) powielono w rozdziałach dotyczących określonych „targetów” np. 3.7. i 3.10, w tym ostatnim nie podając temperatury wydłużania końcowego (str. 66). Dla urozmaicenia, temperaturę przyłączania podano w tabeli 3.14, a analogiczne warunki amplifikacji genu *spaA* nie zostały wydzielone w odrębny akapit rozdziału 3.11.

W mojej subiektywnej opinii wydzielenie tabel i umieszczenie ich w odrębnym rozdziale poprawiłoby płynność w odbiorze tekstu. Czytelnik zainteresowany stroną merytoryczną pracy nie byłby zmuszany do czytania np. sekwencji starterów wymienionych w tab. 3.12 lub zakresu pracy pipet automatycznych w tab. 3.7. Część tabel zawiera powielania danych (np. tab. 4.5 i 4.6). Z perspektywy celów pracy cenniejsze wydaje się pokazanie profili biochemicznych tak jak to zrobiono w tabeli 4.6, zamiast prezentacji liczby/odsetka szczepów wykazujących określoną cechę. Celowe byłoby pokazanie 34 zidentyfikowanych profili i różnic między nimi, w miejsce panelu cech biochemicznych każdego ze szczepów. Przejrzystość danych można również uzyskać poprzez usunięcie z tej tabeli 4.6 cech biochemicznych nieróżnicujących badanych szczepów (np. brak reakcji dodatnich dla fosfolipazy C, dihydrolazy argininy 2, pullulanu itp.), a także kompilację cech biochemicznych z dendrogramem przedstawionym w rycinie 4.8.

Niezręczne jest przestawienie niezyskanych wyników („Low discrimination – 0 izolatów” – str. 90, rozdz. 4.3.3). Wynika to prawdopodobnie z prezentacji wyników z perspektywy oceny testu diagnostycznego. Perspektywę tą wzmacnia ocena powtarzalności wyników obejmująca bezpośrednio analizę algorytmu VITEK®2 Compact, który – jak pisze Doktorant – jest „dobrym narzędziem do ustalania tożsamości taksonomicznej” (str. 95). Również zawarta w tym miejscu (rozdział Wyniki – sic!) konkluzja, że zastosowane testy VITEK®2 GP nie nadają się do określania profilu biochemicznego nie powinna dziwić, skoro sam producent deklaruje zastosowanie tych testów do identyfikacji bakterii do gatunku (<https://www.biomerieux.pl/diagnostyka-kliniczna/produkt/vitekr-2-id-cards>). Nie znajduję uzasadnienia dla akapitu dotyczącego czasu uzyskania wyniku przy zastosowaniu VITEK®2 GP. Szczególnie, że porównanie czasu niezbędnego do wykonania analiz nie zostało zawarte w celach pracy oraz nie przedstawiono informacji dotyczących czasu niezbędnego do realizacji oznaczeń innymi metodami np. MALDI-TOF i RT-PCR. Na jakiej więc podstawie Doktorant formułuje wniosek 2: „(...) najkorzystniej wypada spektrometria mas MALDI-TOF i real time PCR”?

Inne, drobne błędy techniczne:

- przy opisie rozdziału elektroforetycznego w rozdziale 3.10 (str. 66) błędnie podano odwołanie do rozdziału 3.6. zamiast 3.7;
- z opisu na str. 6 wynika, iż populacja gęsi w Polsce przekracza 100% (Kłobudzka – ~98% i inne – 5%);



- w tabeli 4.7 i rozdziale 4.3.2 podano różne zakresy wartości log(score) pozwalające na identyfikację gatunku;
- w rycinie 4.8 niepotrzebnie dodano „nagłówek”, który jest skróconą wersją jej tytułu;
- w tabeli 3.14 dwukrotnie podano to samo cytowanie w wierszu dot. *nanH.1* i *rspB*;
- w tabeli 4.9 (rozdział 4.5) wymieniono geny oporności, podczas gdy wyniki te przedstawiono dopiero w kolejnym rozdziale;
- w tytule tabeli 4.5 nie podano nazwy metody wykorzystanej do oceny właściwości biochemicznych, tym samym nie ma możliwości interpretacji jej treści w oderwaniu od tekstu;
- niekonsekwentnie podawana jest informacja dotycząca producentów i usługodawców z miastem i/lub/oraz krajem (np. str. 65 – 68) podawanym pełną nazwą lub skrótem literowym (np. PL, str. 68);
- błędy interpunkcyjne, niejednolite formatowanie tekstu (brak lub różne wcięcia akapitu, niekonsekwentny podział tekstu na rozdziały i podrozdziały, różne formatowanie nienumerowanych podrozdziałów), wartości procentowe podawane z różną liczbą miejsc po przecinku;
- niezręczne sformułowania (np. ryby i skorupiaki (...) wydalają włoskowce z kałem, moczem, śliną i wydzieliną z nosa; geny (...), które „nadają” oporność; „hybrydyzacja” z sekwencją genu; „nachodzenie na żelu prążków na siebie”, itp.).

Rozumiem, że kwestie polemiczne dotyczące epidemiologii różycy gęsi i kaczek, lekooporności włoskowca oraz struktury merytorycznej dysertacji znajdują odzwierciedlenie w trakcie publicznej obrony dysertacji. Natomiast uwagi techniczne nie są merytorycznie istotne i na pewno zostaną usunięte przy opracowywaniu wyników pracy doktorskiej do druku w postaci publikacji naukowych, w tym również w czasopismach branżowych.

#### **4. Podsumowanie i rekomendacja**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dr. n. farm. Tomasza Nowaka pt. „Identyfikacja i charakterystyka antygenowa oraz profile lekowrażliwości i wirulencji szczepów *Erysipelothrix rhusiopathiae* izolowanych od drobiu wodnego w Polsce”, przygotowana pod opieką promotora – dr hab. Marty Dec, prof. uczelni, spełnia wymogi Ustawy z dnia z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668, ze zmianami), a w szczególności art. 187, i może być podstawą dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk weterynaryjnych.

  
prof. dr hab. Dariusz Wasyl



