

Warszawa, 25.08.2023

Dr hab. Magdalena Rzewuska, prof. uczelni
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

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”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marty Dec, prof. uczelni
w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków na Wydziale Medycyny
Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 29 czerwca 2023 r.

Drobnoustrój będący przedmiotem rozprawy doktorskiej dr. Tomasza Nowaka został odkryty w drugiej połowie XIX wieku. Mimo długiej historii badań nad tą bakterią, właściwości *Erysipelothrix rhusiopathiae*, zwłaszcza związane z chorobotwórczością, nie są dobrze poznane. Wiele również pozostaje do wyjaśnienia, jeśli chodzi o patogenność wywoływanych przez nią zakażeń. *E. rhusiopathiae* jest oportunistycznym patogenem zwierząt, przede wszystkim świń, różnych gatunków ptaków i ryb. Różyczka, choroba wywoływana przez tę bakterię, jest poważnym problemem ekonomicznym w hodowli trzody chlewnej i drobiu na całym świecie. Jednocześnie, trzeba podkreślić, że jest ona groźną zoonozą, a zatem ma też duże znaczenie z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego. Dlatego wszelkie badania dotyczące pałeczek *E. rhusiopathiae* dobrze wpisują się w koncepcję Jedno Zdrowie.

Dr Tomasz Nowak określając zakres swoich badań nad szczepami *E. rhusiopathiae* wywołującymi zakażenia u drobiu wodnego trafnie zidentyfikował lukę w wiedzy na ten temat.

Rozprawa doktorska dr. n. farm. Tomasza Nowaka jest opracowaniem monograficznym przedstawiającym badania oryginalne przeprowadzone przez Doktoranta, ich wyniki i wpływające z nich wnioski. Jej tytuł odpowiada w pełni treści pracy.

Praca liczy 169 stron wydruku komputerowego i ma układ właściwy dla tego typu dysertacji naukowej. Na początku znajduje się spis treści, dalej wykaz skrótów (starannie opracowany, uwzględniający wszystkie stosowane w pracy skróty, z ich rozwinięciem w języku polskim i angielskim), a następnie dobrze przygotowane, choć nieco obszerne streszczenia (po trzy strony) w języku polskim i angielskim. Treść pracy została w jasny, czytelny sposób podzielona na rozdziały i podrozdziały (też podzielone na podrozdziały): 1. Wstęp (23 str., 4 podrozdziały), 2. Cel badań (2 str.), 3. Materiał i Metody (31 str., 12 podrozdziałów), 4. Wyniki (53 str., 9 podrozdziałów), 5. Dyskusja (19 str.), 6. Wnioski (2 str.), 7. Piśmiennictwo (13 str.). Na końcu pracy zamieszczony jest „Życiorys naukowy” (6 str.), przedstawiający wykształcenie, dotychczasowy dorobek publikacyjny i aktywność naukową (doniesienia konferencyjne i wykłady) Doktoranta. Mankamentem pracy jest brak spisu tabel (36) i rycin (26), a także w mojej ocenie niezbyt czytelny sposób ich numeracji.

Oceniana rozprawa doktorska jest napisana w języku polskim, poprawnie, ładnym stylem, z dbałością o stosowanie prawidłowej terminologii fachowej. Doktorant jednak nie uniknął drobnych błędów literowych (np. na str. 10 w drugim zdaniu od góry powinno być „wahał się”; na str. 26 w trzecim zdaniu od dołu powinno być „głównie”, na str. 38 w pierwszym zdaniu powinno być „osobiście”, na str. 19 w trzecim zdaniu od dołu powinno być „strefa”, itd.). Ponadto, należy pamiętać, że przy pierwszym użyciu podaje się pełną nazwę rodzaju i gatunku bakterii (np. str. 18 czy 33). Niezbyt fortunate są niektóre określenia, tj. „dyskryminacja szczepów” (str. 10) – lepiej „różnicowanie szczepów”, czy „półtransparentnych” (str. 19) – lepiej „półprzejrzystych”, „zakażeniem pasożytami” (str. 30) – lepiej „zarażeniem pasożytami”.

Wstęp – rozdział ten jest ciekawie napisany i łatwy do czytania, jego treść została logicznie podzielona na podrozdziały, chociaż jest może nieco zbyt obszerny. W rozdziale tym Autor, w oparciu o przegląd literatury naukowej, omawia szczegółowo informacje związane z tematyką prowadzonych badań, poczynając od przedstawienia aktualnego stanu hodowli drobiu wodnego (gęsi i kaczki) w Polsce i jego znaczenia jako ważnego produktu eksportowego. Dalej podana jest taksonomia (uwaga – przy nazwiskach wymienionych badaczy dobrze byłoby podać imiona) oraz opisane są właściwości morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne *E. rhusiopathiae*, a także występowanie/siedliska tej bakterii. Kolejno, przedstawione są serotypy i znane czynniki zjadliwości/wirulencji tej bakterii, a następnie obszernie omówione zostały zagadnienia związane z różycą u drobiu, diagnostyką laboratoryjną tej choroby i jej leczeniem oraz prewencją. Dodatkowo, w krótkim podrozdziale

przedstawione jest znaczenie różycy jako zoonozy (uwaga – używane tu pojęcia „róża” może być mylące, bo za czynnik etiologiczny tej choroby u człowieka uważany jest gatunek *Streptococcus pyogenes*). Informacje podane we „Wstępie” są bardzo dobrym wprowadzeniem do dalszych części dysertacji, jednocześnie wyjaśniają potrzebę podjęcia opisanych w pracy badań oraz uzasadniają wyznaczenie celów badawczych.

W rozdziale „Cel pracy” (uwaga – błędnie podany jest numer rozdziału) Doktorant przedstawia krótkie uzasadnienie podjętych badań i jasno nakreśla jeden główny cel pracy oraz dziewięć celów szczegółowych. W skrócie, obejmują one:

- ✓ izolację i identyfikację szczepów *E. rhusiopathiae* od padłych gęsi i kaczek,
- ✓ określenie rodzaju i częstości występowania zmian anatomopatologicznych u ptaków zakażonych włoskowcem różycy,
- ✓ oznaczenie serotypu izolatów *E. rhusiopathiae*,
- ✓ oznaczenie fenotypu i genotypu lekowrażliwości izolatów,
- ✓ oznaczenie genotypu wirulencji izolatów,
- ✓ określenie wariantów białka SpaA u badanych izolatów i porównanie sekwencji SpaA izolatów i szczepu szczepionkowego *E. rhusiopathiae* R32E11,
- ✓ określenie zróżnicowania genetycznego izolatów za pomocą metod rep-PCR i/lub RAPD,
- ✓ określenie rozkładu odnotowanych przypadków różycy u gęsi w poszczególnych przedziałach wiekowych oraz w poszczególnych okresach roku kalendarzowego na przestrzeni trzech lat.

Rozdział „Materiał i Metody” jest skrupulatnie opracowanym wykazem i opisem stosowanego w badaniach materiału badawczego, używanych odczynników i sprzętu laboratoryjnego oraz metod badawczych adekwatnie dobranych do realizacji zaplanowanych oznaczeń. Warta podkreślenia jest obszerna wiedza dr. Tomasza Nowaka dotycząca metodyki i zasad diagnostyki mikrobiologicznej, a także umiejętne wykorzystanie w badaniach zarówno technik konwencjonalnych, jak i molekularnych. Ta część pracy i dalsze rozdziały pokazują, że Doktorant bardzo dobrze zna również różnego rodzaju programy służące do analiz porównawczych i potrafił je właściwie wykorzystać w swoich badaniach m.in. do ustalenia podobieństwa fenotypowego izolatów oraz ich pokrewieństwa genetycznego.

Moje uwagi do tego rozdziału:

- brak odniesienia w tekście do Tabeli 3.1,
- w Tabeli 3.3 nie jest podane pochodzenie tetracykliny, enrofloksacyny i penicyliny,
- na str. 58 w pierwszym akapicie podrozdziału 3.8 podano, że badano 17 chemioterapeutyków, natomiast z Tabeli 3.10 wynika, że było ich 18 – nie wymieniono penicyliny,

- w składzie podłóż z krwią powinno się raczej podawać „krew owcza”.

Rozdział „Wyniki” jest bardzo obszerny. Mimo wielowątkowości badań i mnogości uzyskanych wyników Autorowi udało się przedstawić je i omówić w uporządkowany, przejrzysty sposób. Wyniki zostały zaprezentowane w tabelach, na wykresach i szczegółowo opisane w tekście. Ogółem, wykryto *E. rhusiopathiae* u 99 padłych ptaków, w tym u 93 gęsi i 6 kaczek. Zakażenia stwierdzono głównie w okresie od lipca do grudnia u ptaków starszych (11-15 tygodniowych). Spośród 128 zidentyfikowanych izolatów *E. rhusiopathiae* do dalszych badań wybrano 60 reprezentujących poszczególne fermy. Autor porównał (Tab. 4.7) skuteczność identyfikacji *E. rhusiopathiae* trzema różnymi technikami: genetyczną – real-time PCR, badając spektra białek – MALDI-TOF, oznaczając aktywność biochemiczną – system VITEK. Serotypowanie szczepów wykazało, że większość z nich należy do serotypów 5, 1b i 8. Wyniki te są mocnym atutem pracy, ponieważ pokazują, że szczepy *E. rhusiopathiae* występujące u drobiu wodnego w Polsce różnią się serotypowo od szczepów wykrywanych u świń, a także mają inną budowę antygenową niż szczep szczepionkowy *E. rhusiopathiae* R32E11 stosowany prewencyjnie u drobiu w kraju. Obserwacje te potwierdziły też wyniki szczegółowej analizy sekwencji immunoprotekcyjnego regionu antygeny powierzchniowego SpaA. Oznaczenie genotypowych profili wirulencji, pierwsze na świecie dla izolatów od drobiu wodnego, nie wykazało istotnych różnic wśród badanych szczepów, natomiast trzeba podkreślić, że zawierały one większość testowanych determinantów, co wskazuje na ich duży potencjał chorobotwórczy. Analizy podobieństwa badanych szczepów przeprowadzone na podstawie wyników uzyskanych w tych oznaczeniach, nie wykazały korelacji pomiędzy profilami widm mas/profilem biochemicznym/serotypem a pochodzeniem szczepu (od gęsi lub kaczki). Bardzo wartościowe, zwłaszcza dla praktyki weterynaryjnej, są wyniki fenotypowego i genotypowego oznaczania lekowrażliwości szczepów *E. rhusiopathiae*, pokazujące wysoki poziom wrażliwości na beta-laktamy oraz florfenikol, a duży odsetek szczepów opornych na tetracyklinę i enrofloksacynę. Doktorant podjął również próbę oceny zróżnicowania genetycznego badanych szczepów metodami rep-PCR i RAPD-PCR. Obie te metody, przy zastosowaniu wybranych starterów, umożliwiły uzyskanie zróżnicowanych profili genetycznych, co jest uwidocznione na załączonych zdjęciach z rozdziału elektroforetycznego próbek. Szkoda, że Doktorant nie zilustrował tego na drzewie filogenetycznym. Mimo, iż siła dyskryminacyjna użytych metod jest niższa niż np. techniki PFGE, to tak przedstawione wyniki byłyby bardziej czytelne.

Inne uwagi do tego rozdziału:

- brak odniesienia w tekście do ryc. 4.5 (str. 84),
- brak odniesienia w tekście do tab. 4.7 (str. 95),

- tabela na stronie 96 też ma numer 4.7,
- brak odniesienia w tekście do ryc. 4.10 (str. 104),
- brakuje ryc. 4.20 (nie ma też odniesienia do niej w tekście),
- dlaczego nie była analizowana zależność badanych cech/wyników od lokalizacji ferm? Takie oznaczenia wydają się ważne z epidemiologicznego punktu widzenia.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant omówił wyniki własne porównując je w dostępnymi danymi literaturowymi dotyczącymi charakterystyki izolatów *E. rhusiopathiae* z Polski oraz innych krajów. Tekst tego rozdziału został podzielony, jednak bez wyodrębniania podrozdziałów, co ułatwia jego odbiór. Autor wnikliwie analizuje dane, rozważa możliwe przyczyny rozbieżności wyników i sugeruje konieczność dalszych badań. Między innymi zwraca uwagę na zaobserwowane współwystępowanie niektórych genów oporności, a także ich potencjalny związek z mobilnymi elementami genetycznymi. W opinii recenzenta, istotnym aspektem rozprawy doktorskiej dr. Tomasza Nowaka, jest odniesienie do zagadnienia ochrony drobiu wodnego przed zakażeniem *E. rhusiopathiae*. Jak wynika z badań przeprowadzonych przez Doktoranta, jest to poważny problem w hodowli drobiu w Polsce z uwagi na brak skutecznej szczepionki. Wyniki tej pracy wyraźnie wskazują przyczynę niedostatecznej ochrony stad gęsi i kaczek przy użyciu szczepionki przeznaczonej dla trzody chlewnej.

Mam jedną uwagę/sugestię do tej części pracy, otóż warto byłoby podać w tym miejscu dane o zużyciu poszczególnych chemioterapeutyków u drobiu wodnego w Polsce i powiązać je z wynikami oznaczenia lekowrażliwości, ponieważ pozwoliłoby to wskazać potencjalne znaczenie ich zastosowania w selekcji szczepów lekoopornych.

Po analizie i przedyskutowaniu wyników badań Doktorant wyciągnął dziewięć wniosków. Zostały one w większości prawidłowo sformułowane. Mam zastrzeżenia do trzech z nich:

- Wniosek 1 – jest to raczej hipoteza, jak sam Autor podaje.
- Wniosek 3 budzi niepokój, gdyż stosowanie terapii empirycznej zawsze wiąże się z większym ryzykiem niepowodzenia, a jak Autor podaje w pracy, podobne objawy kliniczne i anatomopatologiczne mogą występować przy zakażeniu innymi patogenami niż włoskowiec różycy.
- Wniosek 5 powinien być poprawiony na: „Wysoki odsetek szczepów *E. rhusiopathiae* opornych na enrofloksacynę oraz tetracyklinę wskazuje na konieczność ograniczenia stosowania chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych należących do klas fluorochinolonów i tetracyklin w hodowli drobiu wodnego w Polsce”.

Przygotowując rozprawę doktorską Doktorant wykorzystał 156 pozycji odpowiednio dobranego piśmiennictwa dotyczącego tematyki pracy. Spis publikacji został sporządzony alfabetycznie i obejmuje w większości prace opublikowane po roku 2000.

Należy zaznaczyć, że właściwie dobrana metodyka badań, dokładność wykonania wszystkich oznaczeń, ale również ostrożność w interpretacji otrzymanych wyników i ich wnikliwa analiza wskazują na dużą dojrzałość naukową dr. Tomasza Nowaka. Przedstawione w pracy doktorskiej liczne oznaczenia i doświadczenia dostarczyły wielu cennych informacji o zjadliwości, lekooporności i budowie antygenowej izolatów *E. rhusiopathiae* od gęsi i kaczek z hodowli w Polsce, ważnych w mikrobiologicznego, epidemiologicznego i klinicznego punktu widzenia.

Podsumowanie

Oceniam rozprawę doktorską dr. n. farm. Tomasza Nowaka pozytywnie. Przeczytałam ją z dużym zainteresowaniem i w mojej opinii jest ona wartościowym, ze względów poznawczych i praktycznych, opracowaniem naukowym wnoszącym nowe, istotne dane do ogólnej wiedzy o *Erysipelothrix rhusiopathiae* i wywoływanych przez ten patogen zakażeniach. Podane wyżej uwagi, wskazane z obowiązku recenzenta, mają charakter porządkowy i nie umniejszają wysokiej merytorycznej wartości tej pracy.

Stwierdzam, że recenzowana dysertacja dr. n. farm. Tomasza Nowaka pt. „Identyfikacja i charakterystyka antygenowa oraz profile lekowrażliwości i wirulencji szczepów *Erysipelothrix rhusiopathiae* izolowanych od drobiu wodnego w Polsce” spełnia wymagania formalne i naukowe stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wielką staranność i rzetelność z jaką rozprawa doktorska dr. Tomasza Nowaka została przygotowana oraz Jego szeroką wiedzę z dziedziny weterynarii i świetne opanowanie warsztatu badawczego, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.



dr hab. Magdalena Rzewuska, prof. SGGW