

Olsztyn 07.12.2021 r.

dr hab. Tomasz Stenzel, prof. UWM
Katedra Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

Ocena rozprawy doktorskiej

Pani Joanny Kazmierczak pt. "Opracowanie metody diagnostycznej do identyfikacji szczepów *Escherichia coli* patogennych dla drobiu" wykonanej w

Proteon Pharmaceuticals S.A. w Łodzi

pod kierownictwem prof. dr hab. Jarosława Dastycha oraz dr Dominika Strapagiela, prof. UŁ

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 22 września 2021 r. zgodne z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, podjętą w dniu 29. 03. 2019 r.

Jedną z chorób zakaźnych drobiu o bardzo dużym znaczeniu ekonomicznym jest kolibakterioza. Jest to choroba wywoływana przez pozajelitowe szczepy *Escherichia (E.) coli* patogeniczne dla ptaków, tzw. APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*). Kolibakterioza najczęściej występuje jako zakażenie towarzyszące chorobom (różnego tła) układu oddechowego lub zakażeniom immunosupresyjnym. Występowaniu tej choroby może towarzyszyć niski stan higieny chowu drobiu. Warto mieć na uwadze, że w przeciwieństwie do ssaków, u których kolibakterioza kojarzy się z zakażeniem przewodu pokarmowego, o kolibakteriozie drobiu mówimy najczęściej w przypadkach infekcji drogą układu oddechowego przebiegającej jako posocznica. Kolibakterioza może być też zakażeniem ograniczonym do poszczególnych narządów w tym worków powietrznych, skóry, stawów, układu rozrodczego a u piskląt jest jedną z przyczyn zakaźnych zapalenia pępka i woreczka żółtkowego. Bardzo istotne z praktycznego punktu widzenia jest, że choroba ta może wystąpić praktycznie na wszystkich etapach cyklu produkcyjnego drobiu powodując straty nie tylko wynikające z

śmiertelności ale również i ze spadku jakości tuszek drobiowych. Kontrola kolibakteriozy drobiu nie jest łatwym zadaniem i w uogólnieniu polega nie tylko na swoistej immunoprofilaktyce, ale również na zmniejszaniu ryzyka wystąpienia choroby poprzez szczepienia przeciwko chorobom immunosupresyjnym, poprawie warunków chowu, żywienia oraz poprawie higieny w zakładach wylęgu drobiu. W przypadku wystąpienia kolibakteriozy prawidłowe postępowanie lekarsko-weterynaryjne powinno polegać na celowanej antybiotykoterapii opartej o wyniki badań oceny wrażliwości danego izolatu na substancje przeciwbakteryjne.

Należy pamiętać, że APEC mogą mieć również charakter zoonotyczny, a do choroby u ludzi może dojść w przypadku spożycia zakontaminowanej tą bakterią żywności. Ponadto coraz częściej stwierdzane wielolekooporne szczepy tych bakterii z jednej strony stanowią duże wyzwanie terapeutyczne, z drugiej mogą być również przyczyną zagrożenia zdrowia publicznego ze względu na możliwość przekazywania bakteriom występującym w organizmie ludzkim oporności przeciwko antybiotykom za pomocą plazmidów.

Diagnostykę laboratoryjną kolibakteriozy utrudnia fakt występowania u ptaków również i niepatogennych szczepów *E. coli* zasiedlających przewód pokarmowy, tzw. AFEC (Avian Faecal *Escherichia coli*), które mogą być przyczyną kontaminacji próbek pobranych podczas badania anatomopatologicznego. Powyższe dodatkowo komplikuje fakt, że niektóre szczepy AFEC mogą mieć potencjał chorobotwórczy. Reasumując prawidłowa diagnostyka APEC jest bardzo trudna i zdecydowanie wymaga ciągłego doskonalenia technik diagnostycznych i opracowywania nowych metod. Mając na uwadze wszystkie powyższe fakty, uważam że wybór tematyki ewaluowanej dysertacji jest bardzo trafny, bowiem poza wartością naukową ma również charakter aplikacyjny.

Oceniana rozprawa ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich opracowywanych w formie monografii, przygotowana jest w sposób bardzo przejrzysty, napisana jest bardzo dobrym językiem i z dużą starannością. Ewaluowana dysertacja zawarta jest na 148 stronach (wliczając wszystkie tabele i materiały uzupełniające) i zawiera łącznie 11 rycin oraz 18 tabel. Ocenianą rozprawę doktorską napisano w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań własnych oraz o 85 (wg spisu) pozycji piśmiennictwa, jednak tylko 5 z nich ukazało się w ciągu ostatnich trzech lat. Bibliografię uzupełniają ponadto odnośniki do stron internetowych banku genów, programów bioinformatycznych i producentów szczepionek. Opracowanie rozpoczyna się wykazem wszystkich skrótów używanych w tekście.

Rolą rozdziału „Wstęp” jest wprowadzenie czytelnika w problematykę związaną z pracą badawczą i tak jest w przypadku ocenianej dysertacji. Rozdział ten jest stosunkowo obszerny i podzielony wtórnie na liczne podrozdziały nierzadko wzbogacane rycinami i tabelami co poprawia jego odbiór. Niemniej jednak tabela 1 jak i wiele innych tabel znajdujących się w dalszych rozdziałach ocenianej dysertacji ze względu na swoją obszerność jest trudna w analizie. Nie należy traktować jednak tego jako błąd, ponieważ charakter oraz liczba danych w niej zawartych nie dają wyboru zaprezentowania ich w innej formie. Tak obszerne tabele mogą jednak stanowić utrudnienie w przypadku przygotowywania publikacji bazujących na niniejszej dysertacji i raczej będą musiały być zawarte jako tzw. tabele pomocnicze. Rozdział „Wstęp teoretyczny” rozpoczyna się od zdefiniowania kolibakteriozy, jej etiologii, patogenezы i znaczenia ekonomicznego. Doktorantka bardzo precyzyjnie charakteryzuje w nim bakterie *Escherichia coli*, ich czynniki wirulencji, a także zmienność w oparciu o występowanie swoistych antygenów somatycznych oraz budowę genomu. Niestety na samym początku rozdziału „Wstęp teoretyczny” Doktorantka popełniła kilka błędów merytorycznych. Dla przykładu na str. 9 wspomina o zapaleniu woreczka żółtkowego na skutek kontaminacji jaj wylęgowych *E. coli*. Nie do końca jest to prawdą, bowiem zakaźne zapalenie pęпка i woreczka żółtkowego u piskląt chorobą, w której *E. coli* jest tylko jednym z potencjalnych czynników zakaźnych, jednak pierwotną przyczyną są błędy technologiczne w procesie inkubacji doprowadzające do nie zagojenia się pęпка, który staje się bramą wejścia dla różnych drobnoustrojów przy braku zachowania higieny podczas lęgów, klucia i selekcji piskląt. Zostało to częściowo dobrze wyjaśnione na str. 10. Za błąd merytoryczny należy uznać również zaklasyfikowanie choroby jaką jest SHS jako jedną z form kolibakteriozy (str. 10). Bakterie te odgrywają niewątpliwą rolę w etiologii tej choroby jednak w charakterze zakażenia wtórnego. Pierwotną przyczyną jest infekcja ptasimi metapneumowirusami. Na tej samej stronie znajduje się również opis najpowszechniej stwierdzanej i jednocześnie najcięższej formy kolibakteriozy – kolisepticemii, jednakże brakuje w nim opisu zmian włóknikowych na worku osierdziowym i torebkach narządów, które są bardzo charakterystyczne dla tej postaci choroby. Powyższe to jedynie drobne uchybienia, które można wybaczyć, bowiem Doktorantka nie będąc lekarzem weterynarii nie ma pełnego przygotowania merytorycznego w zakresie chorób drobiu. Ponadto w formułowaniu tego fragmentu tekstu posiłkowała się nie najlepiej dobranym źródłem informacji, jakim jest zacytowany na str. 9 portal „mojekurczaki.pl”.

W dalszych częściach omawianego rozdziału Pani Joanna Kazmierczak bardzo szczegółowo ilustruje mechanizmy lekooporności szczepów *E. coli* oraz wszystkie znane

metody diagnostyczne pozwalające na zidentyfikowanie szczepów zjadliwych, co podkreśla jej doskonałe przygotowanie teoretyczne do właściwej części dysertacji jaką jest opracowanie metody diagnostyki APEC. Omawiany rozdział kończy krótkie podsumowanie dostępnych metod profilaktyki i leczenia kolibakteriozy drobiu. Doktorantka wyraźnie zaznacza luki w immunoprofilaktyce, które stanowią ma brak skutecznych szczepionek (wg informacji na str. 39 dostępne są szczepionki inaktywowane). Chciałbym jednak nadmienić, że w Europie już od kilku lat z pełnym powodzeniem stosowana jest delecyjna szczepionka atenuowana, która może być podawana metodą sprayu tuż po wylęgu piskląt. Badania nad skutecznością tej szczepionki prowadzone były również w Polsce (doi: 10.1016/j.psj.2020.08.039; 10.3390/ani11072068). Powyższa uwaga nie umniejsza niczym jakości rozdziału „Wstęp teoretyczny” ewaluowanej dysertacji, a ma jedynie za zadanie zwrócić uwagę Doktorantki na bardzo ważne zagadnienie jakim jest immunoprofilaktyka.

Cel pracy, którym było opracowanie metody diagnostycznej do identyfikacji APEC został jasno sprecyzowany. Doktorantka postanowiła osiągnąć go w 6 kolejnych etapach badawczych poczynając od pozyskania szczepów *E. coli* od ptaków o różnym stanie zdrowia, następnie zróżnicowania szczepów na patogenne i niepatogenne w oparciu o różne techniki biologii molekularnej w tym NGS, badania *in vivo* na zarodkach kurzych, po finalne opracowanie i weryfikację metody własnej.

Rozdział zatytułowany „Materiały i Metody” rozpoczyna się od charakterystyki szczepów bakteryjnych wykorzystanych do realizacji badań Doktorantki. Izolaty pochodziły od ptaków klasyfikowanych do dwóch grup: chore na kolibakteriozę oraz zdrowe. W tym miejscu nasuwa mi się pewna wątpliwość, bowiem na str. 43 widnieje informacja, że bakterie izolowano od ptaków martwych. W Przypadku grupy ptaków chorych, nie jest to niczym zaskakującym ale w przypadku ptaków zdrowych sugeruje ich uśmiercanie w celu pobierania próbek. W takim przypadku w dysertacji powinna się znaleźć informacja na temat zgody LKE na uśmiercenie zdrowych ptaków w celu pobrania próbek do badań.

W dalszej części omawianego rozdziału Doktorantka bardzo dokładnie charakteryzuje wszystkie metody badawcze. Warsztat laboratoryjny Pani Agnieszki Kazimierczak budzi uznanie, bowiem stosowała ona zróżnicowaną metodykę poczynając od hodowli bakterii poprzez liczne metody molekularne (multiplex PCR, PCR MP, WGS) oraz liczne badania *in silico* na uzyskanych sekwencjach pełnych genomów szczepów *E. coli* (serotypowanie poprzez poszukiwanie genów kodujących antygeny O i H, określanie występowania genów lekooporności oraz genów kodujących wszystkie czynniki wirulencji). W tym miejscu należy

zwrócić uwagę, że bazę czynników wirulencji przygotowano w oparciu o sekwencje aminokwasowe w miejsce nukleotydowych aby uzyskać bardziej jednolite dane (pominięcie zmian synonimicznych). Wymieniony wyżej rodzaj analizy uważam za bardzo dobre rozwiązanie. Uzupełnieniem badań molekularnych było przeprowadzenie testów *in vivo*, co również jest bardzo dobrym pomysłem, jednak w tym miejscu nasuwają się kolejne uwagi krytyczne. Po pierwsze o wiele lepszym rozwiązaniem niż zakażenie zarodków kurzych byłoby zakażenie kurcząt. Zakażenie zawiesiną *E. coli* do worków powietrznych jest najbardziej efektywną metodą. Biorąc pod uwagę liczbę szczepów ujętych w badaniach oraz minimalną liczbę ptaków w grupie potrzebną do uzyskania wiarygodnych wyników można zrozumieć wybór innego modelu badawczego, o czym Doktorantka słusznie wspomniała w rozdziale „Dyskusja” (str. 133), jednak jaja wylęgowe użyte w doświadczeniach powinny pochodzić od ptaków SPF. W tym miejscu mam do Doktorantki pytanie – jakie było pochodzenie jaj wylęgowych użytych do testów *in ovo*?

Najbardziej obszernym fragmentem ocenianej dysertacji jest rozdział „Wyniki” . Wyniki wszystkich przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz przedstawione są bardzo szczegółowo, zamieszczone tabele są bardzo obszerne, a ryciny czytelne (np. ryc. 9, str. 84 przedstawienie czynników wirulencji w postaci mapy ciepła bardzo ułatwia analizę wyników). W tym miejscu mam jednak uwagę odnośnie do samej redakcji tego rozdziału, bowiem zwyczajowo powinien on w bardzo bezpośredni sposób charakteryzować wyniki przeprowadzonych badań bez elementów dyskusji ani cytowań. Natomiast w ocenianej pracy takich fragmentów jest bardzo dużo, np. półstronicowy wstęp na str. 67 zawierający również cytowania prac. W niektórych rozdziałach znajdują się też stwierdzenia bardziej typowe dla wniosków niż dla wyników (zakończenie podrozdziałów na str. 77 i 78). Mam też pytanie dotyczące wyników zaprezentowanych w tab. 10 (str. 78 - 83): jak wyjaśnić fakt, że w przypadku niektórych izolatów nie udało się określić rodzaju antygeny somatycznego?

Z analizy wyników badań *in silico* dosyć jasno wynika, że ani źródło izolacji, analiza filogenetyczna, serotypowanie, obecność genów wirulencji czy lekooporności nie dają klarownej i jednoznacznej odpowiedzi pozwalającej na zaklasyfikowanie szczepu do patotypu APEC. Dodatkowo wyniki sugerują, że opieranie diagnostyki na jednej metodzie identyfikacji niesie za sobą bardzo duże ryzyko uzyskania wyników zafałszowanych. Powyższe tłumaczy wzbogacenie badań o metody *in ovo*. Wyniki tych badań również zaskakują, ponieważ pozwalają na reklasyfikację szczepów, co w przypadku badań Doktorantki dotyczyło 25 szczepów (12 z patogennego na niepatogeny i 13 z niepatogennego na patogeny). Wyniki

badan *in ovo* pozwoliły Doktorantce na wybranie kolekcji szczepów służącej do opracowania metody diagnostycznej pozwalającej na identyfikację APEC. Następnie stosując metody statystyczne Doktorantka dokonała wyboru genów różnicujących szczepy, które wybrała z genów związanych z metabolizmem żelaza i genów kodujących toksyny. Ostatecznie wybranych zostało 10 genów do modelu predykcyjnego. W końcowym etapie Doktorantka osiągnęła założony cel badawczy selekcionując 3 geny, których obecność świadczy o przynależności danego szczepu do APEC. Doktorantka samodzielnie zaprojektowała startery do multiplex PCR, a badanie to wykazało 100% zgodności (str. 122) z wynikami badań *in silico* oraz 93% zgodności z klasyfikacją przeprowadzoną metodą *in ovo*. Z danych zawartych w tab. 18, wynika, że część szczepów patogennych nie posiadała genu *wzx* charakterystycznego dla serotypu O78, co nie powinno dziwić. Zaskakujący jest jednak brak amplikonów *iroC* oraz *hlyF* u niektórych szczepów posiadających produkt *wzx* (np. 144PP2017, 151PP2017 czy 152PP2017). Jak doktorantka wytłumaczy to zjawisko? Dodatkowo, czy posiadanie jedynie genu charakterystycznego dla serotypu O78 będzie wystarczające do sklasyfikowania szczepu jako APEC, skoro w terenie bardzo często izoluje się inne serotypy, a najbardziej prewalentnym jest obecnie serotyp O24?

Rozdziałem weryfikującym dojrzałość naukową Doktorantów jest „Dyskusja”, w której należy odpowiednio zinterpretować uzyskane w badaniach własnych wyniki w odniesieniu do danych z literatury. W zawartym na niecałych 8 stronach rozdziale, Doktorantka podkreśla szeroki zakres przeprowadzonych przez siebie badań i prawidłowo interpretuje swoje wyniki w odniesieniu do literatury. W tym miejscu pragnę zauważyć, że istnieją już publikacje dotyczące metodyki określania APEC bazujące na różnych metodach badawczych w tym molekularnych. W licznych pracach amplifikuje się dużo więcej genów związanych z patogennością *E. coli*. Na uwagę zasługuje jednak fakt, i nie bez znaczenia zwraca uwagę również na to Pani Joanna Kazimierzak, że jak dotąd nie ukazała się publikacja, w której zastosowano tak szeroki wachlarz analiz badawczych jak w ocenianej dysertacji. Efekt końcowy polegający na wyborze ledwie trzech genów, choć może budzić pewne kontrowersje na pewno ma szanse na wdrożenie do rutynowej praktyki diagnostycznej, głównie ze względu na łatwość jego wykonania oraz relatywnie niski koszt (multiplex PCR). Pomimo użycia w doświadczeniach stosunkowo licznej grupy szczepów głównie pochodzących od ptaków chorych opracowana przez Doktorantkę metoda wymaga jednak walidacji na dużo większej liczbie izolatów, co słusznie zresztą zauważa Pani Joanna Kazimierzak w słowach kończących rozdział „Dyskusja”.

Ewaluowaną dysertację wieńczy rozdział „Wnioski” zawierający 8 trafnie zredagowanych wniosków wynikających z wyników przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Drobną uwagę mam jedynie do wniosku 6-tego, bowiem uważam go za nieco zbyt odważny i uważam, że wymaga on dodatkowego potwierdzenia na modelu kurzym.

Ostatnią częścią omawianej dysertacji są streszczenia w języku polskim i angielskim, w których Doktorantka w sposób zwięzły podsumowała cele badawcze, metodykę oraz wyniki.

Recenzowaną rozprawę doktorską oceniam pozytywnie ze względu na jej następujące walory:

- wykorzystano w niej bardzo szeroki wachlarz metod laboratoryjnych w celu uzyskania jak najbardziej wiarygodnych wyników,
- wykorzystano WGS szczepów *E. coli* do przeprowadzenia analiz bioinformatycznych w kierunku obecności wybranych czynników wirulencji, zaprojektowania metody diagnostycznej opartej o multiplex PCR oraz jej walidacji,
- zweryfikowano wyniki badań *in silico* na modelu *in ovo*, co stanowi dosyć nowatorskie podejście do oceny patogenności szczepów *E. coli* i doboru odpowiednich determinant wirulencji.

Z obowiązku wnikliwego recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę Doktorantce na następujące, wcześniej nie wymienione, jej niedociągnięcia:

- str. 13, zwrot: „wyizolowane ze zdrowych kurczaków”, powinien być zamieniony na „... od zdrowych kurcząt...”
- str. 21, zwrot: „odporność na surowicę”, powinien być zamieniony na „oporność na surowicę”, bowiem bakterie nie posiadają układu odpornościowego ...
- w pracy w odniesieniu do próbek do badań wielokrotnie stosowane jest określenie „próby” (str. 35, 67, 77 itd.)
- bardzo częstym błędem, którego nie udało się również uniknąć Doktorantce jest stosowanie zwrotu „reakcja PCR”, zamiast „PCR”, gdyż „R” w tym skrócie oznacza właśnie reakcję (str. 36, 37, 49, 54, 55, 67, 122)
- zwrot: „utrzymywanie stad wolnych od mykoplazmy” powinien być zamieniony na „... wolnych od mykoplazmozy”, bowiem ten drugi zwrot oznacza właśnie chorobę
- str. 87, zwrot: „zamarł bezpośrednio po iniekcji szczepem..” powinno być zamienione na „...bezpośrednio po inokulacji szczepem...”,

- str. 88, zwrot: „zarodki kurczaków” powinien być zamieniony na zwrot „zarodki kurze”,
- str. 88, bardzo nietrafna jest fraza „... różnica w działaniu szczepów...”
- Ponadto w pracy występują nieliczne błędy literowe i edycyjne (np. str. 55, 64).

Reasumując stwierdzam, że pomimo powyższych drobnych uwag oraz pewnych niejasności, o których wspominałem we wcześniejszych fragmentach niniejszej recenzji, moja ocena tej dysertacji jest pozytywna. Zrealizowana rozprawa doktorska odzwierciedla holistyczne podejście do opracowania metody badawczej, która po dalszej weryfikacji ma szansę na wdrożenie do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej.

Konkludując wyrażam opinię, iż rozprawa doktorska pt. „Opracowanie metody diagnostycznej do identyfikacji szczepów *Escherichia coli* patogennych dla drobiu” odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia dn. 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, (Dz. U. 2021 poz. 478), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani Joanny Kazimierczak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Tomasz Stenzel, prof. UWM

