

Warszawa, 2022.05.07

Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej
Zakład Chorób Ptaków, Zwierząt Egzotycznych i Ryb
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
02-786 Warszawa
ul. Ciszewskiego 8

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr inż. Anny Sawickiej - Durkalec pod tytułem

„CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA I OCENA WYSTĘPOWANIA

MYCOPLASMA SPP. U PTAKÓW WOLNOŻYJĄCYCH I GOŁĘBI”

Oceny dokonano na zlecenie Rady Naukowej Państwowego Instytutu

Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zgodnie z jej uchwałą

z dnia 27 04 2016 roku, na podstawie materiałów przekazanych przez Pana prof. dr. hab.

Dariusza Bednarka przewodniczącego Komisji Doktorskiej (Nr pisma BRN-410/3/22).

Wstęp

Dyskusja klinicystów na temat roli, jaką odgrywają zarazki z rodzaju *Mycoplasma* u gołębi trwa od blisko półwieku i mimo pojawiania się kolejnych prac z tego zakresu, nadal nie ma jasności o realnym znaczeniu tego problemu w kolumbopatologii. Powszechność występowania zakażeń tymi zarazkami zdecydowanie sugeruje komensalny charakter tych infekcji. Z perspektywy ponad 40 lat zajmowania się patologią gołębi mogę stwierdzić, że w praktyce mykoplazmoza gołębi jest zawsze związana z koinfekcją z innymi zarazkami. Nie bez znaczenia w kształtowaniu opinii o klinicznym znaczeniu tych patogenów dla gołębi miał fakt braku badań w tym temacie wynikający głównie z braku tanich i dostępnych w praktyce metod diagnostycznych. Kierując się wskazaniem klinicznym bardzo często prowadzi się terapię tak zwanego zespołu oddechowego “*Coryza complex*” u gołębi stosując antybiotyki działające na mykoplazmy. Przekonanie o znaczeniu tych infekcji spowodowało, że w kraju pojawiła się oryginalna propozycja, dominującej od końca lat dziewięćdziesiątych na rynku szczepionek dla gołębi firmy Biowet Puławy, szczepionka o nazwie handlowej Mycosalmowir. Została ona oficjalnie wprowadzona do obrotu ponad 20 lat temu. Jest to preparat zawierający 10^8 inaktywowanych antygenów *Salmonella*, 10^9 *EID*₅₀ inaktywowanego formaliną wirusa PMV-

1 (LaSota) oraz 10⁹ inaktywowanych komórek *Mycoplasma gallisepticum* w adiuwancie olejowym. Badania nad tą szczepionką zostały wykonane między innymi przez Zespół naukowców z Katedry Epizootiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Wyniki tych badań zostały przedstawione w ramach VIII Sympozjum Drobiarskiego, które odbyło się w dniach 25-27 września 1997 roku w Polanicy Zdroju (Gawel A., Mazurkiewicz M., Pochodyła A., Jurowski J.: *Ocena kliniczna inaktywowanej szczepionki przeciwko salmonelozie, mykoplazmozie i paramyksowirozie gołębi. VIII Sympozjum Drobiarskie: Aspekty zootechniczno-weterynaryjne chowu drobiu grzebiącego ze szczególnym uwzględnieniem indyków. Polanica Zdrój 1997, 25-27.09, str. 155-158.*).

Badania nad tą szczepionką cytowani Autorzy realizowali w 2 etapach tj. w skali laboratoryjnej i w warunkach terenowych. W warunkach laboratoryjnych efektywność szczepionki oceniano metodami serologicznymi. Stwierdzono, że w świetle badań serologicznych oceniana szczepionka już po jednokrotnym podaniu gołębiom indukuje silną odpowiedź immunologiczną, na zawarte w niej antygeny. Potwierdzono również, że dla uzyskania długotrwałej protekcji anti- *Mycoplasma gallisepticum* niezbędne jest wykonanie powtórnego szczepienia. Badania terenowe prowadzono pod nadzorem lekarzy weterynarii na terenie Górnego i Dolnego Śląska przez okres 3 lat. Badaniami objęto około 10 tys. gołębi. Obserwacje terenowe potwierdziły z kolei niższą podatność gołębi szczepionych na występowanie schorzeń układu oddechowego, aniżeli ptaków nieuodpornianych przeciwko mykoplazmozie. Pomimo długiej obecności tego preparatu na krajowym rynku, stosowanie go jest nadal dyskusyjne, co wynika z braku danych dotyczących reakcji krzyżowych pomiędzy różnymi gatunkami mykoplazm (Stenzel T.: *Zasady profilaktyki swoistej w stadach gołębi. Mat. M-dowej Konferencji Naukowej. :Szczepionki i szczepienia u drobiu: teraźniejszość i przyszłość*” Puławy 2014, 17-18.10, 133-140). Z tego względu należy, więc pozytywnie ocenić kierunek badań zaproponowany w recenzowanej pracy doktorskiej mgr inż. Anny Sawickiej – Durkalec.

Wieloletnie badania epidemiologiczne prowadzone przez Zakładu Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, wykazujące znaczne rozprzestrzenienie zakażeń mykoplazmami zwłaszcza u kur i drobiu wodnego w naszym kraju, prowadzących do istotnych strat produkcyjnych, skłoniło naukowców tej placówki do podjęcia próby określenia roli ptaków dzikich, jako wektora transmisji tych patogenów. Bez wątpienia zatem, zakażenia bakteriami z rodzaju *Mycoplasma* u ptaków wolno żyjących oraz gołębi były i są ważnym problemem w epidemiologii infekcji tymi patogenami zwłaszcza w kolumbopatologii, stąd uzasadniona jest celowość podjętych przez Panią magister badań.

Ocena pracy doktorskiej

Przedstawiona do oceny praca doktorska „Charakterystyka molekularna i ocena występowania *Mycoplasma* spp. u ptaków wolnożyjących i gołębi” została wykonana w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem dr hab. Grzegorza Tomczyka, prof. instytutu. Odnotować należy, że o poziom merytoryczny rozprawy dbała także dr hab. Jolanta K. Rola, prof. instytutu – promotor pomocniczy.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Sawickiej – Durkalec, stanowi opis zbioru czterech (jednego przeglądowego i trzech eksperymentalnych) opublikowanych, powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

Praca przeglądowa

1.Sawicka A., Durkalec M., Tomczyk G., Kursa O.: (2020) Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds: A systematic review and meta-analysis. PLOS ONE 15(4): e0231545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231545>. (punkty MEiN: 100 pkt.; IF 3,041)

Prace oryginalne

2.1. Sawicka A., Tomczyk G., Kursa O., Stenzel T.: (2019) Occurrence and Relevance of *Mycoplasma* spp. in Racing and Ornamental Pigeons in Poland. Avian Dis. Sep 1;63(3):468-473. doi: 10.1637/12018-122718-Reg.1. PMID: 31967430. (punkty MEiN: 70 pkt.; IF 1,493)

2.2. Sawicka-Durkalec A., Kursa O., Bednarz Ł., Tomczyk G.: (2021) Occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild birds: phylogenetic analysis and potential factors affecting distribution. Sci Rep 11, 17065. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96577-0>. (punkty MEiN: 140 pkt.; IF 4,379)

2.3.Sawicka-Durkalec A., Tomczyk G., Kursa O., Stenzel T., Gyuranecz M.: (2022) Evidence of *Mycoplasma* spp. transmission by migratory wild geese. Poult. Sci. Jan;101(1):101526. doi: 10.1016/j.psj.2021.101526. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34823180; PMCID: PMC8627964. (punkty MEiN: 140 pkt.; IF 3,352)

Jakość prac wchodzących w skład cyklu potwierdza ocena bibliometryczna, bowiem łączny Impact Factor publikacji wchodzących w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej wyniósł 12,265 a liczba punktów MEiN to 450. Jak deklaruje Autorka i potwierdzają ten fakt załączone do pracy oświadczenia współautorów, Jej udział w postaniu prac cyklu był znaczący, średnio 70,5 procenta i jak ujmuje to Doktorantka w każdej z nich obejmował „*udział w opracowaniu koncepcji*”.

Jak się to zwyczajowo czyni przy opracowaniach na stopień naukowy, Autorka podzieliła dysertację, zawartą na 52 stronach, na pięć rozdziałów, zastrzeżenia recenzenta budzi

jednak wewnątrz struktura tych rozdziałów. W spisie treści Pani magister wymienia między innymi, że na stronie 8 znajduje się „streszczenie” jednak nie podaje, że na stronie 10 zamieściła „Summary”. W obrębie rozdziału 2 zatytułowanego „Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej” podaje, że dysertację stanowi praca przeglądowa i prace oryginalne podając ich dane bibliograficzne, co oczywiście jest logiczne i zgodne z tytułem. Nie wiadomo w jakim celu Doktorantka tworzy kolejny podrozdział 2.1. „Praca przeglądowa” w którym opisuje tę ciekawą publikację, która jest z pewnością oryginalnym osiągnięciem piszącego ją Zespołu, jednak podrozdział 2.2. ma tytuł „Cel i zakres pracy doktorskiej”, a kolejny 2.3. „Metodyka badań”, zaś podrozdział 2.3.1 „Materiał do badań” . Wydaje się, że bardziej właściwe byłoby utworzenie rozdziału 3 „Cel i zakres pracy” doktorskiej czwartego „Materiał” oraz 5-tego „Metodyka badań”. Rozdział 6 miałby wtedy tytuł „Opis wykonanych badań” a rozdziały 8 i 9 odpowiednio należałoby zatytułować „Analiza statystyczna i „Wyniki”. Zdaniem recenzenta jest błędem, że Autorka nie przedstawiła dyskusji na temat uzyskanych wyników pisząc, że *„szczegółowy opis wyników i ich omówienie znajdują się w publikacjach stanowiących niniejszą rozprawę doktorską”*.

Mimo tych krytycznych uwag ogólne wrażenie z lektury omówienia prac wchodzących w zakres dysertacji jest, pozytywne i można przyjąć, że recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Anny Sawickiej - Durkalec napisana jest poprawnym językiem, spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane opracowaniom na stopień naukowy doktora. Prawidłowo używane w tekście opracowania nazewnictwo fachowe wydaje się świadczyć o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Dotyczy to szczególnie fragmentów poświęconych analizie uzyskanych wyników badań molekularnych.

Cytowane w pracy doktorskiej piśmiennictwo zamykające się liczbą 132 publikacji i dwóch aktów prawnych, jest wyborem wyselekcjonowanych pozycji literaturowych poświęconych problemowi mykoplazmozy drobiu, ptaków wolno żyjących i gołębi. Dobór piśmiennictwa wskazuje na dojrzałość naukową i umiejętność wyboru literatury źródłowej, czego potwierdzeniem jest zwłaszcza praca przeglądowa. Zauważyć należy, że Autorka wyselekcjonowała pozycje piśmiennictwa krajowego wybierając 3 Jej zdaniem, najbardziej reprezentatywne prace.

Opiniowaną pracę doktorską rozpoczyna wstęp, obejmujący 17 stron, w założeniu Autorki wprowadzający czytelnika w problematykę związaną z różnymi aspektami zakażenia zarazkami z rodzaju *Mycoplasma* u ptaków. Doktorantka w 10 podrozdziałach omawia w syntetycznej, czasami jednak zbyt lapidarnej, formie całość problematyki objętej pracą doktorską, poczynając od historii badań nad mykoplazmami, poprzez epidemiologię,

zwalczanie i diagnostykę. W pierwszym podrozdziale wstępu Pani magister przedstawia ogólne dane na temat historii badań nad tymi zarazkami. Jak pisze „ *W taksonomii nazwa rodzaju *Mycoplasma* została nadana w 1929 roku przez Nowaka na podstawie charakterystyki i oceny morfologii tych mikroorganizmów izolowanych od bydła.*” Jednak w spisie piśmiennictwa próżno szukać tego autora (Nowak Jules: Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la péripneumonie des bovidés. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* 1929; **43**:1330-1352). Kolejna część wstępu to pierwszy z dziewięciu podrozdziałów podający charakterystykę mykoplazm. Tę część rozpoczyna bardzo lakoniczny opis taksonomii mykoplazm, co nie dziwi bowiem aktualnie obowiązująca klasyfikacja oparta o cechy fenotypowe tych najmniejszych znanych bakterii, jest przestarzała, a specjaliści nie są zgodni co do zasad kryteriów molekularnych niezbędnych do klasyfikacji izolatów do poziomu gatunku. Więcej informacji podała Doktorantka na temat systematyki molekularnej mykoplazm ustalonej na bazie sekwencjonowania genu 16 S rRNA. Autorka podkreśla, że i w tym zakresie nie mamy pełnej jasności co do zasad klasyfikacji gatunkowej poszczególnych izolatów tych zarazków. Zaproponowana arbitralna wartość międzygatunkowego podobieństwa sekwencji na poziomie 97 %, jako minimalnego poziomu wskazującego na odrębny gatunek, w zasadzie potwierdza to założenie, choć kilka blisko spokrewnionych gatunków mykoplazm o podobieństwie genów 16SrRNA większym niż 97 % wykazywało różnice serologiczne i genetyczne, które pozwoliły na wyodrębnienie ich, jako odrębnych gatunków. Wciąż poszukiwane są nowe markery genetyczne, które mogą dostarczyć użytecznych informacji do wnioskowania o relacjach filogenetycznych między poszczególnymi gatunkami mykoplazm takich na przykład jak region międzygenowy ISR , gen rpoB czy geny kodujące białka – tuf, pbk, dnaK, gyrB.

W podrozdziale 3, stosunkowo rozbudowanym, Doktorantka omawia budowę komórki mykoplazm, przytaczając encyklopedyczne dane na temat specyficznej struktury tych, nie posiadających sztywnej ściany komórkowej zarazków, charakteryzujących się również stosunkowo ograniczonym repertuarem szlaków metabolicznych. Podaje także kilka podstawowych danych na temat cyklu replikacyjnego i wzrostu tych bezwzględnych pasożytów na podłożach hodowlanych.

Za interesujący rozdział wstępu można uznać fragment, w którym Autorka przedstawia budowę genomu mykoplazm (1.2.4.). W rozdziale tym Doktorantka omawia strukturę materiału genetycznego bakterii z rodzaju *Mycoplasma* słusznie podkreślając, że znaczna część tego niewielkiego zestawu genów (500 – 2 000) koduje lipoproteiny powierzchniowe, które odpowiadają, że interakcje z gospodarzem, co pozwala tym patogenom na wymykanie się spod kontroli jego układu odpornościowego. W kolejnym rozdziale Doktorantka opisuje i krótko

charakteryzuje gatunki mykoplazm występujących u ptaków, podając dane na temat objawów klinicznych u drobiu grzebiącego i wodnego, oraz ptaków wolno żyjących (rozdział 1.2.5.). Jak wspomniano wcześniej, należy zgodzić się, ze stanowiskiem Pani magister, że: *Gołębie pozostając bezobjawowymi nosicielami gatunków mykoplazm patogennych dla drobiu hodowlanego, są podatne na zakażenia wywołane przez inne gatunki mykoplazm specyficzne wyłącznie dla gołębi takie jak M. columbinum, M. columborale i M. columbinasale. Ze względu na fakt, że były one izolowane zarówno od chorych, jak i od zdrowych ptaków potwierdzenie ich potencjału chorobotwórczego wymaga dalszych badań.* W dalszej części tego podrozdziału Autorka podaje dane na temat występowania zakażeń mykoplazmami u Wróblowych i Szponiastych podkreślając fakt, że wśród ptaków wolnożyjących to ptaki drapieżne są najczęstszym gospodarzem różnych gatunków mykoplazm. W rozdziale 1.2.6. najciekawszym z całego wstępu Pani magister omawia drogi rozprzestrzeniania się zakażeń mykoplazmowych u ptaków. Bakterie te wykorzystują efektywnie zarówno pionową jak i horyzontalną drogę transmisji, choć nasza wiedza w tym zakresie w odniesieniu do ptaków wolnożyjących jest bardzo skromna. Niewiele wiemy również wiele na temat zagrożenia jakie w rozprzestrzenianiu się mykoplazm mogą stanowić ptaki migrujące.

W następnej części wstępu (podrozdział 1.2.7) Doktorantka opisuje czynniki biorące udział w procesie kolonizacji organizmu gospodarza (ptaka) przez mykoplazmy. Patogeny te posiadają wiele zadziwiająco efektywnych mechanizmów adhezji i dalszej kolonizacji organizmu z wykorzystaniem wielokierunkowego i korzystnego dla przetrwania patogenu wpływu na komórki układu odpornościowego. W wielu przypadkach objawy i zmiany chorobowe obserwowane w przebiegu zakażenia są efektem pośrednim wynikających z odpowiedzi immunologicznej i zapalnej gospodarza.

W podrozdziale 1.2.8. Autorka podejmuje rozważania o czynnikach decydujących o tym, że dany gatunek mykoplazm jest specyficzny dla swojego gospodarza. Przyjmowane powszechnie założenie, że patogeny te są ściśle specyficzne do gatunku ptaka u którego występują wydaje się nie być do końca słuszne. Nie wiemy z pewnością, jakie mechanizmy powodują, że dany gatunek występuje najczęściej u danego gospodarza, zakładamy natomiast, że to zmiana struktury antygenowej białek powierzchni patogenu umożliwia unikanie odpowiedzi immunologicznej zainfekowanego gospodarza. Nowsze badania pozwoliły na identyfikację innych czynników sprzyjających skutecznemu transferowi mykoplazm pomiędzy różnymi gatunkami żywicieli (np. zmiany w genie *mslA* kodującym lipoproteinę odpowiedzialną za pozyskiwanie nukleotydów ze środowiska). Modelowe badania w tym zakresie wykonano z wykorzystaniem populacji dziwuszki ogrodowej podczas epizootii

zakażeń *M. gallisepticum* w Stanach Zjednoczonych. Wyniki tych prac badawczych dowiodły, że szczepy tej mykoplazmy izolowane od dziwuszek wykazują większą zdolność do adhezji, inwazji, utrzymywania się i opuszczania fibroblastów zarodków kurzych niż szczepy referencyjne izolowane od drobiu. Dodatkowo szczepy pochodzące od dziwuszek wykazywały większą tendencję do bytowania wewnątrzkomórkowego co mogło im ułatwiać kolonizację, rozprzestrzenianie się i unikanie odpowiedzi immunologicznej, ze strony nowego gospodarza.

Rozdział 1.2.9 niewiele wnosi wiedzy na temat czynników mających wpływ na występowanie *Mycoplasma* spp. u poszczególnych gatunków ptaków. Podane ogólne opisy z czterech publikacji, z których tylko poglądowy artykuł dr Janet Bradbury dotyczy mykoplazm, nie odpowiadają na postawione w tytule rozdziału pytanie. Przywołana w tym fragmencie pracy publikacja holenderskich pediatrów jest ciekawa, choć niewiele wnosi do *meritum* sprawy.

W ostatnim rozdziale Doktorantka w bardzo lapidarnej formie zasygnalizowała metody, jakie stosowane są obecnie do wykrywania zakażeń mykoplazmami, ograniczając się w zasadzie do ich wyliczenia. Bardziej analityczne została omówiona jedynie metoda spektrometrii mas MALDI-TOF.

W mojej ocenie mimo sporej ilości usterek wstęp jest zwięzłą częścią pracy, generalnie wprowadzającą czytającego w zagadnienia będące przedmiotem badań.

W rozdziale 2.1. Autorka opisuje bardzo interesującą pracę przeglądową, która wchodzi w skład cyklu stanowiącego pracę doktorską i do powstania, której przyczyniła się w 52 %. Rozdział ten jest krótkim ekstraktem ze streszczenia pracy opublikowanej na łamach PLoS ONE. W opracowaniu tym cytowanym, jako jedyną dwóch polskich opracowań w przeglądzie dokonanym ostatnio przez zespół wybitnych holenderskich specjalistów z GD Deventer (Anneke Feberwee, Sjaak de Wit & Remco Dijkman (2021): *Clinical expression, epidemiology and monitoring of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae: an update.*, *Avian Pathology*, DOI: 10.1080/03079457.2021.1944605) artykułów podsumowano dane literaturowe wykazując, że w świetle piśmiennictwa do końca roku 2018 występowanie zakażeń *Mycoplasma gallisepticum* stwierdzono u 56 gatunków dzikich ptaków należących do 11 różnych rzędów. Jak wynika z pracy gatunkiem od którego najczęściej podejmowano próbę izolacji mykoplazm były dziko żyjące indyki i wróble. Ciekawa jest również zestawienie metod diagnostycznych stosowanych na przestrzeni lat do rozpoznawania zakażeń *Mycoplasma gallisepticum* widać wyraźnie, że po wprowadzeniu pod koniec latych 80-tych testu ELISA był on często stosowany w diagnostyce praktycznej badaniach naukowych, a wprowadzenie 10 lat później testu PCR spowodowało, że metody hodowlane, były coraz rzadziej stosowane w badaniach naukowych nad tym groźnym patogenem. Ciekawy choć niestety jak dotychczas nie

wdrożony w życie jest postulat autorów o potrzebie unifikacji protokołów serdiagnostyki zakażeń *M. gallisepticum* oraz interpretacji rezultatów badań serologicznych.

Celem badań podjętych przez Doktorantkę była ocena występowania zakażeń oraz analiza filogenetyczna *Mycoplasma* spp. w populacji ptaków wolnożyjących i gołębi hodowlanych. Dalej w rozdziale 2.2. Autorka podaje 5 szczegółowych zadań, które są moim zdaniem dość chaotyczne i dość przypadkowo zestawione, co jak można sądzić wynika potrzeby połączenia dwóch oddzielnych obszarów tematycznych – ptaki wolno żyjące (dzikie gęsi) i gołębie hodowlane. Konieczne jest uporządkowanie celów badawczych przykładowo cel numer 2 powinien być wymieniony jako pierwszy, cel nr 4 zmieniony na cel nr 3 zaś cel numer 5 skrócony bez rozbijania go na podpunkty. Oczywiście recenzent ma świadomość, że powyższe uwagi mają jedynie dydaktyczny wymiar, bowiem recenzowany opis prac stanowiących cykl jako taki nie będzie publikowany. Rozdział 2.3 zatytułowany „Metodyka badań” odsyła czytelnika do publikacji stanowiących recenzowaną rozprawę doktorską, choć wydaje się, że lepszym rozwiązaniem byłoby jednak wylistowanie metod jakie opanowała Doktorantka by wykonać recenzowane badania.

W rozdziale 2.3.1. Doktorantka pisze, że materiał stanowiły próbki pochodzące od 1170 ptaków wolnożyjących i 179 gołębi hodowlanych. Prześledzenie jakości i charakteru pobieranych prób byłoby łatwiejsze, gdy Doktorantka przedstawiła ich zestawienie w formie tabelarycznej. W ramach pracy nr 2.2. mającej na celu określenie występowania *Mycoplasma* spp. u ptaków wolnożyjących w Polsce próbki do badań pobrano w latach 2011-2019 łącznie od 1141 dzikich ptaków reprezentujących 55 gatunków, 26 rodzin i 15 rzędów. W sumie podczas regularnych akcji obrączkowania prowadzonych przez ornitologów odłowiono 990 klinicznie zdrowych żywych ptaków (86,8% przebadanych osobników), od których pobierano wymazy w ramach ogólnopolskiego programu monitoringu grypy ptaków. Pozostałe 151 zbadanych prób (13,2%) pochodziło od znalezionych ptaków martwych, które nie wykazywały jednak żadnych makroskopowych zmian wskazujących na chorobę zaraźliwą a badane osobniki padły z powodu urazów spowodowanych kolizją z powierzchniami szklanymi, liniami energetycznymi czy pojazdami i zostały przekazane przez stacje ornitologiczne lub ośrodki rehabilitacji ptaków do laboratorium Zakładu Chorób Ptaków Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w celu postawienia diagnozy. Wszystkie badane ptaki zostały skategoryzowane w zależności od preferencji żywieniowych w oparciu o główne składniki diety (na zwierzęce, mieszane i roślinne), preferowanych siedlisk (wodne lub lądowe) oraz predyspozycji do migracji (wędrowne lub osiadłe). Pozostałe 28 prób to wymazy pobrane od gęsi upolowanych przez myśliwych w latach 2019 – 2020. Brakująca

jedna próbka została pobrana od żywej gęsi odłowionej przez ornitologów w ramach monitoringu grypy ptaków w okolicach Gdyni. Jak podaje dalej Autorka próbki pozyskano od 1035 ptaków żywych u których nie stwierdzono żadnych objawów klinicznych (i jak się można sądzić, specyficznych dla chorób zakaźnych zmian sekcyjnych). Zbadano również 135 gołębi z objawami takimi, jak : problemy z oddychaniem, zapalenie spojówek, utratę kondycji, artretyzm-(?) (w oryginale pracy jest oczywiście poprawnie czyli *arthritis!*), objawy nerwowe lub wodniste odchody. Szkoda, że Autorka nie podaje jakie konkretnie choroby zostały rozpoznane u chorych gołębi. Jak zapewnia Doktorantka wszystkie próbki były pobierane przez wykwalifikowanych ornitologów i lekarzy weterynarii.

W rozdziale 2.4. Pani magister opisuje przebieg badań wykonanych w ramach poszczególnych publikacji wchodzących w skład doktoratu. Podrozdział 2.4.1. dotyczy publikacji opisującej występowanie i znaczenie zakażeń *Mycoplasma* spp. u gołębi pocztowych i ozdobnych w Polsce. Materiał do tych badań został zgromadzony podczas rutynowej działalności usługowej Katedry Chorób Ptaków UWM w Olsztynie w latach 2014-2015 i pochodził od gołębi z całej Polski. W ocenie recenzenta największym osiągnięciem Doktorantki w ramach opiniowanej rozprawy było zaprojektowanie i walidacja trzech zestawów starterów do rozróżnienia: *M. columbinum*, *M. columborale* i *M. columbinasale* swoistych dla gołębi gatunków tych patogenów. Druga praca eksperymentalna (Podrozdział 2.4.2) miała na celu określenie częstości występowania *Mycoplasma* spp. u dzikich ptaków w Polsce wraz z analizą filogenetyczną i potencjalnymi czynnikami wpływającymi na rozprzestrzenienie się zakażeń w badanych populacjach. Z kolei w podrozdziale 2.4.3. autorzy zajęli się oceną występowania *Mycoplasma* spp. u dzikich gęsi. Doktorantka zaznacza, że dwie sekwencje dotyczące *Mycoplasma* spp. i *M. anserisalpingtonis* (gen *rpoB*) zostały przez autorów umieszczone w bazie GenBank. Trzeba podkreślić, że każdy z obszarów, które Doktorantka badała wymagał wyspecjalizowanego warsztatu badawczego na wysokim poziomie, który w kraju jest dostępny w Zakładzie Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Podrozdział 2.4.4. recenzowanej rozprawy doktorskiej zatytułowała Autorka jako „Analiza statystyczna i graficzna prezentacja wyników”. Stworzenie tego rozdziału zdaniem recenzenta nie było konieczne, bowiem wszelkie szczegóły są zawarte w pracach stanowiących dysertację.

W rozdziale 2.4.5 „Wyniki” Doktorantka krótko omawia zawartość artykułów składających się na ocenianą rozprawę doktorską odsyłając czytelnika do oryginalnych publikacji. Jak podaje opisując rezultaty badań zamieszczone w pracy „Occurrence and

Relevance of *Mycoplasma* spp. in Racing and Ornamental Pigeons in Poland” przegląd epidemiologiczny wykazał, że 92 % próbek pobranych od gołębi pocztowych zawierało materiał genetyczny mykoplazm, zaś w próbkach pobranych od gołębi ozdobnych (nie wiemy jakich ras, których w Polsce jest hodowanych kilkadziesiąt, a częściej klinicznie choroba występuje u ras krótkodziobych) wyników pozytywnych było tylko 7 % mniej. Żaden z badanych gołębi nie był pozytywny na obecność *M. gallisepticum* lub *M. synoviae*. Średnia częstość występowania *M. columbinum* została określona na 49%, *M. columborale* na 79%, a *M. columbinasale* na 23% u wszystkich badanych ptaków. Zakażenie pojedynczym gatunkiem mykoplazmy stwierdzono u 40% gołębi, podczas gdy infekcje wielogatunkowe stwierdzono u 49% badanych ptaków. Wyniki te potwierdzają komensalny charakter obecności tych bakterii i gołębi hodowlanych. Niestety badania nie potwierdziły różnic w częstości występowania mykoplazm pomiędzy gołębiami chorymi a zdrowymi i co istotne autorzy nie określili ostatecznie, jaka jest zależność między występowaniem *Mycoplasma* spp. a stanem zdrowia gołębi. Czy obecność *M. columbinum* u chorych gołębi ozdobnych i ich brak u gołębi zdrowych tego typu użytkowego jest dowodem na znaczenie kliniczne zakażeń tym gatunkiem mykoplazmy autorka nie wyjaśnia, wskazując, że badania wykonano na stosunkowo niewielkiej grupie ptaków. Pokreślić, jednak należy, że omawiana praca była pierwszą pracą o takim charakterze a opracowanie procedury testu PCR różnicującego poszczególne gatunki mykoplazm u gołębi jest moim zdaniem największym osiągnięciem Doktorantki. Badania nie rozstrzegły jednak ostatecznie, jakie czynniki decydują o klinicznym przebiegu infekcji oraz czy stosowany program szczepień może wpływać na przebieg zakażenia.

Największym osiągnięciem opisanym w pracy „Occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild birds: phylogenetic analysis and potential factors affecting distribution.” było przeprowadzenie analizy filogenetycznej 66 wybranych próbek i przyporządkowanie ich do pięciu grup filogenetycznych. Co istotnie nie stwierdzono wyraźnego związku pomiędzy gatunkami dzikich ptaków a występującymi u nich gatunkami mykoplazm. Stwierdzono natomiast zależność pomiędzy siedliskiem a natężeniem infekcji *Mycoplasma* spp. wykazując, że ptaki bytujące na obszarach lądowych były w mniejszym stopniu zakażone niż gatunki zamieszkujące tereny wodno-błotne. Autorka nie wyjaśnia tu dlaczego prewalencja zakażeń mykoplazmami była prawie 5 krotnie mniejsza u roślinożerców niż u ptaków żywiących się głównie pokarmem zwierzęcym. Logicznym jednak wydaje się przyjęcie hipotezy, że drapieżniki zakażają się tymi zarazkami od swoich ofiar. Ciekawe jest także, że osiadły tryb życia prawie dwukrotnie zmniejszał ryzyko zakażenia *Mycoplasma* spp. Wyniki badań wskazują, że dziki ptaki wodne mogą być potencjalnym źródłem zakażenia dla komercyjnych

stad drobiu wodnego w mniejszym stopniu dla kur i indyków, bowiem wśród zbadanych 1170 próbek nie stwierdzono obecności materiału genetycznego *M. gallisepticum* i *M. synoviae*.

Należy podkreślić, że omawiana praca jest oryginalna, nowatorska i z pewnością wnosi nowe dane o zakażeniach *Mycoplasma* spp. w populacji krajowych ptaków dzikich.

Z trzech prac wchodzących w skład ocenianej pracy doktorskiej opracowanie: „Evidence of *Mycoplasma* spp. transmission by migratory wild geese” opublikowane ostatnio w Poultry Science wydaje się być najbardziej ciekawe ze względu na wykazanie potencjalnej roli dzikich gęsi w epidemiologii zakażeń mykoplazmami u gęsi hodowlanych i wpisuje się w długą historię badań nad bakteriami z tego rodzaju u drobiu wodnego zapoczątkowanych przez Panią Profesor Annę Cąkałą i owocnie kontynuowanych przez Promotora dr hab. Grzegorza Tomczyka, profesora instytutu (Cąkała A.: *Epizootiological data on avian mycoplasmosis in Poland*. Bull. Off. Int. Epiz., 1979 ; Tomczyk G.: *Właściwości szczepów Mycoplasma spp. izolowanych od gęsi i kaczek Barbarie*. Rozprawa doktorska, PIWet. Puław).

Autorka wskazuje, że mimo, iż grupa badawcza nie była zbyt liczna (29 gęsi) to prevalencja zakażeń *Mycoplasma* spp. wśród badanych ptaków przekroczyła 75 % a wyniki przeprowadzonych badań nie wykazały istotnych różnic pomiędzy 4 badanymi gatunkami dzikich gęsi o różnej, choć podobnej biologii. W analizie filogenetycznej wyróżniono trzy grupy izolatów, a badania z wykorzystaniem gatunkowo specyficznych starterów wykazały, że w 68,2 % próbek występowała *M. anserisalpinitidis*. Jest bardzo ciekawe, że w badanych próbkach nie stwierdzono materiału genetycznego *M. anatis*, *M. anseris* i *M. cloacale*.

W mojej ocenie wartością tej pracy jest również wpisanie do bazy GenBanku kilkunastu nowych sekwencji mykoplazm izolowanych od gęsi w kraju.

Rozdział 3 „Wnioski” - ten bardzo istotny element pracy Doktorskiej, bardzo często krytykowany przez recenzentów, zawiera konkluzje opracowane przez Panią mgr inż. Annę Sawicką - Durkalec na podstawie przeprowadzonych badań. Doktorantka sformułowała 7 obszernych i opisowych wniosków, których kolejność moim zdaniem powinna być dostosowana do kolejności omawianych prac (w pierwszej kolejności wnioski z pracy poświęconej gołębiom, dalej wnioski z badań and występowaniem zakażeń mykoplazmami u ptaków wolnożyjących i na końcu wnioski dotyczące badań nad dzikimi gatunkami gęsi). Sądzę, że wniosek pierwszy, jako ogólny może być pominięty. Wnioski 6 i 7 powinny być skrócone do jednego.

We wniosku pierwszym, będącym konstatacją ogólnej opinii epidemiologów weterynaryjnych, Pani magister stwierdza, że wybrane gatunki ptaków wolnożyjących, jak również gołębie są podatne na zakażenia jednym lub kilkoma gatunkami *Mycoplasma* spp.

przez co stanowią naturalny rezerwuuar tych patogenów. Wniosek drugi informuje czytelnika, że wykazano związek pomiędzy obecnością zakażeń *Mycoplasma spp.* u ptaków wolno żyjących a czynnikami środowiskowymi, taki jak rodzaj diety, preferowane siedlisko i migracja. Ten wniosek wynika wprost z badań wykonanych w pracy i jest bardzo interesującym osiągnięciem naukowym Doktorantki.

We wniosku 3 Autorka formułuje opinię, że w badanych próbkach pochodzących od ptaków wolnożyjących i gołębi nie stwierdzono obecności materiału genetycznego *M. gallispeticum* i *M. synoviae* a zatem ryzyko transmisji tych patogenów do drobiu hodowlanego jest niskie. Jest to oczywiście wniosek dotyczący populacji ptaków, które nie mają najczęściej kontaktu z drobiem. Wydaje się jednak prawdopodobne, że ptaki synantropijne, żyjące na fermach drobiu (np. wróble) mogą być rezerwuarem mykoplazm. We wniosku 4 Doktorantka natomiast wskazuje, że dzięki gęsi stanowią rezerwuuar *Mycoplasma spp.* i mogą pełnić rolę wektora zakażeń dla hodowlanego drobiu wodnego. Wniosek ten opisuje ważne osiągnięcie Doktorantki, bowiem w dotychczasowych badaniach krajowych nie podejmowano tego tematu.

Wyniki prac eksperymentalnych zaprezentowane przez Autorkę w tym zakresie stanowią bardzo ciekawy punkt wyjścia do dalszych badań. Trzy ostatnie wnioski dotyczą wyników pracy poświęconej gołębiom i jak z nich wynika przy pomocy autorskiego testu PCR do wykrywania mykoplazm swoistych dla tych ptaków, nie potwierdzono związku pomiędzy kondycją zdrowotną gołębi a występowaniem poszczególnych gatunków mykoplazm specyficznych dla tego gatunku, jednak u ptaków wykazujących objawy kliniczne *Mycoplasma spp.* była częściej wykrywana u gołębi pocztowych niż u ozdobnych co może sugerować rolę mykoplazm w patogenezie tego typu użytkowego.

Po krytycznej analizie opracowania i ocenie prac składających się na rozprawę doktorską, stwierdzam, iż Pani mgr inż. Anna Sawicka - Durkalec w publikowanej działalności naukowej wykazała właściwe przygotowanie merytoryczne do samodzielnego rozwiązywania postawionych celów badawczych.

Recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz w potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a tym samym w wystarczającym stopniu spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom określone w art.13 ust.1. Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365).

Po całościowym rozważeniu wartości poznawczej recenzowanej dysertacji

**zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu
Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie
Pani mgr inż. Anny Sawickiej - Durkalec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to be 'H' and 'M'.