

Prof. dr hab. Wojciech Szweda

Olsztyn, 16.02.2024 r.

Katedra Epizootiologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Sylwii Budniak**

pt. „Fenotypowa i genotypowa charakterystyka szczepów *Pasteurella multocida*
wyizolowanych od królików w Polsce”

wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krzysztofa Szulowskiego (promotor)
oraz dr Agnieszki Kędrak-Jabłońskiej (promotor pomocniczy).

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach prof. dr hab. Dariusza Bednarka z dnia 09.01.2024 r. (BRN-4200/1/24), zgodnie z uchwałą Rady Naukowej PIWet-PIB w Puławach z dnia 30.11.2011 r. w sprawie powołania na recenzenta rozprawy.

Polska należy do głównych producentów i eksporterów mięsa króliczego w Unii Europejskiej. Możliwości eksportowe stymulują tworzenie ferm towarowych, natomiast podkreślane walory dietetyczne i prozdrowotne tego mięsa mogą zmienić utrzymującą się tendencję niskiego jego spożycia w Polsce. Chów wielkotowarowy stwarza jednak pewne zagrożenia dla zdrowia tych zwierząt związane głównie z chorobami zakaźnymi i inwazyjnymi. Wzrost zainteresowania królikami jako zwierzętami towarzyszącymi stwarza też zagrożenie dla zdrowia publicznego. Dlatego niezbędna jest stała kontrola stanu zdrowia tej populacji, dotycząca zarówno oceny występowania ważnych z punktu widzenia epizootycznego i ekonomicznego chorób lub zakażeń, jak i doskonalenia metod diagnostycznych zmierzających do szybkiego i pewnego ich wykrywania celem zastosowania właściwych metod leczenia, zwalczania i zapobiegania. Patogenem, który stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt,

w tym królików, mogącym również spowodować znaczące straty ekonomiczne jest *Pasteurella (P.) multocida*. Dlatego podjęcie przez doktorantkę tego tematu, z uwagi na dotychczasowy brak kompleksowych badań dotyczących zakażeń *P. multocida* w krajowej populacji królików, należy uznać za właściwe i aktualne, o dużym znaczeniu, zarówno poznawczym, jak i aplikacyjnym.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska liczy 126 stron wydruku komputerowego i ma układ typowy dla tego typu opracowań, obejmujący: Wstęp, Cel badań, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenia w językach polskim i angielskim, Bibliografię oraz Spis tabel, rycin i fotografii. Wstęp został poprzedzony oświadczeniami promotora i autora rozprawy doktorskiej oraz wykazem używanych w tekście skrótów i oznaczeń. Dokumentację stanowi 28 tabel, 18 rycin oraz 20 fotografii, wkomponowanych w tekst rozprawy.

W liczącym 17 stron wstępie, podzielonym na 7 podrozdziałów, doktorantka omówiła krótko systematykę i właściwości rodzaju *Pasteurella*, ze szczególnym uwzględnieniem gatunku *Pasteurella multocida*. Następnie scharakteryzowała szczegółowo etiologię i patogenezę, źródła zakażenia, objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne, rozpoznawanie, leczenie i zapobieganie pasterelozy królików oraz pasterelozę jako zoonozę. Należało wyraźniej zaakcentować, że chodzi o pasterelozę, a nie np. o zapalenie nosa przedstawione w Tab. 1. W tytule tej tabeli powinno być określenie „Choroby”, a nie „Zespoły chorobowe”, które są polietologiczne, np. PRDC, czy BRDC, w etiologii których też występuje *P. multocida*. Tytuł pracy Wilkie i wsp., 2012 (poz. 53) także dotyczy chorób, a nie zespołów chorobowych. W mojej ocenie wstęp słabo koresponduje z tytułem rozprawy. Należało rozbudować elementy dotyczące samego drobnoustroju, a znacznie ograniczyć opis choroby.

Cel główny rozprawy został jasno sformułowany i dotyczył klasyfikacji i oceny pokrewieństwa terenowych szczepów *P. multocida* pochodzących od królików w Polsce oraz usprawnienia metod ich identyfikacji. Cele szczegółowe obejmowały określenie właściwości biochemicznych i przynależności serotypów, charakterystykę białek błony zewnętrznej, ocenę ich pokrewieństwa poprzez analizę chromosomalnego DNA, opracowanie metod wykrywania genu *tox A* oraz usprawnienie metod identyfikacji szczepów metodami multiplex PCR i MALDI-TOF MS.

W rozdziale „Materiał i metody”, liczącym 20 stron, doktorantka bardzo szczegółowo scharakteryzowała zastosowane procedury badawcze. Opisowo, na rycinach i w tabelach przedstawiono materiał badawczy w postaci szczepów *P. multocida*, ich pozyskiwanie, izolację

i przechowywanie, metodykę charakterystyki fenotypowej, serotypizacji, rozdziału białek błony zewnętrznej, określania antygenów otoczkowych, wykrywania dermonekrotoksyny oraz identyfikacji szczepów.

Próbki do badań pobierano od 350 królików, różnych ras, obu płci, z 4 ferm wielkotowarowych oraz wielu hodowli prywatnych zlokalizowanych w różnych regionach Polski. W badaniach laboratoryjnych wykorzystano 115 szczepów *P. multocida* wyizolowanych w latach 1999-2020 od królików trzech grup – chorych (73 szczepy), klinicznie zdrowych (14 szczepów) i padłych (28 szczepów). Kolejnych 15 szczepów stanowiły szczepy wzorcowe – 9 - *P. multocida* typy A, B, D, F, 2 – *Staphylococcus aureus* i po jednym – *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* i *Klebsiella pneumoniae*. Rozdział ten kończy opis kryteriów oceny przydatności systemów typowania oraz metod analizy statystycznej.

Obszerny, liczący 30 stron, rozdział „Wyniki” obejmuje opisową i graficzną prezentację uzyskanych wyników badań. Przedstawiono wyniki charakterystyki cech fenotypowych szczepów, w tym oceny morfologicznej i mikroskopowej, analizy cech biochemicznych, klasyfikacji podtypowej, określania serotypów poprzez ocenę grupy otoczkowej i antygenów somatycznych oraz analizy profili elektroforetycznych białek błony zewnętrznej. Następnie zaprezentowano wyniki charakterystyki genotypowej szczepów, w tym analizy restrykcyjnej genomowego DNA, identyfikacji gatunkowej oraz określania antygenów otoczkowych szczepów metodami molekularnymi – PCR i multiplex PCR. Dalej przedstawiono wyniki wykrywania dermonekrotoksyny *P. multocida* testem ELISA oraz genu *toxA* i identyfikacji gatunkowej metodami PCR i real-time PCR. Rozdział ten kończy opis wyników identyfikacji szczepów metodą spektrofotometrii mas (MALDI-TOF MS) oraz oceny przydatności systemów typowania. Opis wyników został udokumentowany w postaci 8 tabel, 17 rycin i 19 fotografii.

Rozdział „Dyskusja”, liczący 22 strony, stanowi, w oparciu o bardzo liczne pozycje piśmiennictwa, próbę zarówno analitycznej, jak i krytycznej oceny wyników uzyskanych w badaniach własnych, w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Rozdział ten stanowi także pewne podsumowanie przeprowadzonych badań w kontekście ich wartości naukowej, jak i aplikacyjnej, służącej poszerzeniu wiedzy w zakresie występowania i charakterystyki szczepów *P. multocida* stwierdzanych w populacji królików w Polsce w latach 1999-2020, jak również usprawnienia metod wykrywania, identyfikacji i oceny właściwości krajowych szczepów *P. multocida*. Stanowi on jednocześnie dowód dobrej znajomości przez

doktorantkę badanej problematyki oraz umiejętności doboru odpowiednich pozycji piśmiennictwa.

Rozprawę kończy 6 syntetycznych wniosków, z których niektóre są nawet zbyt syntetyczne, wskazujących generalnie na osiągnięcie zaplanowanych celów badawczych. Po wnioskach zamieszczono dwa streszczenia – w językach polskim i angielskim, dobrze charakteryzujące wykonane badania oraz bardzo obszerny wykaz 327 pozycji piśmiennictwa krajowego i zagranicznego.

Badania przeprowadzone przez doktorantkę w ramach recenzowanej rozprawy, bardzo różnorodne, praco- i czasochłonne, umożliwiły uzyskanie szeregu interesujących i oryginalnych wyników, które w znaczącym stopniu poszerzyły dotychczasową wiedzę dotyczącą występowania zakażeń *P. multocida* w krajowej populacji królików w ostatnich 20 latach, charakterystyki fenotypowej i genotypowej szczepów oraz umożliwiły usprawnienie metod identyfikacyjnych i diagnostycznych. Należy podkreślić, że zasługą doktorantki jest podjęcie badań dotychczas w Polsce nie wykonywanych w tym wymiarze w populacji królików, zatem można je uznać za oryginalne, a uzyskane wyniki za wartościowe w znaczeniu poznawczym i praktycznym, zarówno dla pracowników naukowych, jak i lekarzy weterynarii sprawujących opiekę nad tym gatunkiem zwierząt oraz pracowników laboratoryjnych, także w aspekcie zdrowia publicznego.

Ocena właściwości fenotypowych, umożliwiających klasyfikację terenowych szczepów *P. multocida* wykazała, że *gros* szczepów wyizolowanych od królików krajowej populacji w latach 1999-2020 należała do dwóch podgatunków - *P. multocida subsp. multocida* ornityno- i *P. multocida subsp. multocida* oraz serotypów A:3 i A:12. Stwierdzono, że szczepy *P. multocida* wyizolowane od królików są mocno zróżnicowane w zakresie profili elektroforetycznych białek błony zewnętrznej, jak również na poziomie genotypowym. Istotne dla diagnostyki zakażeń było wykazanie, że metoda multiplex PCR stanowi dobrą, szybką alternatywę dla konwencjonalnych metod identyfikacji gatunkowej i serologicznych metod typowania otoczek *P. multocida*. Ponadto wykazano, że do wykrywania genu *toxA* skuteczne okazały się jedynie metody molekularne – PCR i real-time PCR, a metoda MALDI-TOF MS stanowi dobre narzędzie do usprawnienia identyfikacji gatunkowej *P. multocida* i może stanowić alternatywę dla metod fenotypowych i genetycznych.

Recenzowana rozprawa, z uwagi na ważną poznawczo i aplikacyjnie tematykę badawczą, wnosi nowe elementy do nauki i praktyki lekarsko-weterynaryjnej oraz poszerza dotychczasową wiedzę z tego zakresu, została wykonana metodycznie poprawnie, zgodnie z przyjętymi celami i założeniami badawczymi, na dużym materiale, z zastosowaniem różnorodnych - konwencjonalnych i nowoczesnych metod i technik badawczych. Rozprawa ta może stanowić cenne źródło wiedzy dla terenowych lekarzy weterynarii, służącej poprawie programów zapobiegania i zwalczania pasterekozy królików, dla pracowników nauki oraz pracowników różnego typu laboratoriów zajmujących się diagnostyką zakażeń *P. multocida*.

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak pewne niedociągnięcia, również takie o charakterze dyskusyjnym, które z pozycji recenzenta zobowiązany jestem przedstawić:

1. W tekście pracy używane są pojęcia „izolat” oraz „szczep” i można odnieść wrażenie, że są one używane zamiennie. Proszę o wyjaśnienie, jak doktorantka traktuje te pojęcia i czy takie ich używanie np. w Celach badań jest zamierzone.
2. str. 20 – wyjaśnienia i przeredagowania wymaga zdanie „W leczeniu pasterekozy niezbędne jest wyeliminowanie zwierząt, które są podejrzane o chorobę”.
3. str. 28 – podano, że pierwszą grupę stanowiły szczepy izolowane od królików z objawami chorobowymi dotyczącymi układu oddechowego (73 szczepy) lub będących bezobjawowymi nosicielami (14 szczepów). Proszę podać kryteria kwalifikacji zwierząt jako bezobjawowych nosicieli. Występuje niezgodność danych w tekście i w Tab. 3. W tekście podano, że 73 szczepy wyizolowano od królików chorych, natomiast w Tab. 3 że 14. Podobnie w tekście podano, że 14 szczepów pochodzi od zwierząt klinicznie zdrowych, a z Tab. 3 wynika, że 73.
4. Doktorantka cytując w tekście pozycje piśmiennictwa po nazwiskach autorów podaje rok publikacji i w nawiasie numer pozycji. Można przyjąć takie założenie, ale zwykle rok publikacji nie jest podawany.
5. Wykaz skrótów na początku rozprawy zawiera ich wyjaśnienie, dlatego nie ma potrzeby ich ponownego tłumaczenia w tekście pracy.
6. W różnych miejscach tekstu podano zamiennie tempo wirowania próbek – jako obr./min. lub g – należy to ujednolicić.
7. Na ryc. 2, 8, 13 występują niezgodności liczbowe z tekstem.
8. str. 75 – wyjaśnienia wymaga określenie „współczynnik score”. Score oznacza pewną wartość liczbową charakteryzującą jakąś cechę np. natężenie objawów klinicznych – clinical score.

9. Sugeruję przeredagowanie wniosków 1 i 2. W pierwszym należałoby zmienić określenie „prawie wszystkie”, w drugim doprecyzować określenie „większość” oraz podać, że chodzi o izolaty *P. multocida* należące do serotypów A:3 i A:12 (liczba mnoga).

10. Sugeruję również zmianę lub ujednolicenie niektórych pojęć lub określeń:

- str. 12 i inne – „infekcja” na „zakażenie”
- str. 15 – „Stały rezerwuar pasterelozy” na „Stały rezerwuar *P. multocida*”, ponieważ rezerwuar dotyczy zarazka, nie choroby
- str. 17 – „odsetek poczęć” na „odsetek zapłodnień”
- str. 17 – „błona śluzowa jest przerosła” na „błona śluzowa ulega przerostowi”
- str. 17 – „wybroczyny na błonach śluzowych i surowicznych” na „wybroczyny w błonach śluzowych i pod błonami surowicznymi”
- str. 20 – „antybiotykoodporność” na „antybiotykooporność”
- str. 23 – „wakcynacja” na „szczepienie”
- str. 23 – „ukąszenie” na „ugryzienie”
- str. 39 i inne - „reakcja PCR” na „PCR” ponieważ R w skrócie PCR oznacza reakcję
- str. 89 – w przypadku świń przy zzzn następuje skrócenie ryja, nie pyska
- str. 90 – „utrata wagi” na „utrata masy ciała”
- str. 96 – „molekularne podstawy patogenezy *P. multocida*” na „molekularne podstawy patogenezy pasterelozy” – patogeneza dotyczy choroby nie zarazka
- ujednolicić określenia „primer” i „starter” oraz „test PCR”, „metoda PCR” i „technika PCR”
- zwrócić uwagę na skróty czasopism – poz. 18, 30, 79, 90, 202, 238, 302, 309

11. Na str. 83, 86, 90 występują niezgodności oznaczeń liczbowych pozycji piśmiennictwa z wykazem. Ponadto brak w tekście pozycji od 226 do 229 i 237.

Wyszczególnione uwagi o charakterze krytycznym, porządkowym oraz polemicznym są przedstawione doktorantce pod rozwagę, natomiast nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy i nie wpływają w sposób istotny na jej pozytywną ocenę.

We wniosku końcowym stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Fenotypowa i genotypowa charakterystyka szczepów *Pasteurella multocida* wyizolowanych od królików w Polsce” odpowiada warunkom określonym 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.), dlatego przedkładam Komisji Doktorskiej Rady Naukowej PIWet-PIB w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Sylwii Budniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wojciech Szweda

