

Prof. dr hab. Renata Urban-Chmiel
Zakład Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 18.11.2017r.

Recenzja
pracy doktorskiej Pani mgr Olimpii Kursa
pt.:”Charakterystyka terenowych szczepów *Mycoplasma synoviae* w zakresie ich
genotypu oraz patogenności w przebiegu klinicznych przypadków syndromu anomalii
wierzchołka skorupy jaj u kur”

Zakażenia wywołane przez szczepy *M. synoviae* dotyczą różnych gatunków drobiu, w tym indyków oraz kur. Rezerwuarem tego patogenu jest ptactwo wolnożyjące, głównie bażanty, kuropatwy, perliczki oraz wróble. Infekcje, występują w większości krajów w stadach komercyjnych w, produkcji drobiarskiej, Rozprzestrzenianie się zakażeń jest na ogół bardzo szybkie w obrębie jednej fermy oraz pomiędzy fermami. Najczęściej patogeny przenoszone są przez jaja i / lub rozprzestrzenione horyzontalnie przez drogi oddechowe, zwykle dotycząc 100% ptaków, przy śmiertelności kształtującej się na poziomie 10%.

Infekcje wywołane przez *Mycoplasma synoviae* u kurcząt i indyków w związku z zapaleniem błony maziowej i / lub zapaleniem pęcherzyków płucnych często w połączeniu z infekcjami wirusowymi, takimi jak paramyksowirus 1 (APMV-1) czy zakaźne oskrzeli. Wywołwanego przez wirus IBV. Najbardziej zakażenia wywołane przez *M. synoviae* mogą mieć charakter układowy, powodując wysiękowe zapalenie błony maziowej w stawach i ścięgnach oraz zapalenie kaletki.

Anomalie dotyczą również wierzchołka skorupy jaj tzw. Egg Apical Abnormality (EAA), powodując znaczne straty ekonomiczne w stadach niosek jaj konsumpcyjnych. W przebiegu syndromu następuje zmniejszenie grubości i gęstości skorupy na jej końcach. Przypadki EAA były często potwierdzane w krajach europejskich głównie w Niemczech i Holandii, ale także w Australii oraz Korei. Wielkość produkcji jaj gdzie obserwowano EAA, spadała z 86% do 79% w okresie 3 tygodni.

U ptaków często nie występują jakiegokolwiek objawy kliniczne, natomiast może nastąpić ogólne obniżenie wielkości produkcji i pogorszenie wskaźnika wykorzystania paszy.

Patogenne szczepy *M. synoviae* różnią się bardzo pod względem zjadliwości, zmienności antygenowej, oraz supresji odporności, a czynniki wirulencji obejmują adhezyny, sialidazę, tlenek azotu.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej podjęto badania obejmujące kompleksową charakterystykę występowania zakażeń *M. synoviae* w stadach drobiu na terenie całej Polski. W badaniach wykorzystano standardowe oraz molekularne techniki identyfikacji drobnoustrojów. Należy podkreślić, że badania były prowadzone w oparciu o aktualnie obowiązujące metody diagnostyczne.

W świetle obserwowanych istotnych strat ekonomicznych oraz występującego zagrożenia związanego z łatwością transmisji czynnika zakaźnego, podjęcie przez Doktorantkę tematyki dotyczącej kompleksowej charakterystyki terenowych szczepów *M. synoviae* w zakresie ich genotypowania oraz patogenności u drobiu należy uznać za trafne i w pełni uzasadnione zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 131 stron tekstu, 27 tabel w tym 9 zawartych w załączniku pracy, 52 ryciny oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Pracę kończy 6 wniosków oraz wykaz 243 pozycji w większości anglojęzycznego piśmiennictwa. Układ pracy jest zgodny z wymogami stawianymi pracom naukowym wykonywanym na stopień doktora nauk weterynaryjnych. Obejmuje on przegląd piśmiennictwa, w którym Doktorantka przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczącej występowania zakażeń wywoływanych przez *M. synoviae* u drobiu. W mojej ocenie jest to poprawna analiza piśmiennictwa będącego inspiracją do podjęcia badań będących tematem zrealizowanej pracy doktorskiej, świadcząca o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki.

Wstęp pracy przedstawiony na 15 stronach, zawiera szczegółową charakterystykę zakażeń u drobiu wywoływanych przez mykoplazmy ze szczególnym uwzględnieniem *Mycoplasma synoviae*. W tej części pracy Autorka skupiła się na ogólnej charakterystyce mykoplazm, patogenezie zakażeń z bardzo dokładnym omówieniem objawów zakażenia wraz z prezentacją w postaci fotografii charakterystycznych zmian wywoływanych u ptaków w stawach, ukł. rozrodczym, a także w skorupie. W dalszej części wstępu Doktorantka prezentuje kompleksową charakterystykę metod diagnostyki zakażeń wywoływanych przez szczepy *M. synoviae* z wykorzystaniem klasycznych testów serologicznych (aglutynacji płytowej, test ELISA) oraz nowoczesnych metod molekularnych PCR w różnych modyfikacjach. W końcowym podrozdziale wstępu Autorka skupia się na szczegółowym omówieniu aktualnie

dostępnych metod zwalczania infekcji *M. synoviae* u kur z wykorzystaniem różnych chemioterapeutyków w oparciu o aktualnie obowiązujące regulacje prawne, co należy ocenić bardzo pozytywnie.

Doktorantka we wstępie pomiędzy podrozdziałem, w którym prezentuje klasyczne i nowoczesne metody diagnostyki zakażeń *M. synoviae*, a końcowym podrozdziałem obejmującym metody zwalczania infekcji wywoływanych przez mikoplazmy umieściła podrozdział dotyczący wykorzystania technik genotypowania w oparciu o określone geny w tym gen *vlhA* diagnostyce *M. synoviae*. W mojej ocenie bardziej profesjonalnie byłoby umieszczenie zawartych informacji w podrozdziale 1.4. obejmujących charakterystykę metod diagnostyki mykoplazm, co niewątpliwie związane jest bezpośrednio z częścią dotyczącą metod molekularnych. W obecnej formie ten podrozdział 1.5. nie pasuje do ogólnie przyjętego schematu tematycznego wstępu.

Rozdział „Cel pracy” przedstawiono bardzo syntetycznie, w którym zawarto trzy główne cele, dotyczące zakresu występowania zakażeń *M. synoviae* u kur niosek na terenie kraju, kompleksową charakterystykę molekularną oraz określenie cech patogenności uzyskanych izolatów.

Oceniając rozdział „Materiał i metody” przedstawiony na 16 stronach wydruku komputerowego, należy podkreślić precyzyjnie przedstawiony zakres zaplanowanych do realizacji badań uzupełniony rycinami oraz tabelami prezentującymi poszczególne etapy prowadzonych przez Doktorantkę badań. W pierwszej części opisowej Autorka zaprezentowała w sposób czytelny schemat pozyskiwania materiału wraz z załączoną w postaci ryciny mapą Polski, na której przedstawiła ilościowy rozkład liczebności ferm drobiu zlokalizowanych w poszczególnych województwach w kraju. W części eksperymentalnej Doktorantka bardzo precyzyjnie przedstawia opis badań molekularnych z podziałem na izolację genomowego DNA oraz technik PCR i RT-PCR z wyszczególnieniem wybranych sekwencji starterów z uwzględnieniem charakterystycznego dla *M. synoviae* genu *vlhA*. W dalszej części prezentuje schematy oraz metodykę kompleksowej analizy pokrewieństwa genetycznego uzyskanych izolatów w oparciu o wybrane geny. W kolejnych podrozdziałach dysertacji został przedstawiony schemat badań *in vivo* polegających na kontrolowanym zakażeniu zarodków kurzych SPF oraz kur niosek. W tej części poza bardzo precyzyjnym opisem doświadczenia Autorka przedstawiła również metody potwierdzające infekcje w których uwzględniła badania serologiczne (test aglutynacji płytowej, test ELISA), badania histopatologiczne oraz makroskopowe. Jestem przekonana, że Doktorantka dobrze opanowała wykorzystywany w

pracy warsztat badawczy, na co wskazuje szczegółowy opis zastosowanych technik pozyskiwania materiału genetycznego oraz reakcji amplifikacji z wykorzystaniem starterów swoistych dla badanych genów. Autorka w części metodycznej dysertacji przedstawiła informacje dotyczące wykonywania autorskich testów ELISA, wykorzystanych w detekcji zakażeń *M. synoviae* u drobiu. Opis zastosowanych technik nie budzi zastrzeżeń, a forma przedstawienia umożliwia ich powtórzenie oraz konfrontację z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

W celu wprowadzenia pewnych przejrzystości sugeruję uzupełnienie zawartych w metodyce informacji o następujące dane:

-Warto byłoby wskazać jakie parametry bądź cechy uzyskanych od kur izolatów *M. synoviae* brano pod uwagę dokonując wyboru spośród 129 zidentyfikowanych mykoplazm tylko 60, jeżeli w tabeli 5 str. 34 wykazano, że pod względem jakości sekwencji do dalszej analizy kwalifikuje się 56 szczepów.

-Podobnie w przypadku 9 szczepów użytych do zakażenia zarodków kurzych również warto byłoby zaznaczyć jakie czynniki decydowały o wybraniu właśnie tych 9 szczepów, które zaprezentowano w tab. 8 str. 38

- Także przy zakażeniu kur niosek jak podaje Doktorantka użyto dwa wybrane szczepy- jednak nie podano informacji co zdecydowało, że właśnie te dwa zostały wybrane do zakażenia.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki, przedstawiono na 38 stronach wydruku komputerowego zarówno w formie opisowej jak i graficznej (9 tabel i 43 ryciny). Uzupełnieniem tej części pracy jest również załącznik zawierający dodatkowych 9 tabel zamieszczonych na końcu dysertacji. Autorka potwierdziła występowanie zakażeń wywoływanych przez *M. synoviae* w stadach kur niosek na terenie całego kraju. Prewalencja w latach 2010-2016, potwierdzona w konwencjonalnym PCR kształtowała się na poziomie od 11 do 45% i była uwarunkowana okresem pobierania materiału oraz zależna od regionu Polski. Autorka wykazała, że w badanym okresie tylko w dwóch województwach (dolnośląskim oraz lubelskim) nie potwierdzono występowania *M. synoviae* w stadach kur niosek. Warto zaznaczyć, że uzyskane w molekularnej diagnostyce rezultaty były również konfrontowane z wynikami uzyskanymi w badaniach mikrobiologicznych. Z kolei analiza porównawcza zastosowanych przez Doktorantkę konwencjonalnych technik molekularnych PCR i RT-PCR w odniesieniu do LAMP PCR potwierdziła zdecydowanie wyższą efektywność technik konwencjonalnych PCR, szczególnie dotyczyło to metody PCR w czasie rzeczywistym. W mojej ocenie stanowi to wartościowy element ocenianej dysertacji i jednocześnie wskazuje na

bardzo szeroki warsztat metodyczny Doktorantki. W dalszej części Doktorantka przedstawia kompleksową analizę filogenetyczną badanych izolatów na podstawie genu *vlhA*, w której potwierdza wysokie podobieństwo (92-100%) szczepów w typie genetycznym. Ponadto wykazała Ona, że najczęściej występującymi typami genetycznymi wśród badanych izolatów były typy C i F.

W dalszej części rozdziału Autorka prezentuje rezultaty badań nad patogennością wybranych szczepów *M. synoviae* w odniesieniu do zarodków kurzych Specific Free Pathogen, oraz kur niosek. W obu eksperymentach potwierdziła Ona występowanie charakterystycznych objawów zakażenia na podstawie obrazu klinicznego zmian zarodków kurzych oraz zmian anatomo- i histopatologicznych obserwowanych w workach powietrznych i jajowodach. Dodatkowym elementem potwierdzającym kontrolę zakażenia była ocena makroskopowa jaj kur niosek z uwzględnieniem ich masy oraz właściwości skorupy wykonanej metodą wzrokową oraz przy pomocy optycznej tomografii koherentnej.

Zastosowanie przez Doktorantkę tak wielu metod umożliwiło precyzyjną diagnostykę zakażeń na tle *M. synoviae*, potwierdza również Jej duże doświadczenie w realizowanych badaniach, co oceniam bardzo pozytywnie.

Rozdział „Dyskusja” stanowi poprawną analizę wyników, w konfrontacji z danymi aktualnego piśmiennictwa. Na tej podstawie jestem przekonana o dobrej znajomości przez Doktorantkę badanych zagadnień i prawidłowej konfrontacji wyników uzyskanych w badaniach własnych z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Autorka, ustosunkowuje się do analizowanych wyników i w sposób czytelny komentuje własne osiągnięcia, przeprowadzając podsumowania i sugestie dotyczące znaczenia uzyskanych wyników badań.

Uzyskane w dysertacji wyniki pozwoliły Autorce na sformułowanie 6 wniosków zawierających całość zagadnień ujętych w przedstawionej do recenzji pracy. We wnioskach, Doktorantka wskazuje na subkliniczny charakter zakażeń *M. synoviae* u drobiu na terenie Polski o prewalencji na poziomie ok. 30%. Doktorantka potwierdziła ponadto występowanie 9 typów genetycznych tego drobnoustroju na terenie naszego kraju, w których występuje zróżnicowanie w obrębie genu *vlhA*, co jak sugeruje Autorka może być efektem ewolucji patogenu. We wniosku trzecim Doktorantka wysuwa hipotezę w zakresie występowania korelacji powtarzającego się motywu aminokwasów w regionie PRR białka MSPB, a występowaniem tropizmu niektórych szczepów *M. synoviae* do innych układów niż lokomotoryczny włączając w to ukł. rozrodczy czy zmiany w skorupie jaj u kur niosek. We wniosku nr 4 Autorka potwierdza patogenność wykorzystanych szczepów *M. synoviae* w

stosunku do SPF zarodków kurzych z występowaniem charakterystycznych objawów zakażenia. Natomiast wniosek nr 5 zawiera informacje o zróżnicowaniu w patogenności szczepów wykorzystanych do zakażenia kur niosek w zakresie objawów klinicznych, zmian anatomo-patologicznych oraz wpływu na wybrane parametry nieśności oraz zmiany w budowie skorupy jaj.

W ostatnim, szóstym wniosku Autorka wskazuje, że zmiany w budowie skorupy jaj z objawami syndromu Anomalii wierzchołka skorupy (Egg Apical Abnormality– EAA) mogą prowadzić do obniżenia wskaźnika wylęgowości lub strat jaj o cienkich skorupach. Z uwagi na fakt, że badania te były tematem wcześniejszych licznych publikacji, wniosek szósty należy pominąć.

Rozdział „Literatura”, w którym Doktorantka przedstawiła wykaz aktualnego piśmiennictwa został zaprezentowany w formie bardzo rozbudowanej na 14 stronach wydruku komputerowego i zawiera ponad 240 pozycji aktualnego piśmiennictwa. Z uwagi na tak liczne pozycje literatury warto byłoby rozważyć przedstawienie ich w formie przyporządkowanych im poszczególnych numerów, co znacznie ułatwi wyszukiwanie poszczególnych pozycji literaturowych z odpowiadającymi im cytowanymi w tekście pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do recenzji dysertacja doktorska Pani mgr Olimpii Kursa odpowiada warunkom określonym w art.13 ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.), co upoważnia mnie do przedłożenia wniosku Wysokiej Radzie Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, o dopuszczenie Pani mgr Olimpii Kursa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Renata Urban-Chmiel