

Institut Weterynarii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Eweliny Szacawy
pt.: „Występowanie zakażeń *Mycoplasma bovis* w populacji bydła w Polsce oraz analiza porównawcza metod badawczych” – wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Bednarka (promotora) i dr hab. Krzysztofa Niemczuka, prof. nadzwyczajnego (promotora pomocniczego) w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Recenzję wykonano przyjmując zlecenie, którym jest pismo Komisji Doktorskiej Rady Naukowej z dnia 24.02.2016 r. (BRN-410/1/16), zgodne z Uchwałą Rady Naukowej PIWet-PIB podjętą w dniu 30.01.2013 r.

Zakażenia *Mycoplasma bovis* są ważnym problemem epidemiologicznym i czynnikiem ekonomicznym decydującym o opłacalności produkcji w hodowli bydła. Są odpowiedzialne za ponad ¼ zapaleń płuc cieląt i młodego bydła. Straty ekonomiczne wynikają również z trudnych do oszacowania skutków zakażeń krów mlecznych. Izolacja mykoplasm z przypadków zapaleń płuc i stawów, także spojówek i przypadków *metritis* oraz *mastitis* potwierdza udział patogenu w stratach ekonomicznych wynikających z zachorowań również u starszych krów. Te okoliczności czynią ważnym i bezwzględnie koniecznym ustalenie stopnia udziału zakażeń mykoplazmami w hodowli bydła w kraju.

W tematykę szacowania skali zagrożenia stad bydła skutkami zakażeń mykoplazmami wpisuje się przedłożona do oceny praca doktorska mgr inż. Eweliny Szacawy pt.: „Występowanie zakażeń *Mycoplasma bovis* w populacji bydła w Polsce oraz analiza porównawcza metod badawczych” – wykonana w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Bednarka (promotora) i dr hab. Krzysztofa Niemczuka, prof. nadzw. (promotora pomocniczego).

Pracę stanowi 96-stronicowe opracowanie wyników badań zrealizowanych w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki pt. „Występowanie oraz charakterystyka molekularna zakażeń *Mycoplasma bovis* u bydła w Polsce” nr 2013/09/N/NZ7/02158 (2014-2016). Opracowanie zostało przygotowane według klasycznego sposobu opisu badań, obejmującego podział treści na 10 rozdziałów, które stanowią: wstęp, cel pracy, materiał i metody, omówienie

wyników, dyskusja, wnioski, streszczenia (w języku polskim i angielskim), piśmiennictwo (124 pozycje) oraz aneks z trzema tabelami zawierającymi informacje o liczbie pobranych próbek, polskich izolatach *M. bovis* zarejestrowanych w bazie GenBank oraz zbieżności antygenowej polskich izolatów terenowych ze szczepem wzorcowym. Dokumentację wyników analiz stanowi 28 rycin oraz 21 tabel zamieszczonych w pracy.

W rozdziale „Wstęp” znajduje się ogólna charakterystyka *Mycoplasma bovis*, krótki opis jej znaczenia epidemiologicznego, mechanizmów rozwoju zakażenia, predylekcji narządowej i objawów klinicznych, metod i technik diagnostyki zakażeń oraz ich leczenia.

Kluczowymi uwagami uzasadniającymi cel podjętych badań jest wskazanie na brak szerszych danych nad występowaniem patogenu w kraju oraz molekularnego zróżnicowaniem szczepów terenowych. Wobec znaczenia ekonomicznego zakażeń dla hodowli oraz perspektywy wykorzystania wyników w programach ograniczania ich skutków, określenie skali problemu, wskazanie skuteczności metod monitoringu i stopnia ich powiązania z klinicznymi zachorowaniami bydła można uznać za ambitny i istotny problem badawczy.

W rozdziale „Materiał i metody” opisano sposób organizacji badań z podziałem na etapy, zasady typowania stad i zwierząt, od których pobierano próbki, rodzaje materiału badawczego oraz podano szczegółowy opis zastosowanych metod badań diagnostycznych. W ich charakterystyce zwraca uwagę nie tylko precyzja opisu procedur, ale również, co ważne - kryteria rozstrzygnięcia o wyniku. Cały rozdział (str. 20-34) wraz ze szczegółowym opisem metod badań molekularnych i metod statystycznego opracowania wyników wskazuje na bardzo dobre opanowanie umiejętności „warsztatowych” doktorantki, tak niezbędnych w realizacji badań epidemiologicznych.

W rozdziale „Wyniki” (str. 35-62) znajdujemy szczegółowy opis wyników pierwszego etapu badań serologicznych i oceny prewalencji uwzględniający zróżnicowanie regionalne oraz opis rezultatów drugiego etapu badań, prowadzonych w stadach podejrzanych o zakażenie. Uwzględniono w nim informacje z badań metodą ELISA na obecności przeciwciał i przypadkach wykrycia antygeny oraz porównawczo skutecznych izolacji patogenu. W dalszej części rozdziału przedstawiono wyniki badań molekularnych nad zróżnicowaniem gatunkowym izolowanych mykoplazm i występowaniem spokrewnionej z nimi *Ureaplasma diversum*, częstością koinfekcji, analizy filogenetycznej szczepów *Mycoplasma bovis* oraz ich spokrewnienia ze szczepami izolowanymi w innych krajach. Ostatnim elementem opisu jest analiza statystyczna stopnia zgodności między wynikami uzyskanymi z zastosowaniem wykorzystanych w badaniach metod diagnostycznych oraz z zarejestrowanymi objawami

klinicznymi. Całość rozdziału prezentuje konsekwentnie realizowany „scenariusz” analiz zmierzających do ustalenia odpowiedzi na pytania wynikające z celu badań.

W podjętej dyskusji (str. 63-73) doktorantka podkreśla unikatowość przeprowadzonych badań w skali kraju i na świecie, zwracając uwagę na fakt, że dotychczas nie przeprowadzono badań nad oceną przydatności oraz zbieżności wyników uzyskanych w badaniach serologicznych, mikrobiologicznych, molekularnych i klinicznych. Zwraca uwagę na dokonujące się zmiany w kryteriach interpretacji wyników uzyskiwanych w teście ELISA, a w konsekwencji różnice w ocenie prevalencji. Podkreśla, że mimo obecności przeciwciał, wykazanie obecności patogenu nie zawsze kończy się powodzeniem. Uzasadnia okoliczności powstania takich niepowodzeń. Wskazuje na częstość przypadków koinfekcji w zakażeniach mykoplazmowych układu oddechowego, fakt współobecności w wymazach zarówno szczepów saprofitycznych i warunkowo chorobotwórczych oraz podobieństwa i różnice w odsetku chorobotwórczych gatunków mykoplazm izolowanych w badaniach własnych i na świecie. Uwzględniając w dyskusji rozbieżności w niektórych wynikach badań własnych i opisanych w piśmiennictwie, wskazuje na ich możliwe przyczyny. Wymienia różnice w rodzaju materiału pobieranego do badań mikrobiologicznych, wieku, ogólnym stanie zdrowia i regionalnym zróżnicowaniu sytuacją epizootyczną, jako potencjalnych czynników odmienności w obserwacjach, co przemawia za „dojrzałością” naukową doktorantki i świadomości istnienia dużej zmienności w badaniach biologicznych. Istotnym elementem dyskusji są teoretyczne rozważania nad prawdopodobnym mechanizmem mutacji wykazanych w obrębie genu *uvrC* oraz ich skutkami dla interpretacji wyników uzyskanych z zastosowaniem metod PCR tego fragmentu genomu. Rozważa także specyfikę „koegzystencji” patogenu w zarażonym organizmie z mechanizmami obrony immunologicznej oraz możliwy wpływ stadiów rozwoju zakażenia i okresowego siewstwa na wyniki badań diagnostycznych. Podejmując dyskusję nad wynikami uzyskanymi różnymi metodami hierarchizuje skuteczność metod mikrobiologicznych i molekularnych względem wyników testu ELISA dla przeciwciał i badania obecności antygeny. Doktorantka stwierdza również, że pozytywny wynik badania metoda PCR/DGGE lub ELISA do określania obecności przeciwciał anti-*Mycoplasma bovis* w powiązaniu z objawami *pneumonii*, *arthritisi* lub *mastitisi* zwiększa poprawność diagnozy wskazującej na aktywne zakażenie. W podsumowaniu ostrożnie wskazuje na konieczność wykonywania kompleksowej diagnostyki z wykorzystaniem badań molekularnych i serologicznych, co wynika z niepatognomicznego charakteru zakażeń i ich specyfiki. Rzeczowość i aktualność

przeprowadzonych badań potwierdzają publikacje, na które powołuje się doktorantka w dyskusji, wśród których znajdują się pozycje kluczowe i bardzo aktualne.

Opisane efekty badań doktorantka podsumowała pięcioma rozsądnie sformułowanymi, rzeczowymi i wyważonymi wnioskami.

Występując w roli recenzenta przedłożonego opracowania chcę podkreślić jasno sprecyzowane cele, mimo iż przedstawiono je w formie kilku akapitów poprzedzonych wprowadzeniem. Kolejne etapy analizy wyników i ich opis odzwierciedlają konsekwentne poszukiwanie odpowiedzi na pytania związane z narzuconym sobie kierunkiem badań. Do poznawczych i praktycznych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych badań należy zaliczyć:

- ocenę prewalencji *Mycoplasma bovis* w stadach bydła na terenie kraju z uwzględnieniem specyfiki regionalnej;
- rzeczywisty odsetek przypadków zakończonych skuteczną izolacją patogenu z wykorzystaniem różnych metod diagnostycznych i stopień ich związku z podejrzeniem zakażenia na podstawie objawów klinicznych;
- poszerzenie rejestru izolatów terenowych *Mycoplasma bovis* w bazie GenBank o warianty pochodzące z przypadków odnotowanych w kraju;
- zwrócenie uwagi na istnienie mutacji nawet w bardzo konserwatywnych rejonach genomu *Mycoplasma bovis*, mogących ograniczać skuteczność diagnostyczną metod PCR;
- wskazanie najczęściej izolowanych szczepów patogenu, dające szansę na uaktualnienie szczepów szczepionkowych i poprawę skuteczności profilaktyki swoistej.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać na dwa aspekty, które były przedmiotem uwagi doktorantki, lecz nie znalazły odzwierciedlenia w analizach. Pierwszym z nich jest wskazanie na konieczność powtarzania badań populacyjnych seroprewalencji wynikającą ze zmian kryteriów interpretacji wyników (przez producenta zestawów diagnostycznych) uzyskiwanych w teście ELISA. Śledząc zakres przeprowadzonych badań sądzę, że był on wystarczający, aby również na podstawie własnej bazy danych ustosunkować się do obowiązujących kryteriów oceniając czułość i specyficzność metody. Druga uwaga dotyczy możliwości wykorzystania zarejestrowanych objawów klinicznych celem wskazania lub zanegowania interakcji między nimi a wykryciem patogenu i poziomem przeciwciał (przyrostem gęstości optycznej próbki względem wzorca). Jako kryterium statystyczne rozstrzygające w sugerowanych analizach proponuję – regresję logistyczną. Obie uwagi w niczym nie umniejszają jednak, jakości przygotowanego opracowania, lecz wskazuję, jako możliwe do wykorzystania przy przygotowywaniu publikacji.

Przedstawione opracowanie wykonanych badań oceniam bardzo wysoko, a kierując się niezaprzeczalną wartością merytoryczną i aplikacyjną badań wnioskuję we właściwym etapie przewodu doktorskiego o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej, doceniając zakres i wnikliwość badań, stopień trudności nakreślonych celów badań, a także wkład pracy w przygotowanie opracowania stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Szacawy pt.: „Występowanie zakażeń *Mycoplasma bovis* w populacji bydła w Polsce oraz analiza porównawcza metod badawczych” spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z 2003 r., ze zmianami w Dz.U. z 2005 r.) oraz § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadaniu tytułu profesora (Dz. U. Nr 204, poz. 1200).

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr inż. Eweliny Szacawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. n. wet. Marek Gehrke
prof. nadzw. UP w Poznaniu