

Wrocław, 2017-12-08

Prof. dr hab. Alina Wieliczko
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

OCENA rozprawy doktorskiej

mgr Olimpii Kursy pt.: **„Charakterystyka terenowych szczepów *Mycoplasma synoviae* w zakresie ich genotypu oraz patogenności w przebiegu klinicznych przypadków syndromu anomalii wierzchołka skorupy jaj u kur”** wykonanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Grzegorza Tomczyka, prof. nadzw. oraz dr Katarzyny Dudek

Recenzję wykonano realizując uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętą w dniu 15. 04. 2015 r., na podstawie maszynopisu pracy, przesłanego przez przewodniczącego Komisji Doktorskiej, prof. dr hab. Dariusza Bednarka (pismo BRN-410/11/17 z dnia 24.10.2017 r.).

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy bardzo interesującego zagadnienia jakim bez wątpienia są zakażenia drobiu drobnoustrojami z rodzaju *Mycoplasma*. Zakażenia te stanowią istotny ogólnoswiatowy problem epidemiologiczny i ekonomiczny w produkcji drobiarskiej. Wielkotowarowa produkcja, często z nadmiernym zagęszczeniem drobiu oraz nieodpowiednimi warunkami środowiskowymi w obiektach produkcyjnych, jak też hodowle wielopokoleniowe sprzyjają rozprzestrzenianiu się zakażeń mykoplazmami. Dodatkowo, szczególne właściwości mykoplazm, jak tropizm do komórek błony śluzowej układu oddechowego, predylekcja do kolonizacji narządu rozrodczego (jajnika i jajowodu) i układu lokomotorycznego, destabilizacja funkcji układu immunologicznego (immunosupresja) oraz pionowa transmisja drobnoustrojów sprawiają, że zapobieganie zakażeniom nie jest procesem łatwym.

Spośród wielu gatunków mykoplazm jakie występują u ptaków, *Mycoplasma synoviae* (MS) obok *Mycoplasma gallisepticum* (MG) i *M. meleagridis* (MM) stanowi najważniejszy czynnik etiologiczny mykoplazmozy drobiu. Do tej pory zakażenia powodowane przez MS awiopatolodzy wiązali najczęściej z zapaleniem stawów i pochewek ścięgowych nóg ptaków (szczególnie kurcząt brojlerów). W ostatnich latach obserwacje

kliniczne i prowadzone badania potwierdziły istotną rolę *M. synoviae* w dysfunkcji układu oddechowego oraz występowaniu anomalii w budowie skorupy jaja, określane jako syndrom anomalii wierzchołka skorupy jaj (ang. Eggshell Apex Abnormalities – EAA). Do tej pory jednak nie wyjaśniono dokładnie patogenezы syndromu EAA, wiadomo natomiast, że straty powodowane wysokim odsetkiem wadliwych jaj w stadzie niosek mogą sięgać nawet 25%.

W dostępnej literaturze, również polskiej, stwierdza się doniesienia o rozprzestrzeniania się zakażeń *M. synoviae* u drobiu, lecz do tej pory w kraju nie prowadzono badań w zakresie charakterystyki molekularnej terenowych szczepów. Nie określano również pokrewieństwa genetycznego czy patogenności izolatów pozyskanych z układu rozrodczego niosek, tym z przypadków zaburzeń w budowie skorupy jaj wskazujących na syndrom EAA. Biorąc powyższe pod uwagę szczególnie wysoko należy ocenić wybór tematyki badawczej dysertacji. Dotyczy ona problemu deficytowego, o dużym znaczeniu praktycznym, jak również niezwykle interesującego z naukowego punktu widzenia. Pragnę przy tym podkreślić, że zaplanowane badania były prowadzone w renomowanym ośrodku naukowym pod kierunkiem profesora Grzegorza Tomczyka, który jest niekwestionowanym specjalistą w obszarze zakażeń drobiu mykoplazmami.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest oprawionym wydrukiem komputerowym formatu A4 złożonym z 131 stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich w dziedzinie eksperymentalnych nauk z zakresu medycyny weterynaryjnej i zawiera 10 uporządkowanych, objętościowo zrównoważonych rozdziałów. Podkreślić należy obszerny materiał dokumentacyjny wyników składający się z 18 tabel i 52 kolorowych rycin, które zostały zamieszczone w tekście odpowiednich rozdziałów oraz starannie dobrane cytowane piśmiennictwo. Dokumentację uzupełnia rozdział 10, który jest zestawieniem 9 załączników w formie tabelarycznej stanowiących uzupełnienie danych wykorzystanych do analizy filogenetycznej szczepów oraz zamieszczony na wstępie pracy wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy. Praca napisana jest bardzo starannie, zwięzłym i zrozumiałym językiem.

We wstępie do pracy Autorka w oparciu o aktualny przegląd piśmiennictwa, poprawnie i czytelnie przedstawia problem naukowy powiązany z podjętymi badaniami. Wykazała, że dotychczasowa wiedza na temat roli *Mycoplasma synoviae* w patologii kur, szczególnie układu rozrodczego niosek jest niepełna i fragmentaryczna a coraz szersze spektrum patogennego oddziaływania u kur niosek skutkuje nie znanym do tej pory przebiegiem klinicznym choroby (jak syndrom EAA) oraz dużymi stratami ekonomicznymi w sektorze produkcji jaj. Obserwacje te stanowiły dobrą motywację i podstawę podjęcia decyzji

do realizacji własnych badań. W mojej ocenie wstęp jest zwięzłą i poprawnie skomponowaną częścią pracy, dobrze wprowadzającą czytającego w całość zagadnień będących przedmiotem badań.

Zgodnie z własną, dobrze przemyślaną koncepcją Doktorantka jasno sprecyzowała cel pracy obejmujący trzy obszerne zadania, których procedurę wykonania przedstawiła w rozdziale materiał i metody. Doktorantka przeprowadziła:

- zakres badań terenowych celem określenia występowania zakażeń *M. synoviae* w stadach kur niosek o różnym statusie zdrowotnym (łącznie przebadala 906 stad) a także utworzenia kolekcji szczepów *M. synoviae* służących do dalszych badań;

- szeroki zakres badań laboratoryjnych obejmujący badania mikrobiologiczne (hodowlane), badania molekularne potwierdzające obecność materiału genetycznego *M. synoviae* a także charakterystykę genotypową izolatów- czyli charakterystykę molekularną terenowych izolatów, a także

- badania eksperymentalne na zarodkach kurzych SPF oraz kurach nioskach celem określenia patogenności wybranych szczepów *M. synoviae*, pozyskanych z przypadków zaburzeń w budowie skorupy jaj wskazujących na syndrom EAA.

Uwagę zwraca nowoczesna i różnorodna metodyka, począwszy od badań mikrobiologicznych (tj. hodowli mykoplazm) poprzez PCR konwencjonalny i LAMP PCR (wykrywanie genu *vlhA*) i real-time PCR (wykrywanie regionu międzygenowego 16S-23S rRNA) aż do analizy filogenetycznej fragmentu genu *vlhA* (określenie pokrewieństwa genetycznego szczepów *M. synoviae*). Metody prowadzonych badań, w opinii recenzenta, nie budzą zastrzeżeń i są w pełni wystarczające do realizacji postawionych celów a zakres wykonanych badań świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnego warsztatu badawczego. Podkreślę jeszcze uporządkowane i czytelne przedstawienie przebiegu realizowanych kolejno zadań badawczych.

Rozdział „Wyniki” jest najobszerniejszym fragmentem ocenianej pracy, stanowi 38 stron maszynopisu łącznie z 34 rycinami i 18 tabelami. Z klinicznego punktu widzenia interesujące są wyniki przedstawiające informacje o rozprzestrzenieniu zakażeń *M. synoviae* w stadach kur Polsce. W oparciu o badania molekularne (real-time PCR) Doktorantka wykazała obecność materiału genetycznego *M. synoviae* w 265 (29%) badanych stadach, przy czym materiał genetyczny pochodził najczęściej z układu oddechowego. W badaniach metodą PCR potwierdziła obecność specyficznego dla *M. synoviae* genu *vlhA* w 202 stadach (22%), zaś w metodzie LAMP wykazała 227 stad dodatnich (25%). Najwięcej stad kur zakażonych *M. synoviae* Autorka stwierdziła na terenie województwa mazowieckiego (100 stad),

kujawsko-pomorskiego (27 stad) i wielkopolskiego (21 stad), czyli tam gdzie koncentracja ferm drobiu jest najwyższa.

W odniesieniu do wybranych 60 szczepów spośród 129 zidentyfikowanych jako *M. synoviae* w latach 2010-2016 Doktorantka określiła pokrewieństwo genetyczne w oparciu o analizę filogenetyczną fragmentu genu *vlhA*. Oryginalnym osiągnięciem Autorki jest opracowanie drzewa filogenetycznego dla szczepów własnych *M. synoviae* jak też pokrewieństwo genetyczne między polskimi szczepami i zamieszczonymi uprzednio w bazie danych GenBank. Autorka wykazała, że szczepy własne *M. synoviae* należały do 9 typów genetycznych oznaczonych od A-I, według klasyfikacji opisanej przez Dijkmana i wsp. (2014), przy czym najliczniejszymi były typ F (20 szczepów) i typ C (11 szczepów). W obrębie najliczniejszego genotypu F znalazło się oprócz 20 szczepów własnych Doktorantki także 8 zdeponowanych w bazie danych GenBank. Szczepy te wykazywały 91-100% podobieństwa względem siebie. Były to izolaty uzyskane z wymazów z jamy nosowo-gardłowej, z tkanek układu rozrodczego jak również z przypadków klinicznych syndromu EAA odnotowanego w Holandii, we Włoszech czy Korei Południowej.

Charakteryzując patogenność wybranych szczepów *M. synoviae* Doktorantka wykazała, że były one patogenne dla zarodków kurzych SPF - wywoływały u nich spadek masy ciała i zmiany anatomopatologiczne charakterystyczne dla zakażeń mykoplazmami. Natomiast w doświadczeniu przeprowadzonym na 24 tyg. kurach nioskach, eksperymentalnie zakażonych Doktorantka wykazała istotny wpływ *M. synoviae* na układ rozrodczy kur niosek (na ten eksperyment uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej). Oba szczepy użyte do zakażeń powodowały objawy ze strony układu oddechowego z obecnością ropnej wydzieliny w szparze podniebiennej oraz zmętnienie worków powietrznych. W badaniu sekcyjnym zmiany patologiczne notowano u wszystkich ptaków głównie w układzie rozrodczym w postaci: rozszerzenia grzbietów fałd magnum jajowodu, obecności pęcherzy z płynem surowiczym w błonie śluzowej kielicha jajowodu, drobnych ognisk zapalnych wraz z pergaminowością błony śluzowej macicy oraz u 1 kury obecność jaja ze zdeformowanym wierzchołkiem. Cennym uzupełnieniem do obserwowanych objawów klinicznych i zmian patologicznych, zarówno z naukowego jak też klinicznego znaczenia, są wyniki badań mikrobiologicznych (reizolacja mykoplazm) serologicznych (określenie obecności specyficznych przeciwciał dla *M. synoviae*), oraz histopatologicznych jajowodów zakażonych kur niosek. Bogata dokumentacja fotograficzna z tego zakresu badań włączona do tego rozdziału wraz z pełnym opisem wyników świadczy o przemyślanym i profesjonalnym podejściu Doktorantki do przedstawienia swoich osiągnięć. Bardzo dużą

wartość posiadają również przedstawione wyniki oceny zmian makroskopowych jaj znoszonych przez zakażone nioski. Pierwsze jaja ze zmianami typowymi dla syndromu EAA pojawiły się między 14 a 21 dniu po zakażeniu, a ich odsetek był stosunkowo wysoki – na poziomie 24,5% (dla szczepu 146-3J/15PL) i 26,5% (dla szczepu GK1/15PL). I w tym przypadku opis zmian skorupy jaj Autorka wzbogaciła zdjęciami, które w sposób czytelny obrazują anomalie w budowie skorupy jaj w następstwie zakażenia kur niosek *M. synoviae*. Ponadto, do oceny zmian w gęstości skorupy jaj z anomaliami wskazującymi na EAA wykorzystwała metodę optycznej tomografii koherentnej (OTC). Są to badania nowatorskie i unikatowe na skalę światową. Dopelnieniem całości obserwacji przebiegu eksperymentalnego zakażenia kur niosek *M. synoviae* jest przeprowadzona przez Doktorantkę analiza statystyczna wybranych parametrów produkcyjnych, w tym poziomu nieśności, masy jaj i oceny makroskopowej jaj, wykonana z zastosowaniem testu chi-kwadrat (inaczej test Pearsona).

Chcę podkreślić, że wszystkie wyniki uzyskane przez Doktorantkę posiadają dużą wartość naukową i praktyczną dlatego powinny zostać jak najszybciej opublikowane, bo tylko w ten sposób wzbogacą wiedzę szerokiego grona awiopatologów, którzy na co dzień borykają się z problemami mykoplazmozy w stadach drobiu. Nie do przecenienia jest tutaj wspomniana dokumentacja fotograficzna.

Poprawnie napisana dyskusja dowodzi znajomości zagadnienia i piśmiennictwa. W tym rozdziale Autorka cytując dane piśmiennictwa stara się odnieść uzyskane wyniki badań własnych do rezultatów innych autorów. W kilku punktach podkreśla oryginalność podjętych przez siebie tematów i uzyskane wyniki wykazując się sporą wiedzą na temat dotychczas wykonanych prac innych badaczy. Szczególnie interesująca i aktualna jest dyskusja w zakresie charakterystyki molekularnej szczepów *M. synoviae* występujących w stadach kur różnych regionów świata, także polemika na temat korelacji pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym izolatów a ich patogennością dla kur niosek, w tym szczególnie tropizm do układu rozrodczego niosek, skutkujący wieloma ważnymi aspektami w produkcji drobiarskiej (w tym również na rozwój embrionalny i postembrionalny zarodków). Doktorantka sprawnie konfrontuje też wyniki najcenniejszych badań własnych z zakresu zmian patologicznych (makro- i mikroskopowych) w obrębie jajowodu zakażonych niosek, w tym nowatorskie na skalę światową badania skorupy jaj zmienionych przebiegiem syndromu EAA przeprowadzone metodą optycznej tomografii koherentnej wykazując się przy tym sporą wiedzą.

Na zakończenie pracy Doktorantka formułuje 6 wniosków, których treść jest dobrze udokumentowana uzyskanymi rezultatami.

Obowiązki recenzenta w zakresie uwag krytycznych recenzowanej rozprawy doktorskie są generalnie znikome. Uważam np. że pod rycinami zamieszczonymi we wstępie brakuje podpisu czyjego autorstwa są zamieszczone zdjęcia (ryciny 1-5) czy też błędny jest zapis w języku angielskim słowa "streszczenie" w nagłówku na str. 108 i 109 (jest: "Summery" powinno być "Summary"). Ponadto drobne błędy literowe zaznaczono w maszynopisie pracy.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca doktorska mgr Olimpii Kursy dotyczy interesującego, zarówno z naukowego (poznawczego) jak i praktycznego punktu widzenia, problemu jakim jest zakażenie kur *Mycoplasma synoviae*, w szczególności tropizm do układu rozrodczego kur niosek i zdolność wywoływania syndromu anomalii wierzchołka skorupy jaj. Dysertacja ta stanowi nowatorskie rozwiązanie problemu naukowego i w pełni potwierdza wiedzę teoretyczną Doktorantki. Została wykonana metodycznie poprawnie, z zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych, a uzyskane wyniki mogą mieć duże znaczenie praktyczne w ochronie zdrowia ptaków. Na uwagę zasługuje nie tylko ogrom włożonej pracy w realizację wszystkich zadań, ale też umiejętność planowania oraz właściwej analizy i dyskusji nad uzyskanymi wynikami. Na tej podstawie stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Olimpii Kursy pt.: **„Charakterystyka terenowych szczepów *Mycoplasma synoviae* w zakresie ich genotypu oraz patogenności w przebiegu klinicznych przypadków syndromu anomalii wierzchołka skorupy jaj u kur”** spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm. W Dz. U. z 2015 r. poz. 249) i przedkładam Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając osiągnięte wyniki i ich przydatność w celach poznawczych i praktycznych wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.


Prof. dr hab. Alina Wieliczko