

Olsztyn, 30.01.2020 r.

prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj
Katedra Epizootiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

OCENA

rozprawy doktorskiej **mgr Agaty Mitury**

pt. „Ptaki i gady jako rezerwuar nowych gatunków chlamydii”

wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Moniki Szymańskiej-Czerwińskiej, profesora instytutu, w
Zakładzie Chorób Bydła i Owiec

w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym– Państwowym Instytucie Badawczym.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 15.01.2020 r. powołujące się na uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 13.12.2017 r.

Chlamydiozy, szeroko rozpowszechnione choroby ludzi i zwierząt, znane są niemalże od zarania ludzkości. Pierwsze wzmianki o jaglicy pochodzą sprzed ok. 3 tys. lat p.n.e. Sam drobnoustroj został opisany wiele wieków później. Izolacji udało się dokonać dopiero w XX w. Wtedy to opisano budowę, cykl rozwojowy, patogenezę wywoływanych przez chlamydie chorób. Mimo tylu lat badań wciąż jeszcze wiele pytań dotyczących chlamydii pozostaje bez odpowiedzi lub jest przedmiotem sporu uczonych. Między innymi dyskutowana jest systematyka chlamydii, nie poznano do końca różnorodności genetycznej i możliwości ekspansyjnych drobnoustroju. Chlamydie to niełatwy materiał do badań. Wpływa na to przede wszystkim wewnątrzkomórkowy charakter drobnoustroju, jego niewielkie rozmiary a zwłaszcza trudności hodowlane. Chlamydie to bakterie, które nie dają się namnażać na klasycznych pożywkach bakteriologicznych. Wymagają hodowli w zarodkach kurzych lub kulturach komórkowych. Jest to również trudny patogen z punktu widzenia klinicznego. Chlamydiozy to zwykle choroby przewlekłe, z tendencją do nawrotów, które często nie poddają się leczeniu antybiotykami. Wielki postęp w badaniach nad chlamydiami nastąpił dzięki nowym technikom badawczym, zwłaszcza opartym na biologii molekularnej, które ułatwiły identyfikację drobnoustroju w badanym materiale i ustalenie klasyfikacji genotypowej. Ciągle jednak do wielu badań konieczne jest uzyskanie żywych bakterii, co nie

jest łatwe, a niekiedy niemożliwe. Badania nad *Chlamydia* spp. wymagają odpowiednio wyposażonego laboratorium, umiejętności, wiedzy i wytrwałości badacza.

Warto podkreślić, że chlamydiozy zwierząt mają często charakter zoonotyczny. Chlamydioza ptaków w Polsce należy do chorób zakaźnych zwierząt podlegających obowiązkowi rejestracji, lecz powszechnie uważa się, że rzeczywista liczba przypadków jest niedoszacowana, głównie z powodu częstych zakażeń bezobjawowych. Stosunkowo niewiele wiadomo na temat różnorodności genetycznej chlamydii występujących w populacji ptaków i gadów w Polsce, zwłaszcza ptaków wolno żyjących, które odgrywają znaczącą rolę w rozprzestrzenianiu drobnoustroju w środowisku, często na bardzo duże odległości. Natomiast na temat występowania chlamydii u gadów w Polsce wiadomo niewiele. Dlatego też podjęcie przez mgr Agatę Miturę badań mających na celu ocenę częstości występowania oraz różnorodności genetycznej *Chlamydia* spp. u ptaków i gadów w Polsce uważam za uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór czterech publikacji poprzedzony zwartym opracowaniem przeprowadzonych badań. Opracowanie to liczy 42 strony i składa się z 8 rozdziałów, takich jak Wstęp, Cel i zakres pracy, Metodyka badań, Podsumowanie uzyskanych wyników badań, Wnioski, Streszczenia w językach polskim i angielskim oraz Bibliografia. Na końcu pracy zamieszczono publikacje stanowiące rozprawę doktorską.

We wstępie, poprzedzonym wykazem publikacji stanowiących rozprawę doktorską oraz wykazem stosowanych w opracowaniu skrótów, Doktorantka szczegółowo opisała systematykę rzędu *Chlamydiales*, strukturę genomu *Chlamydiaceae*, cykl rozwojowy, patogenność oraz znaczenie *Chlamydia* spp. występujących u ptaków i gadów.

Jasno sformułowany cel pracy został zawarty w czterech zadaniach, które obejmowały: ocenę częstości występowania zakażeń *Chlamydia* spp. na terenie Polski u ptaków wolno żyjących, w stadach ptaków hodowlanych i u gadów, analizę filogenetyczną sekwencji genów rybosomalnych *Chlamydia* spp. występujących u zwierząt w Polsce oraz genotypowanie pozyskanych izolatów, izolację szczepów *Chlamydia* spp. w hodowli komórkowej i ich charakterystykę molekularną, oraz ocenę zagrożenia ludzi.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Metodyka badań” zostały opisane liczba, rodzaj i metody pobierania próbek do badań oraz zastosowane techniki molekularne i serologiczne do wykrywania odpowiednio materiału genetycznego chlamydii oraz przeciwciał dla *Chlamydia* spp. w surowicy ludzi. Opisane zostały też zastosowane metody

izolacji drobnoustroju na hodowlach komórkowych oraz metody analizy filogenetycznej otrzymanych sekwencji, ocena zmienności *Chlamydia* spp oraz zastosowane metody analizy statystycznej. Na uznanie zasługuje dobór technik wykorzystanych w realizacji pracy, takich jak real-time PCR, MLST, mikromacierze czy też hodowle na kulturach komórkowych, co ma istotne znaczenie w przypadku pracy z tak „trudnym” do badań drobnoustrojem, jakim jest chlamydia.

W rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie uzyskanych wyników badań” Doktorantka w dwóch podrozdziałach, pierwszym dotyczącym ptaków, drugim gadów, opisuje rezultaty przeprowadzonych badań. Na uwagę zasługuje opisanie po raz pierwszy u ptaków wolno żyjących nowych genotypów chlamydii w tym ich izolację i charakterystykę molekularną. Równie interesujące jest wykazanie obecności badanych drobnoustrojów u klinicznie zdrowego drobiu, głównie u kur, u których wykazano obecność klasycznych, chorobotwórczych również dla człowieka, szczepów *C. abortus*, dotychczas uznawanych za występujące tylko u ssaków. Jednocześnie wykazano, na podstawie obecności przeciwciał w surowicy, dwukrotnie wyższe ryzyko zakażenia u osób mających kontakt z ptakami.

U gadów natomiast wykazana została obecność szczepów należących do dwóch nowych gatunków rodziny *Chlamydiaceae*, w tym jednego opisanego po raz pierwszy. Warto zaznaczyć, że stosunkowo niewiele jest opublikowanych badań dotyczących gromady gadów. Zatem sama próba podjęcia takiego zadania zasługuje na uznanie, a wszystkie uzyskane wyniki stanowią cenną wartość poznawczą.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła 7 trafnych wniosków dowodzących osiągnięcia zamierzonych celów.

Ostatni rozdział zatytułowany „Bibliografia” zawiera 150 pozycji odpowiednio dobrane, głównie anglojęzycznego piśmiennictwa, wskazującego na umiejętność wyboru materiałów źródłowych koniecznych do analizy i dyskusji uzyskanych wyników.

Na końcu rozprawy umieszczono kopie czterech spójnych tematycznie prac, w tym jednej przeglądowej i trzech prac oryginalnych, opublikowanych w czasopismach znajdujących się na liście czasopism punktowanych przez MNiSW, takich jak: Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, PLoS One i Journal of Veterinary Research, których Impact Factor mieści się między 0,357 a 2,766. Uzyskany sumaryczny IF wynosi 6,7, a liczba punktów w/g MNiSW - 100. Prace zostały opublikowane w latach 2014-2017:

Rozprawę doktorską stanowią następujące publikacje:

Praca przeglądowa

1. Mitura A, Szymańska-Czerwińska M, Niemczuk K, Jeleusizowa A. 2014. „Chlamydia in birds – occurrence, new species and zoonotic potential – a review.” Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 58: 503–506. (punkty MNiSW: 15 pkt.; IF: 0,357)

II. Prace oryginalne

1. Szymańska-Czerwińska M, Mitura A, Niemczuk K, Zaręba K, Jodełko A, Pluta A, Scharf S, Vitek B, Aaziz R, Vorimore F, Laroucau K, Schnee C. 2017. „Dissemination and genetic diversity of chlamydial agents in Polish wildfowl: isolation and molecular characterisation of avian *Chlamydia abortus* strains.” PLoS One 12(3): e0174599. (punkty MNiSW: 35; IF: 2,766)
2. Szymańska-Czerwińska M, Mitura A, Zaręba K, Niemczuk K, Schnee C, Koncicki A, Niemczuk K. 2017. „Poultry in Poland as Chlamydiaceae carrier.” Journal of Veterinary Research 61: 411-419. (punkty MNiSW: 15; IF: 0,811)
3. Mitura A, Niemczuk K, Zaręba K, Zając M, Laroucau K, Szymańska-Czerwińska M. 2017. „Free-living and captive turtles and tortoises as carriers of new *Chlamydia* spp.” PLoS One 12(9):e0185407. (punkty MNiSW: 35; IF: 2,766)

W dwóch pracach mgr Agata Mitura jest pierwszym autorem, w dwóch drugim, lecz zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów we wszystkich pracach Jej wkład jest wiodący.

Podstawą recenzowanej rozprawy doktorskiej są powyżej wymienione artykuły. Wszystkie zostały opublikowane w znaczących czasopismach naukowych, co oznacza, że wcześniej poddano je recenzjom. Zatem nieliczne uwagi, które nasunęły się podczas czytania recenzowanej pracy doktorskiej dotyczą jedynie treści opracowania przeprowadzonych badań.

*We wstępie, w podrozdziale 1.3 pt. Cykl rozwojowy” pisząc o transformacji chlamydii z formy RB w EB czytamy, że „...nie jest to proces sprzężony w czasie dla wszystkich komórek potomnych..” – co autorka rozumie przez sprzężenie w czasie w tym przypadku?

*W moim odczuciu w opracowaniu daje się zauważyć nadużywanie obcobrzmiałych sformułowań takich jak: infekcja, terapia, raportowanie, zamiast: zakażenie, leczenie, czy opisywanie.

* W rozdziale „Cel i zakres pracy”, cel 4. Można było nieco prościej sformułować, np. „Ocena zagrożenia ludzi zakażeniami *Chlamydia* spp. pochodzącymi od ptaków”.

*W rozdziale „Metodyka badań”, podrozdział 3.1, znajduje się informacja, że: „Materiał do badań pochodził od ptaków wolno żyjących należących do 16 różnych rodzin” – nasuwa się pytanie ile było gatunków badanych ptaków?

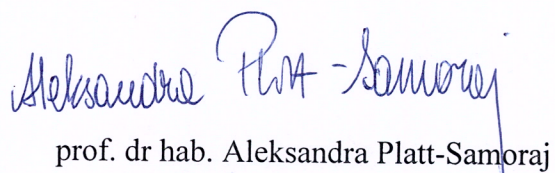
*W podrozdziale 3.4 pt. „Analiza filogenetyczna i ocena zmienności *Chlamydia* spp.” Doktorantka napisała, cyt.: „Analizę otrzymanych sekwencji oraz konstrukcję dendrogramów i drzew filogenetycznych przeprowadzono z użyciem...”- Dendrogram jest to diagram w postaci drzewa, czy zatem nie można było użyć jednego z tych dwóch określeń?

Przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana niezwykle starannie. Nie sposób doszukać się w niej błędów redaktorskich. Praca została bardzo dobrze zaplanowana, doskonale wykonana a otrzymane wyniki są bardzo interesujące i wnoszą nowe wartości do obecnego stanu wiedzy na temat występowania zakażeń *Chlamydia* spp., a drobne uwagi mają charakter dyskusyjny bez wpływu na wysoką ocenę pracy.

Reasumując, należy stwierdzić, że wykonane przez mgr Agatę Miturę obszerne i pracochłonne badania dostarczyły ciekawych i cennych wyników poznawczych oraz aplikacyjnych, zasługujących na pozytywną ocenę. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Mitury pt. „**Ptaki i gady jako rezerwuuar nowych gatunków chlamydii**” odpowiada warunkom określonym w Art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz warunkom określonym w § 6. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie mgr Agaty Mitury do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę też o wyróżnienie pracy, ponieważ uważam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Mitury w sposób znaczący wzbogaca wiedzę na temat występowania *Chlamydia* spp. u ptaków i gadów w Polsce.

Olsztyn, 30.01.2020 r.


prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj