

Warszawa 30. 07. 2021.

Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

Państwowy Instytut Weterynaryjny- Państwowy Instytut Badawczy

Komisja Doktorska Rady Naukowej

Przewodniczący Komisji Doktorskiej

Prof. dr hab. Dariusz Bednarek

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Łukasza Radulskiego pt. „Wykrywanie zakażeń bakteriami z rodzaju *Mycobacterium* u zwierząt wolno żyjących i towarzyszących przy użyciu nowoczesnych metod badawczych”

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 08. 03. 2019 r. dokonałem recenzji pracy doktorskiej mgr. inż. Łukasza Radulskiego pt. „Wykrywanie zakażeń bakteriami z rodzaju *Mycobacterium* u zwierząt wolno żyjących i towarzyszących przy użyciu nowoczesnych metod badawczych”.

Rozprawa autorstwa mgr. inż. Łukasza Radulskiego przyczynia się do doskonalenia diagnostyki zakażeń bakteriami z rodzaju *Mycobacterium*, ze szczególnym ukierunkowaniem na zwierzęta wolno żyjące i towarzyszące. W tym zakresie odczuwany jest niedobór projektów badawczych, publikacji. Tak więc, rozprawę należy uznać za oryginalną, niezwykle potrzebną i wartościową. Jej tytuł został sformułowany w sposób prawidłowy i adekwatny do treści. Wyniki badań mgr. inż. Łukasza Radulskiego umożliwiają bardziej wiarygodną ocenę zarówno sytuacji epidemiologicznej wśród zwierząt wolno żyjących i towarzyszących, jak i roli Mykobakterii w rozprzestrzenianiu chorób, biorąc pod uwagę możliwość wielokrotnego bezpośredniego kontaktu chorego zwierzęcia towarzyszącego z człowiekiem, czy też obustronnego przenoszenia zakażeń pomiędzy populacjami zwierząt gospodarskich i wolno żyjących, które wykorzystują te same pastwiska.

Przykładem obustronnego przenoszenia czynników zakaźnych, w tym prątków, jest relacja bydło domowe – żubry. W okresie letnim pojedyncze żubry, najczęściej samce, wędrują po pastwiskach i uprawach przylegających do terenów leśnych. Przebywanie na naturalnie nawożonym obszarze stwarza możliwość kontaktu z zarazkami pochodzącymi od bydła domowego. Nie można również wykluczyć obecności zarazków groźnych dla bydła domowego w wydalinach i wydzielinach żubrów. W okresie zimowym możliwość ekspozycji żubrów na zarazki pochodzące od bydła domowego stwarza dokarmianie sianem, burakami i marchwią, pochodzącymi z przylegających do terenów leśnych gospodarstw.

Korzystanie ze wspólnych z bydłem domowym pastwisk było prawdopodobnie główną przyczyną wystąpienia gruźlicy bydlęcej u żubrów wolno żyjących w Bieszczadach. Pod uwagę należy również wziąć potencjalną obecność prątków w pozostawianych na tych pastwiskach przez żubry wydalinach i wydzielinach, co stwarza zagrożenie dla bydła domowego. Doktorant odpowiednio przedstawia w rozprawie powyższy aspekt.

Bardzo istotnym walorem rozprawy jest wstęp, będący odzwierciedleniem olbrzymiej wiedzy i profesjonalizmu doktoranta. Jest to bardzo wartościowe kompendium wiedzy nt. rodzaju *Mycobacterium*, umiejętnie odnoszące się do tematu rozprawy. Doktorant przedstawia charakterystykę rodzaju *Mycobacterium* z uwzględnieniem klasyfikacji, budowy i właściwości prątków. Najpierw odnosi się do prątków wywołujących gruźlicę. Uwypukla problem gruźlicy bydlęcej związanej z zakażeniami *Mycobacterium bovis* i *Mycobacterium caprae*, w tym gruźlicy bydlęcej u zwierząt spoza gatunku bydła domowego. Bardzo jasno opisuje zwalczanie gruźlicy zwierząt w Polsce w świetle obowiązujących przepisów. Na podkreślenie zasługuje wykonywanie przez Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, pomimo braku odpowiednich uregulowań prawnych, badań różnorodnych próbek pochodzących od zwierząt spoza gatunku bydła domowego, pobieranych pośmiertnie oraz jeśli to możliwe przyżyciowo. Następnie doktorant przedstawia problem mykobakterioz zwierząt oraz ludzi wywoływanych przez prątki kwasooporne (NTM) inne niż *Mycobacterium leprae* i prątki z grupy MTBC. Wstęp kończy opis diagnostyki zakażeń zwierząt bakteriami z rodzaju *Mycobacterium* w Polsce i na świecie. Taka konstrukcja wstępu w pełni odpowiada tematowi pracy, jak również w dalszej części przeprowadzonej dyskusji.

Ogólny cel pracy został prawidłowo sformułowany – dostarczenie dowodów naukowych na występowanie bakterii z rodzaju *Mycobacterium* wśród zwierząt wolno żyjących i towarzyszących oraz doskonalenie dostępnych metod diagnostycznych ułatwiających

wykrywanie oraz identyfikację tych mikroorganizmów. Doktorant umiejętnie sformułował również 4 cele szczegółowe odnoszące się do wykrywania i identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Mycobacterium* w próbkach pochodzących od zwierząt wolno żyjących i towarzyszących, oceny spektrum gospodarzy prątków wśród różnych gatunków zwierząt, jak również usprawnienia metod wykrywania prątków w badanych próbkach i metod identyfikacji gatunkowej wyizolowanych szczepów.

Badaniom został poddany materiał pochodzący od 519 zwierząt różnych gatunków, co zostało w sposób przejrzysty przedstawione w odpowiedniej tabeli. Między innymi badaniom poddano materiał pochodzący od 70 dzików, 63 żubrów, 55 bocianów białych, 47 żółwi czerwonych, 25 żółwi żółto brzuchych, 27 osłów domowych, 1 konia. Ta szeroka reprezentacja różnych gatunków to bardzo ważny atut pracy. W badaniach wykorzystano również wiele szczepów środowiskowych z rodzaju *Mycobacterium*.

Szczegółowy opis metod badawczych doktorant w sposób udany i wpływający pozytywnie na przejrzystość pracy umieścił w aneksie metodycznym. W badaniach zastosowano metody hodowlane z wykorzystaniem podłoży stałych i płynnych (MGIT), metody mikroskopowe – barwienie metodą Ziehl-Neelsena, metodę immunochromatograficzną do szybkiej identyfikacji prątków z grupy MTBC (MGIT Tbc Identification Test, Becton Dickinson, USA), metody molekularne – real time PCR w kierunku *Mycobacterium tuberculosis complex*, real-time PCR w kierunku *Mycobacterium avium*, multiplex PCR w celu potwierdzenia lub wykluczenia przynależności bakterii do rodzaju *Mycobacterium* oraz grupy MTBC, test Hain Lifescience CM do zidentyfikowania *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. ulcerus*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*, sekwencjonowanie molekularne konserwatywnych genów 16S rRNA, hsp65, rpoB i 16S – 23S ITS do identyfikacji gatunków prątków, metoda MALDI – TOF MS (technika ekstrakcji białek z wykorzystaniem kwasu mrówkowego oraz metoda bezpośrednia z wykorzystaniem kwasu trifluorooctowego) do określania gatunków prątków spoza kompleksu gruźliczego (NTM) na podstawie analizy białek. Należy podkreślić, że tak szeroki zakres metod badawczych ukierunkowanych na diagnostykę zakażeń prątkami z rodzaju *Mycobacterium*, w odniesieniu do jednego tematu badawczego, zastosowano w kraju po raz pierwszy (11 metod badawczych). Pozwoliło to na ocenę skuteczności poszczególnych metod. Między innymi doktorant podkreśla, że skuteczniejszy jest posiew materiału na podłoże stałe. Takie wnioskowanie wynika z otrzymania dwunastu wyników fałszywie

dotatnich w przypadku podłoży płynnych. Bardzo cenne jest również potwierdzenie, że technika real-time PCR do wykrywania prątków z grupy MTBC w materiale tkankowym jest równie skuteczna jak metody hodowlane. Doktorant zaznacza, że stosując PCR nie uzyskano żadnego wyniku fałszywie dodatniego, co miało miejsce w przypadku badania hodowlanego. Możliwe jest znacznie szybsze uzyskanie wyniku niż w przypadku metod hodowlanych (skrócenie badań z 42 do 1 dnia), a także stosowanie PCR pozwoli na odstępianie od badań z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych.

Technika real-time PCR okazała się również bardzo szybka i efektywna w wykluczaniu lub potwierdzaniu przynależności wyizolowanego szczepu prątków atypowych do gatunków *M. avium ssp. avium* oraz *M. avium ssp. hominis* – najczęściej izolowanych gatunków NTM, w porównaniu do testu Hain Lifescience CM – techniki genotypowania. Doktorant dodatkowo jako alternatywę dla testu Hain do identyfikacji prątków atypowych rekomenduje zastosowanie spektrometrii mas – MALDI, która pozwala na uzyskanie wyniku nawet w przeciągu 3 godzin. Należy podkreślić, że w procedurze określania gatunków i podgatunków w odniesieniu do prątków NTM oraz MTBC zastosowano sekwencjonowanie całego genomu (WGS) NGS.

Niezwykle wysokie zaawansowanie metodyczne doktoranta pozwoliło na uzyskanie bardzo wiarygodnych i wartościowych wyników w odniesieniu do wybranych gatunków zwierząt wolno żyjących i towarzyszących. Moje szczególne zainteresowanie wzbudziło wykazanie, że bakterie z rodzaju *Mycobacterium* najczęściej izolowano od dzika euroazjatyckiego, a izolaty należały zarówno do MTBC jak i NTM. Prątkiem gruźliczym najczęściej izolowanym był *M. caprae*. Pociuszające jest, że nie stwierdzono przypadku przeniesienia patogenu z dzika na bydło domowe. Doktorant zwraca jednak słusznie uwagę, że zakażony dzik euroazjatycki ze względu na wysoki potencjał migracyjny stanowi duże zagrożenie zarówno dla zwierząt gospodarskich jak i człowieka.

M. caprae wyizolowano również od żubrów z Ośrodka Hodowli Żubrów w Smardzewicach. Natomiast od żubra z terenu Białowieskiego Parku Narodowego wyizolowano *M. avium ssp. hominis*. Ten sam drobnoustrój wyizolowano od antylopy sitatunga z ogrodu zoologicznego.

Bardzo istotne jest wyizolowanie *M. bovis* od alpak, należących do rodziny wielbłądowatych. Zwierzęta pochodziły z hodowli prywatnych. Doktorant przedstawia również kontekst tych izolacji, informując, że w Polsce pierwszy przypadek gruźlicy u alpaki

pochodzącej z prywatnej hodowli odnotowano w 2017 r. Była to konsekwencja importu zakażonych zwierząt z Anglii, gdzie gruźlica bydłęca jest chorobą szeroko rozpowszechnioną. Zakażenia alpak stanowią zagrożenie zarówno dla zwierząt gospodarskich utrzymywanych w tych samych gospodarstwach, jak również dla ludzi np. pacjentów z immunosupresją w trakcie terapii przeciwnowotworowej, podlegających jednocześnie alpakoterapii.

Od alpaki importowanej z Chile wyizolowano *M. avium ssp. avium.*, prątek wywołujący Mykobakteriozy u wielbłądowatych, o przebiegu klinicznym mogącym łączyć w sobie objawy gruźlicy oraz paratuberkulozy (zakażenie *M. avium ssp. paratuberculosis*). Od jednej z alpak wyizolowano *M. aurum*, co należy zaznaczyć w kontekście możliwości przeniesienia zakażenia na człowieka, objawiającego się zapaleniem rogówki, a także możliwością powstania guzków w płucach, szczególnie u pacjentów z immunosupresją w trakcie lub po przebyciu terapii przeciwnowotworowej.

Bardzo interesujące są prezentowane w pracy przypadki gruźlicy u konia i osła, przedstawiciele rodziny koniowatych uważanych za mało wrażliwe na zakażenie prątkami *M. bovis*.

Bardzo ciekawe obserwacje poczynił doktorant w odniesieniu do przypadku odstrzelonego jelenia szlachetnego, który nie wykazywał objawów choroby, a badanie anatomopatologiczne nie wykazało zmian w tkankach. Tak więc, zwierzę mogło być uznane za niepodejrzane o zakażenie bakteriami z rodzaju *Mycobacterium*. Tym niemniej w badaniu hodowlanym próbek płuc otrzymano obfity wzrost *Mycobacterium avium ssp. avium*. Ten sam prątek doktorant wyizolował od fretki domowej w przebiegu ostrej mykobakteriozy.

Niewyjaśniony z punktu widzenia możliwości przeniesienia zakażenia pozostaje opisany i dyskutowany przez doktoranta przypadek zakażenia *Mycobacterium avium ssp. hominissuis* gryzonia – gundii zwyczajnej. Gundie przebywały bowiem w ogrodzie zoologicznym, gdzie były odseparowane od innych gatunków zwierząt. W pracy prezentowany jest pogląd, że prawdopodobnie źródłem zakażenia było ptactwo, częsty wektor zakażenia *M. avium*.

Unikalny przypadek poddany analizie w pracy stanowi mykobakterioza u dwóch wilków, potwierdzona izolacją *M. avium ssp. hominissuis*. Wilki zostały odnalezione martwe w podobnej lokalizacji w powiecie bieszczadzkim. Sekcja nie wykazała zmian anatomopatologicznych charakterystycznych dla chorób wywołanych przez prątki. Doktorant przychyliła się do opinii innych autorów, że źródłem zakażenia była fauna wolno żyjąca –

częsty wektor przenoszenia prątków zarówno na zwierzęta udomowione jak i człowieka. Doktorant słusznie podsumowuje opis tego przypadku stwierdzeniem, że dowodzi on powszechnego występowania prątków w środowisku zarówno w organizmach roślinożerców jak i drapieżników.

Przedmiotem badań doktoranta były również wolno żyjące żółwie żółtobruche, czerwonolice, żółtolice o ostrogrzbiecie, od których wyizolowano *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. avium*. U żółwi odnotowano mykobakteriozę w postaci zmian skórnych oraz nieprawidłowości w strukturze karapaksu i plastronu.

Mykobakteriozę ptasią (gruźlicę ptasią), wywoływana przez *M. avium* oraz *M. avium ssp. hominissuis* stwierdzono u pawia zielonego, papużek nierozłazek, piżmówki malajskiej oraz bociana białego. Jedynie bocian biały nie wykazywał zmian chorobowych narządów wewnętrznych, a w badaniu hodowlanym, którego matrycą była tkanka wątrobowa wyizolowano jedynie pojedynczą kolonię bakteryjną *M. avium*. Stwierdzona gruźlica ptasia i bociana białego jest według dostępnej literatury przypadkiem unikalnym w skali światowej.

W przebiegu badań stwierdzono również mykobakteriozę rybią u sześciu osobników *danio rerio* linii Cacybp. Wśród dominowały ubytki w ścianie jamy brzusznej przed płetwą odbytową, z cechami owrzodzenia. Badanie hodowlane wykazało obfity wzrost *M. chelonae*.

Doktorant sformułował w sposób prawidłowy cztery wnioski, dwa odnoszące się do doskonalenia diagnostyki laboratoryjnej zakażeń prątkami, poprzez zastosowanie metody real-time PCR, sekwencjonowania NGS oraz MALDI-TOF. Metody te pozwalają usprawnienie wykrywania prątków oraz ich identyfikacji gatunkowej. Należy podkreślić, że zastosowanie metody real-time PCR umożliwia zastąpienie metody biologicznej w procedurze wykrywania prątków. Obszerne wyniki badań potwierdziły, że zwierzęta wolno żyjące i towarzyszące są rezerwuarem bakterii z rodzaju *Mycobacterium* w różnych regionach Polski. Doktorant wykazał również, że zakażenia zwierząt wolno żyjących, stało i zmiennoocieplnych, utrzymywanych przez człowieka w celach rekreacyjnych, powodowane są zarówno przez prątki typowe jak i częściej atypowe, z dominującą rolą *M. avium ssp. avium* i *M. avium ssp. hominissuis*.

Praca jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. O koniecznych niewielkich poprawkach poinformowałem autora. Mam małą uwagę odnoszącą się do Piśmiennictwa, w którym czasami zostały umieszczone artykuły z periodyków o niższej

wartości, podczas gdy określony temat został dokładnie opisany w innym artykule umieszczonym w periodyku z IF.

Podsumowując recenzję pracy doktorskiej mgr. inż. Łukasza Radulskiego jeszcze raz zwracam uwagę na trafne sformułowanie tematu pracy wykonanej w laboratorium referencyjnym, kształtującym i doskonalącym odpowiednie metody diagnostyczne. Praca jest podsumowaniem ważnego kierunku badań – wykrywania zakażeń bakteriami z rodzaju *Mycobacterium* u zwierząt wolno żyjących i towarzyszących. Doktorant zaprezentował ogromne doświadczenie w zakresie diagnostyki laboratoryjnej. Jest to bardzo dobry przewodnik nowoczesnej diagnostyki laboratoryjnej zakażeń prątkami. Wartość badań materiału od wielu gatunków zwierząt, mających na celu wykrywanie prątków i ich identyfikację, dodatkowo podwyższają odniesienia do obserwacji klinicznych oraz opisów zmian anatomopatologicznych. Taka praca mogła powstać w Polsce jedynie w laboratorium referencyjnym Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną doktoranta, a także Jego umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Tym samym odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm), a także zapisom szczegółowym z Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. Jednocześnie zgłaszam propozycję wyróżnienia powyższej rozprawy doktorskiej zgodnie z odpowiednim zapisem w Regulaminie wyróżniania rozpraw doktorskich przez dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.



Prof. dr hab. Krzysztof Anusz