

Zakład Chorób Zakaźnych Zwierząt i Administracji Weterynaryjnej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Łukasza Radulskiego

pt.: **„Wykrywanie zakażeń bakteriami rodzaju *Mycobacterium* u zwierząt wolnożyjących i towarzyszących prze użyciu nowoczesnych metod badawczych“**

wykonanej w Zakładzie Zakładzie Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Szulowskiego i dr wet. Marka Lipca - promotora pomocniczego.

Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 8 marca 2021 dotycząca wykonania recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Łukasza Radulskiego pt. „Wykrywanie zakażeń bakteriami rodzaju *Mycobacterium* u zwierząt wolnożyjących i towarzyszących prze użyciu nowoczesnych metod badawczych“.

Podjęty przez Doktoranta temat jest ważny, poznawczo bardzo istotny dla rozwoju nauk weterynaryjnych, a szczególnie diagnostyki i epidemiologii weterynaryjnej. Bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, od początku rozwoju nauk medycznych uważane są za jeden z najgroźniejszych drobnoustrojów dla ludzi i zwierząt, także dziś poświęca się jemu wiele miejsca w publikacjach naukowych oraz systemach monitorowania chorób zakaźnych u ludzi i zwierząt. Potwierdzeniem istoty zainteresowań naukowych prątkami *Mycobacterium* jest 32474 publikacji od 1935 roku dostępnych w bazie National Library of Medicine i ponad 11000 publikacji o różnorodnej tematyce poświęconej temu drobnoustrojowi w ostatnim dziesięcioleciu.

Tym samym przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi ważne i wielopłaszczyznowe spojrzenie na diagnostykę zakażeń powodowanych przez drobnoustroje z rodzaju *Mycobacterium* u zwierząt.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z 9 rozdziałów obejmujących: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz tabel, rycin i fotografii, Piśmiennictwo i Aneks Metodyczny.

Przed rozdziałem Wstęp umieszczony został wykaz skrótów użytych w rozprawie. Na całość pracy doktorskiej składa się:

- 109 stron tekstu w formie wydruku komputerowego,
- 37 tabel,
- 20 rycin,
- 15 fotografii,
- 112 pozycji piśmiennictwa i
- wykaz wraz z opisem metod diagnostycznych wykorzystanych podczas realizacji badań.

W rozdziale Wstęp składającym się z 5 podrozdziałów Doktorant przedstawił aktualną, obowiązującą klasyfikację prątków kwasoopornych i ich najistotniejszy z punktu epidemiologicznego podział na grupę prątków typowych (*Mycobacterium Tuberculosis Complex* – MTBC) i prątków niegruźliczych (*Nontuberculosis Mycobacteria* – NTM). Pierwszej grupie poświęca Doktorant pierwszą część wstępu począwszy od opisu cech budowy i wrażliwości na czynniki środowiska poprzez wrażliwość gatunkową i objawy kliniczne zakażenia, a kończąc na zwalczaniu gruźlicy w oparciu o obowiązujące przepisy prawa weterynaryjnego, podkreślając, że przepisy prawne nie regulują zwalczania gruźlicy u innych gatunków zwierząt po za bydłem domowym. Druga część wstępu to opis mykobakterioz powodowanych przez prątki atypowe, ważne z punktu diagnostyki różnicowej i nieswoistych odczynów alergicznych oraz ich potencjalne zagrożenie dla człowieka. Trzecia część wstępu - rozdział 1.5 jest wymienieniem metod diagnostycznych wykorzystywanych w Krajowym Laboratorium Referencyjnym Gruźlicy PIW-PIB w Puławach oraz diagnostyce gruźlicy możliwej do zastosowania przy użyciu dostępnych aktualnie technik diagnostycznych.

W rozdziale drugim Cel pracy Doktorant uzasadnia celowość podjęcia badań, formułując je w postaci 4 punktów, które pozwolą na ocenę częstości występowania zakażeń *Mycobacterium* u zwierząt dzikich i zwierząt domowych w Polsce oraz w oparciu o pozyskany materiał doskonalenie nowoczesnych technik diagnostycznych, które nie są objęte postępowaniem urzędowym.

Metodykę badań przedstawił Doktorant w rozdziale „Materiał i metody”, w którym opisał rodzaj i ilość próbek wykorzystanych do badań, których było łącznie 519, czego 493 to tkanki narządów, w których dominującym materiałem były próbki wątroby (36%) i płuc (21%) oraz szczepy środowiskowe *Mycobacterium* spp. Pozyskane szczepy Doktorant badał wykorzystując metody: hodowlane, mikroskopowe, techniki biologii molekularnej (real time PCR, multiplex PCR, test Hain Lifescience MTBC i CM, sekwencjonowanie DNA) oraz analizę białek MALDI-TOF MS. Wszystkie z wymienionych technik diagnostycznych/badawczych ocenił pod względem ich swoistości i czułości.

Wyniki przeprowadzonej analizy przygotowania próbek do badań, wykorzystanych metod diagnostycznych podsumował Doktorant w podpunkcie 4.8 - Podsumowanie wyników, w którym ocenił, że metody biologii molekularnej są tak samo skuteczne jak metody hodowlane będące podstawą diagnostyki w PIW-PIB w Puławach. Oceniane pięć

metod diagnostycznych było „skutecznych“ w 96,2 do 100%. Jednakże z punktu precyzności diagnozowania real time PCR, test Hain Lifescience oraz NGS (sekwencjonowanie nowej generacji) było w 100% potwierdzane z badaniem hodowlanym. Przeprowadzone badania pokazały, że spośród zwierząt podejrzanych (519) od których pobrano próbki do badań obecność prątków wykazano u 94 (18%) zwierząt z 18 gatunków, z czego 40 próbek (42,6%) były to prątki typowe (MTBC).

Z przeprowadzonych badań Doktorant wymienił 5 wniosków będących podsumowaniem realizowanych założeń pracy doktorskiej w kontekście epidemiologii zakażeń powodowanych przez prątki Mycobacterium - gatunek zakażony/rezerwuar i typ prętka który wykazano u chorego/padłego zwierzęcia i realne zagrożenie człowieka z tytułu kontaktu z chorymi/zakażonymi zwierzętami. Ponadto w oparciu o analizę wyników badań czułości i swoistości wskazał, iż aktualnie wykonywane badania mogą być uzupełnione lub zastąpione technikami biologii molekularnej: real time PCR, NGS i MALDI – TOF MS.

Rozdział Dyskusja poświęcony został przedstawieniu powszechności występowania prątków zarówno MTBC, jak i NTM w środowisku wodnym i lądowym oraz u różnych gatunków zwierząt zamieszkujących te ekosystemy oraz potwierdzoną możliwością przekraczania bariery gatunkowej przez prątki Mycobacterium (transmisja prątków izolowanych od dzików na człowieka, czy też zakażenie *M. avium* ssp. *avium* izolowanego od alpaki importowanej z Chile). W oparciu o wyniki badań własnych i przypadków zakażeń potwierdzonych w Zakładzie Mikrobiologii PIW-PIB w Puławach min. u fretki z nietypowymi objawami, gdzie w dochodzeniu epizootycznym nie potwierdzono kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym.

W ocenie Recenzenta przedstawione wyniki badań oraz opisy przypadków i postępowania diagnostycznego prowadzonego w Zakładzie Mikrobiologii, w którym Doktorant realizował pracę dokorską wskazują, że wybór jednej lub kilku ocenianych metod badawczych może z powodzeniem być wprowadzony do niestandardowego postępowania diagnostycznego przy podejrzeniu gruźlicy u zwierząt.

Rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Radulskiego napisana jest starannie, jasno i nie nasuwa trudności w zrozumieniu intencji przy planowaniu i realizowaniu poszczególnych zadań badawczych. Zamieszczone w pracy fotografie, ryciny oraz tabele uzupełniają zaprezentowane wyniki badań, a piśmiennictwo, liczące 112 pozycji jest aktualne, prawidłowo dobrane i szeroko wykorzystywane przez Doktoranta w dysertacji.

Z obowiązku Recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na dostrzeżone błędy, które powinny być uwzględnione przed oddaniem pracy do druku:

- str. 9 – w spisie treści bardziej adekwatnym byłoby określenie ... „ Wykaz użytych skrótych“ ... niż ... „zastosowanych skrótów i oznaczeń“ ..., bo słowo oznaczenia to symbol, znak), a tego nie ma wymienionych;
- str. 59 – ... „zamiast specyficznymi bardziej właściwym dla formy tekstu byłoby użycie zwrotu: swoistymi sondami. Z pewnością w języku potocznym używamy często ten zwrot np. podczas dyskusji;

- str. 70 – na końcu tabeli 24 powinno się umieścić podsumowanie każdej z kolumn. To już jest w tabeli 25 na str. 73 i ponownie brak jest w tabeli 28 na str. 79-80;
- str. 93 – tabela 36, kolumna druga, pozycja 5 jest sekwencjonowanie NGS, a powinno być NGS lub sekwencjonowanie nowej generacji lub Next Generation Sequencing;
- str. 94 – i na innych stronach jest wyraz infekcja, który jest bardzo często jest używany jako zamiennik słowa zakażenie. Jest to często praktykowane, ale polskim słowem jest zakażenie;
- Uwagę recenzenta wzbudził także tytuł, w którym jego zdaniem powinno się zastąpić zwrot metod badawczych zwrotem technik diagnostycznych lub metod diagnostycznych. Określenie badawczych odnosi się do szerokiego zakresu postępowań w zarówno badaniach naukowych lub/i postępowaniu diagnostycznym, a w tym przypadku mówimy o diagnostyce określonego drobnoustroju.

Wymienione błędy i uwagi nie rzutują na pozytywne ocenioną wartość merytoryczną pracy, która stanowi ważne z punktu epidemiologicznego opracowanie występowania prątków *Mycobacterium* u zwierząt dzikich oraz z punktu diagnostyki wykrywania zakażeń powodowanych przez te drobnoustroje.

Wniosek końcowy

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska mgr inż. Rafała Radulskiego pt.: „Wykrywanie zakażeń bakteriami rodzaju *Mycobacterium* u zwierząt wolnożyjących i towarzyszących prze użyciu nowoczesnych metod badawczych” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, a także zapisom w Rozporządzeniu MNiSW z dnia 22 września 2011 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora przedstawiam zatem Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Rafała Radulskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Wrocław, 26 sierpień 2021

.....
Prof. dr hab. Krzysztof Rypuła