

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr 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 oraz promotora pomocniczego dr hab. Krzysztofa Niemczuka w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynarii- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Praca powstała w ramach projektu NCN nr 2013/09/N/NZ7/02158. Napisana została w klasycznym układzie z wyraźnie wyodrębnionymi rozdziałami: Wstęp (11 stron); Cel pracy (1 strona), skrupulatnie opisany Materiał i Metody przedstawiono na 15 stronach; Wyniki ilustrowane licznymi tabelami, rycinami i zdjęciami na 33 stronach (wraz z Anekssem); Dyskusję przedstawiono na 11 stronach; sformułowano 5 Wniosków (1 strona); a 124 pozycje Piśmiennictwa, głównie angielskojęzycznego z ostatnich dwóch dekad, zajmują 11 stron tekstu. Praca posiada streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów.

We wstępie pracy, w oparciu o dane z literatury światowej opisano obszernie cechy *Mycoplasma bovis*, patogenezę zakażeń, epidemiologię, jej rolę jako jednej z głównych, pierwotnych lub wtórnych przyczyn syndromu oddechowego bydła (BRD) i innych jednostek chorobowych. Zwrócono uwagę na trudności izolacji mykoplazm w warunkach laboratoryjnych i uzasadniono, dlaczego wzrasta znaczenie technik biologii molekularnej. W końcowej części wstępu omówiono krótko antybiotyki wykorzystywane w leczeniu zakażeń *M.bovis* i zwrócono uwagę na trudności we wprowadzaniu skutecznej immunoprofilaktyki i formułowaniu szczepionek.

Celem pracy była analiza występowania zakażeń *M.bovis* w różnych rejonach Polski, w tym niezwykle cenna w sytuacji bardzo ograniczonej wiedzy nt. tej infekcji w Polsce krytyczna ocena różnych metod diagnostycznych. Postanowiono także dokonać charakterystyki szczepów izolowanych w Polsce. Wybór celu pracy uważam za bardzo uzasadniony ze względu na rosnącą rolę zakażeń mykoplazmowych w Polsce i znaczący niedostatek wiedzy o rozprzestrzenieniu się zakażenia u bydła w Polsce.

Materiał do badań zebrano ze stad bydła z różnych rejonów Polski, w pierwszym etapie oceniono reakcję serologiczną próbek surowicy krwi zebranych przez lekarzy wolnej praktyki

i Inspekcji Weterynaryjnej. Ciekawym pomysłem wykorzystanym w analizie materiału było podzielenie obszaru Polski na 6 makroregionów. W drugim etapie badań skupiono się na stadach, w których w pierwszy etapie stwierdzono pozytywną reakcję serologiczną wobec *M. bovis* oraz stada, w których występowały objawy kliniczne wskazujące na infekcję *M. bovis*. Pobrano próbki krwi (w których oznaczono obecność przeciwciał i antygeny *M. bovis*) oraz wymazy, głównie z nosa, ale także ze stawów i worka spojówkowego i poddano je badaniom molekularnym (PCR, PCR/DGGE, RAPD-PCR i sekwencjonownie) a także izolacji *M. bovis* na podłożach mikrobiologicznych. Liczebność reprezentujących stada próbek dopasowano do wielkości stada przy założeniu, że prewalencja *M. bovis* wynosi 30%, przy poziomie ufności 95%. W poszczególnych makroregionach zbadano od 5-22 stad.

W ocenie reakcji przeciwciał zastosowano skalę półilościową od 1+ do 5+. Dziwi, że nie sklasyfikowano tu wyników ujemnych, choć w praktyce ten sposób został wykorzystany w klasyfikacji punktowej (od 0-wynik ujemny do 5 - odpowiednika +++++), na co wskazują wyniki prezentowane np. na rycinach 25-30. Także w opisie procedury oznaczania przeciwciał anty *M. bovis* w surowicy przy użyciu testu ELISA wycięte chyba zostało zdanie opisujące dodatek koniugatu przeciwciał antyglobulinowych znakowanych enzymem, wykrywających przeciwciała bydłęce.

Opis kolejnych metod badawczych (hodowli i izolacji mykoplazm, a także badań molekularnych na DNA izolowanym z drobnoustrojów świadczy o dobrej orientacji w technikach wykorzystywanych podczas badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Trochę niejasny jest opis modyfikacji warunków reakcji PCR/DGGE, z jakiej korzystano – powstaje pytanie, kto wprowadził modyfikację metody opracowanej przez McAuliffe i wsp. w 2003 r.?

Wartościowym elementem rozprawy jest porównanie własnych izolatów z DNA innych, wzorcowych szczepów bakterii z klasy *Mollicutes*. Analizę filogenetyczną izolatów terenowych *M. bovis* przeprowadzono przy użyciu nowoczesnych metod informatycznych, stosownych do natury badań. Każdy uzyskany produkt PCR genu *uvrC* był poddany sekwencjonowaniu, a oznaczenia powtarzano dla zwiększenia pewności uzyskanych wyników, sekwencje porównywano z sekwencjami szczepów wzorcowych. Świadczy to o pracowitości i rzetelności Doktorantki. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu stosownych dobranych testów.

Wyniki pracy zostały udokumentowane dobrze dobranymi, wyczerpująco informatywnymi tabelami, zdjęciami i rycinami. Okazało się, że na 361 stad zbadanych serologicznie testem ELISA w 6 makroregionach Polski aż w 56% występowały zwierzęta wykazujące

przeciwciała anty-*M.bovis*. Zbadano 1035 zwierząt, z których 28,2% było serologicznie dodatnich. Najwyższy odsetek reagentów dodatnich stwierdzono w regionie południowo-zachodnim, a najniższy w północnym, różnice między nimi nieznacznie tylko przekraczały 20%, co wskazuje na dość podobną sytuację w różnych regionach naszego kraju. Co ciekawe, po wyselekcjonowaniu zwierząt ze stad serologicznie dodatnich lub wykazujących objawy kliniczne chorób mogących być skutkiem zakażenia *M.bovis* pozytywną reakcją serologiczną stwierdzono tylko w ok. 30% stad, ale tylko u niecałych 11% badanych zwierząt. W tych samych surowicach przy użyciu testu ELISA wykrywano także obecność antygeny *M.bovis*, który stwierdzono u 7,3% badanych zwierząt (w 17,8% badanych stad). U tych samych zwierząt wykonano posiewy bakteriologiczne wymazów z nosa i uzyskano dość podobny wynik, jak w wykrywaniu antygeny *M.bovis* w surowicy, czyli pozytywny wynik wystąpił w 15,1% badanych stad, co odpowiada 6,9% badanych zwierząt. W większości przypadków hodowli nie udało się jednak uzyskać czystej kultury *M.bovis*.

Wykorzystując technikę PCR swoisty dla *M.bovis* fragment genu *uvrC* stwierdzono w tych samych wymazach w 5,5% próbek, co odpowiadało potwierdzeniu infekcji w 12,3% stad.

Wykorzystując metodę PCR/DGGE stwierdzono obecność aż 8 gatunków mykoplazm (oprócz *M.bovis* (9,3%), także *M.bovirhinis*, *M.dispar*, *M.canis*, *M.canadense*, *M.bovoculi* *M.alkalescens*) i *Ureaplasma diversum* w tym samym materiale, a odsetek pozytywnych reakcji sięgał aż 79,1% wymazów. Co ciekawe, częściej, niż *M.bovis* izolowano materiał genetyczny *M.bovirhinis* (w 32,8% próbek) i *M.dispar* (14,2%). W znacznej części wymazów izolowano DNA więcej, niż jednego gatunku mykoplazm (od 2-4 gatunków w jednej próbce). Np. na 66 izolacji DNA *M.bovis* aż w 39 przypadkach w koinfekcji występowała *M.bovirhinis*, a nieco rzadziej *M.dispar* i *M.arginini* (14/66 i 13/66 izolatów).

W opisie efektów diagnostycznych z użyciem metody PCR/DGGE Doktorantka nie wykazała obecności *M.bovigenitalium*, *M. mycoides mycoides* (z czego należy się cieszyć) i *Acholeplasma laidlavii*. Wartościowa dla wyrobienia sobie zdania nt. rozprzestrzenienia różnych gatunków Mollicutes jest tabela 13., w której Autorka zestawiała przypadki izolacji w poszczególnych stadach bydła (w „rekordowym” aż 5 gatunków). Budzi jednak zdziwienie rozbieżność między wcześniej prezentowanymi wynikami, a tabelą 13, według której jednak nie izolowano *M.canadense* i *M.canis* (??).

Ryciny pokazujące różnice w rozdziale elektroforetycznym produktów PCR (PCR/DGGE) jasno różnicują poszczególne gatunki mykoplazm i wydaje się, że ta metoda daje spory komfort w identyfikacji. W trakcie posiewów bakteriologicznych Autorce udało

się uzyskać 20 szczepów *M.bovis* w czystej kulturze. Na podstawie analizy rozdziałów elektroforetycznych RAPD-PCR stworzono dendrogram pozwalający wydzielić 2 grupy szczepów i określić stopień podobieństwa filogenetycznego między własnymi izolatami, a szczepami wzorcowymi. Zidentyfikowano mutacje punktowe w zakresie genu *uvrC* w poszczególnych izolatach *M.bovis*. W przypadku 9 szczepów zmiany nukleotydowe spowodowały zmiany w sekwencji aminokwasów. Ciekawą częścią tej analizy było zaproponowanie na podstawie sekwencji nukleotydów fragmentu genu *uvrC* dendrogramu klasyfikującego polskie szczepy na tle izolatów z różnych regionów świata. Interesującym spostrzeżeniem jest fakt identyczności sekwencji nukleotydowej genu *uvrC* większości polskich izolatów *M.bovis* ze szczepem wzorcowym PG45. Jednocześnie wyniki wskazują na znaczne zróżnicowanie filogenetyczne polskich izolatów uzyskanych przy realizacji rozprawy doktorskiej. Autorka przyłącza się do poglądu, że powstawanie mutacji w obrębie tego genu jest jednym ze sposobów powstawania zmienności antygenowej służącej unikaniu rozpoznawania przez układ immunologiczny gospodarza. Ta część dyskusji, która porusza zagadnienie interakcji gospodarz-pasożyt jest bardzo ciekawie poprowadzona, z wykorzystaniem stosownych argumentów z literatury światowej. Dobrze to świadczy o wiedzy Autorki.

Przedstawiono także analizę objawów klinicznych towarzyszących wykrytym przypadkom zakażenia *M.bovis*. Pewne wątpliwości budzi rycina 22, która pokazuje zmiany przypominające bardziej chroniczne bursitis praecarpalis, a niekoniecznie arthritis.

Bardzo pracowitą częścią rozprawy było szukanie korelacji między wynikami wykrywania zakażenia *M.bovis* uzyskanymi przy pomocy różnych metod. Efektem tego badania było potwierdzenie istnienia korelacji między wszystkimi zastosowanymi metodami. Stwierdzono istnienie dość słabej korelacji między występowaniem objawów klinicznych mykoplazmozy, a wynikami użytych metod diagnostycznych.

W dyskusji nad wynikami Autorka słusznie zauważyła, że brakuje na świecie badań epidemiologicznych połączonych z charakterystyką molekularną *M.bovis*. Podała także krytycznej ocenie wcześniejsze wyniki badań serologicznych w Polsce, słusznie wskazując, że przyczyną „zawyżenia” odsetka seroreagentów dodatnich była zbyt łagodna interpretacja wyników przez producenta testu diagnostycznego. Wydaje się, że nadal nie można mieć całkowitej pewności, że obecne, surowsze kryteria są już tymi właściwymi. Mimo takich ograniczeń wyniki rozprawy wskazują, że najwyższy odsetek reagentów dodatnich występuje w regionach o najwyższej intensywności chowu bydła.

Wartościowym spostrzeżeniem wynikającym z pracy jest porównywalny odsetek wykrycia antygeny *M.bovis* w surowicach zwierząt i izolacji bakteriologicznych. Tu chciałbym zwrócić uwagę, że użycie pojęcia „zwierzę serododatnie” jest chyba niewłaściwe w kontekście wykrycia antygeny *M.bovis* w surowicy krwi (uważam, że mówienie o serologii powinno być ograniczone do wykrywania przeciwciał). Nieco zaskakuje fakt, że przy użyciu metody PCR odsetek wyników dodatnich był niższy, niż w metodach wyżej wymienionych. Dzięki rozdziałowi elektroforetycznemu produktów PCR (PCR/DGGE) udało się jednak znacząco, prawie dwukrotnie podwyższyć detekcję materiału genetycznego *M.bovis*. Autorka uważa, że przyczyna polega na wyższej czułości metody PCR/DGGE.

Ze względów poznawczych wysoko oceniam rozdział poświęcony występowaniu materiału genetycznego 9. gatunków z rodzaju *Mycoplasma* oraz *Ureaplasma diversum* w populacji bydła w Polsce. Biorąc pod uwagę fakt, że wiele gatunków jest komensalami błon śluzowych, można sądzić, że są one od wielu pokoleń obecne u bydła, skoro ich częstość izolacji przekracza $\frac{3}{4}$ populacji. Wyniki Autorki są zgodne z obserwacjami innych autorów europejskich stwierdzających najwyższą częstość izolacji *M.bovirhinis*. Moje wątpliwości budzi jednak określenie drugiego, co do częstości wykrywania gatunku – *M.dispar* – jako „bezwzględnie komensala warunkowo chorobotwórczego” chyba właściwsze byłoby określenie, że jest to komensal błon śluzowych, który w sprzyjających okolicznościach może ujawnić swój warunkowo-chorobotwórczy charakter. Identyfikacja gatunków które występują i które nie występują u bydła w Polsce jest dobrym początkiem do uzupełniania tej wiedzy, co może mieć znaczenie w tworzeniu programów profilaktyki.

Przeprowadzona analiza porównawcza różnych testów diagnostycznych, poparta rzetelną analizą statystyczną skłoniła Autorkę do ważnej konstatacji, że „diagnostyka laboratoryjna związana z wykrywaniem *M.bovis* powinna mieć charakter kompleksowy i obejmować zarówno badanie serologiczne, jak również badania molekularne PCR i/lub PCR/DGGE”. Zwróciła uwagę na „słabość” metody izolacji bakterii w warunkach terenowych, szczególnie, kiedy materiał jest silnie skontaminowany innymi drobnoustrojami.

Pięć wniosków sformułowanych przez Autorkę trafnie podsumowuje uzyskane wyniki. Nie zgłaszam uwag krytycznych co do ich liczby, jedynie wniosek nr 5 mógłby zostać skrócony do ostatniego zdania, ze względu na wysoką wartość dla wyboru metod diagnostycznych, które powinny być rekomendowane do użycia. Może szkoda rozpraszać uwagę czytelników na te elementy, które i tak były wcześniej omówione, a traktują o tym, czego lepiej nie robić.

Podsumowując, mogę powiedzieć, że Autorka wykonała ogromną pracę, na bogatym materiale biologicznym umiejętnie zebranych w różnych regionach Polski. Na materiale pochodzącym od tych samych zwierząt sprawdziła wartość diagnostyczną kilku metod stosowanych w diagnostyce mykoplazm, poparła wyniki odpowiednią analizą statystyczną. Wielkość materiału pozwala na wyciąganie wiążących wniosków, co ma duże znaczenie praktyczne.

Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego zaplanowania badań i rozwiązania problemów właściwie dobranymi metodami. Przedstawiła pracę o znaczącej wartości dla diagnostyki mykoplazmozy, postawiła trafne wnioski.

Przedstawiona praca spełnia więc wymogi stawiane rozprawom doktorskim, a określone w artykule 13. Ustawy nr 595 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 z dnia 14.04.2003, ze zmianami Dz.U. nr 64 z 2005 r.). W związku z powyższym składam wniosek do Wysokiej Rady Państwowego Instytutu Weterynarii Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Eweliny Szacawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. zw. dr hab. n. wet. Tadeusz Stefaniak

