

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Czoski pt. „Zakażenia bakteriami *Campylobacter jejuni* – badania oddziaływań bakterii, przeciwciał i układu odpornościowego”.

Oceniana rozprawa została przygotowana w Zakładzie Badawczo-Wdrożeniowym Ośrodka Salmonella IMMUNOLAB sp. z o.o. w Gdańsku, a promotorami są dr hab. Mariusz Grinholc, prof. UG, oraz dr Magda Rybicka-Misiejko z Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Podstawą do sporządzenia recenzji jest wniosek Przewodniczącego Rady Dyscypliny Biotechnologia z dnia 3. 11. 2025.

Campylobacter jejuni jest Gram-ujemną zakrzywioną lub spiralną bakterią występującą jako komensal w przewodzie pokarmowym wielu gatunków zwierząt – ptaków i ssaków. Występowanie *C. jejuni* u ptaków nie wiąże się raczej z występowaniem u nich objawów klinicznych czy zmian makroskopowych w obrębie jelita – jak dotąd nie opisano zespołu objawów u drobiu wynikających z kolonizacji lub zakażenia przez ten drobnoustrój. Natomiast omawiana bakteria jest ważnym czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych przewodu pokarmowego u ssaków, w tym człowieka i zwierząt towarzyszących (psów i kotów). Zakażenia te przebiegają pod postacią *gastroenteritis*, a głównymi objawami są wodnista lub krwawa biegunka, wymioty, bolesne skurcze jelit oraz gorączka. Opisany problem jest szczególnie istotny i częsty u ludzi. W wielu krajach, zwłaszcza Europy Zachodniej, oraz w USA, kampylobakterioza jest najczęściej stwierdzanym zakażeniem przewodu pokarmowego – szacuje się np., że każdego roku choruje ok. 1% Europejczyków, co generuje koszty rzędu 2 mld euro. Kampylobakteriozę należy więc traktować nie tylko jako ogromny problem zdrowotny czy epidemiologiczny, ale również ekonomiczny.

Drób, zwłaszcza brojlery kurze, uważa się za główny rezerwuar i źródło zakażeń *C. jejuni* u ludzi, gdyż ok. 80% przypadków kampylobakteriozy człowieka ma związek z przygotowaniem oraz konsumpcją mięsa drobiowego zanieczyszczonego podczas uboju lub obróbki poubojowej. Z tego powodu niezwykle istotne jest podejmowanie wszelkich działań

mających na celu z jednej strony ograniczanie częstotliwości nosicielstwa *C. jejuni* u ptaków, a z drugiej uniemożliwienie rozprzestrzeniania się bakterii w trakcie procesów technologicznych związanych z ubojem. Niestety, bakterie z rodzaju *Campylobacter* najczęściej przeżywają rutynowe czynności wykonywane podczas obróbki tuszek drobiowych, takie jak przesycenie chlorem wody służącej do mycia tuszek, opryski z kwasów organicznych, płukanie na gorąco czy chłodzenie zimnym powietrzem. Jako że na razie brak jest komercyjnych szczepionek przeznaczonych do stosowania u drobiu (choć trwają prace nad nimi), jedynym do tej pory sposobem ograniczenia nosicielstwa i siewstwa bakterii *Campylobacter* u drobiu jest ściśle przestrzeganie zasad bioasekuracji na fermie. Inne proponowane metody, takie jak tzw. wykluczenie konkurencyjne (*competitive exclusion*), tj. sztuczne zasiedlanie jelit drobiu przez bakterie blokujące patogenom dostęp do błony śluzowej, czy stosowanie bakteriofagów, są na razie na etapie doświadczeń lub nie dały w pełni zadawalających wyników. Obecnie wielu autorów uważa, że najlepszym rozwiązaniem problemu nosicielstwa *Campylobacter* będzie skojarzone zastosowanie różnych systemów profilaktycznych i środków przeciwdrobnoustrojowych.

Biorąc pod uwagę powyższe, podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących możliwości zastosowania przeciwciał IgY, swoistych wobec *C. jejuni*, w celu ograniczania nosicielstwa tej bakterii u drobiu uważam za niezwykle ważne, aktualne i celowe. Dodatkowo, potencjalne korzyści ekonomiczne i epidemiologiczne realizowanego projektu doskonale wpisują się w koncepcję „One Health”, zakładającą poprawę stanu zdrowia ludzi przez ograniczanie rezerwuarów zakażeń zoonotycznych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 65 stron tekstu, a jej układ jest zgodny z ogólnie przyjętymi normami redakcyjnymi. W tekście wyróżniono główne rozdziały: Wstęp, Cele pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz zawierające 120 pozycji Piśmiennictwo (zastosowane przez Autorkę określenie „Odwołania” jest zapewne niezbyt trafnym tłumaczeniem ang. słowa „references”). Tekst pracy uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykazy skrótów, rycin i tabel. Rozprawa została napisana w poprawnym stylu, w sposób jasny i zwięzły (choć zawiera pewne drobne błędy terminologiczne; niektóre z nich zostaną przedstawione poniżej). We Wstępie Autorka przedstawia ogólną charakterystykę gatunku *Campylobacter jejuni*, z uwzględnieniem jego aktualnej klasyfikacji, morfologii, właściwości hodowlanych, czynników zjadliwości oraz chorobotwórczości dla człowieka. Ponadto, we Wstępie Doktorantka analizuje możliwości użycia przeciwciał IgY w ograniczaniu nosicielstwa *C.*

jejuni u drobiu oraz metody pozyskiwania tych przeciwciał z żółtek jaj kurzych. Rozdział ten, napisany w sposób przejrzysty i komunikatywny, dowodzi bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę omawianych zagadnień z dziedziny mikrobiologii oraz immunologii i jest dobrym wprowadzeniem do dalszych części rozprawy doktorskiej. Przedstawiona we Wstępie hipoteza badawcza zakładająca użycie swoistych immunoglobulin IgY u drobiu jako elementu strategii ograniczania kampylobakteriozy człowieka znalazła swe odzwierciedlenie w sformułowanych przez Autorkę celach badawczych. Główne z nich to charakterystyka fenotypowa i genotypowa izolatów terenowych *C. jejuni*, opracowanie i optymalizacja metody izolacji przeciwciał IgY umożliwiające zastosowanie na skalę przemysłową, ocena wpływu tych immunoglobulin na przeżywalność bakterii *in vitro*, a także ocena odpowiedzi immunologicznej brojlerów kurzych immunizowanych inaktywowanymi komórkami *C. jejuni*. W opinii recenzenta, wątpliwości budzą sformułowania „głównym celem [przedstawionej pracy doktorskiej] było lepsze zrozumienie mechanizmów kolonizacji przewodu pokarmowego” czy „praca wnosi nową wiedzę o biologii zakażeń *C. jejuni*” (s. 16 i 17), gdyż próby sztucznego zasiedlenia jelit ptaków tym drobnoustrojem skończyły się niepowodzeniem, a wobec niewyjaśnienia przyczyn tego niepowodzenia, trudno jest o miarodajne wnioski. Ponadto, jeśli w przedstawionej pracy nie uwzględniono wyników równoczesnego podawania antygenów i IgY (które to wyniki stanowią tajemnicę firmy IMMUNOLAB), nie powinno to być podawane jako cel pracy – Recenzent nie jest w stanie ocenić, czy cel ten został zrealizowany.

Analizując rozdziały 4. (Materiały) oraz 5. (Metody) ocenianej dysertacji, należy stwierdzić, że badania przeprowadzone zostały przy użyciu nowoczesnych, właściwie dobranych metod badawczych. Warto podkreślić, że Doktorantka umiejętnie łączy klasyczne techniki mikrobiologiczne, testy serologiczne (aglutynacja probówkowa, ELISA), metodę analizy białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) oraz techniki biologii molekularnej. Ogółem, do badań zostało wstępnie zakwalifikowanych 5 izolatów *C. jejuni*, uzyskanych z 87 wymazów pobranych od kur w różnym wieku i pochodzących z różnych ferm. Identyfikacja tych izolatów została przeprowadzona za pomocą metod biochemicznych (zestaw API Campy), serologicznych (aglutynacja lateksowa: zestaw komercyjny Microgen Campylobacter) i molekularnych (wykrywanie określonych fragmentów DNA za pomocą techniki PCR). Z uwagi na fakt, że jeden z izolatów (CJ8) wykazywał pewne różnice w stosunku do szczepów referencyjnych *C. jejuni* oraz pozostałych izolatów terenowych, został on wyłączony z dalszych badań. Natomiast trzy z pozostałych izolatów tej bakterii zostały

następnie użyte do immunizacji kur w celu uzyskania przeciwciał IgY, do badania aktywności tych przeciwciał *in vitro* (hamowanie wzrostu bakterii) do immunizacji kurcząt oraz do testu challenge. Moje uwagi i pytania dotyczące tej części dysertacji są następujące:

1/ Pojęcie „próby środowiskowe” odnosi się do takich materiałów, jak gleba, woda, itp., a nie do materiałów klinicznych, a takimi były wymazy z kloaki.

2/ Jaka była rzeczywista liczba izolatów *C. jejuni* uzyskanych z tych wymazów? Autorka podaje, że było ich 5, chociaż ich oznaczenia (CJ5, CJ6, CJ8-10) sugerują, że co najmniej 10. Jeśli rzeczywiście udało się wyizolować tylko 5 szczepów tej bakterii z 87 wymazów, to albo świadczy to o niskiej ekstensywności kolonizacji drobiu (5,75%), albo o niskiej skuteczności procedury izolacji. Jest to istotne w kontekście niepowodzenia w próbie re-izolacji *C. jejuni* od kurcząt doświadczalnych w dalszych etapach badań.

Jaki jest odsetek kur (w różnych kategoriach wiekowych) będących nosicielami *C. jejuni* według danych literaturowych?

3/ Identyfikacja badanych szczepów. Chociaż identyfikacja metodami biochemicznymi może być skuteczna w większości przypadków (istotny jest zwłaszcza test hydrolizy hipuranu, który wypada dodatnio praktycznie tylko w przypadku *C. jejuni*), to jednak opisywane są zarówno hipuranoujemne szczepy *C. jejuni*, jak i hipuranododatnie szczepy *C. coli*. Z kolei samo stwierdzenie obecności pewnych genów (bez ich sekwencjonowania) też nie jest pewną metodą diagnostyczną – niektóre wykorzystane przez Autorkę startery PCR (np. dla genów 16S rRNA, *flaA* czy *cadF*) mogą dawać produkty PCR także z innymi gatunkami *Campylobacter*. Szkoda, że Doktorantka nie przeprowadziła sekwencjonowania któregoś z dających się amplifikować genów izolatu CJ8 – gdyby w ten sposób została potwierdzona jego identyfikacja jako *C. jejuni*, mógłby być on w przyszłości zastosowany jako naturalnie atenuowany szczep szczepionkowy. Oczywiście opisane tu pewne wątpliwości dotyczące identyfikacji izolatu CJ8 są praktycznie bez znaczenia z uwagi na wyłączenie go z dalszych etapów przeprowadzonych badań.

Omawiając identyfikację bakterii *Campylobacter* systemem identyfikacyjnym API CAMPY, należy zwrócić uwagę na błędne podanie przez Autorkę nazw niektórych testów wchodzących w jego skład. Według producenta, test oznaczony skrótem SUT to określanie zdolności asymilacji bursztynianu, a nie jak podała Doktorantka, fermentacji sacharozy (bakterie *Campylobacter* nie fermentują węglowodanów). Podobnie, test ERO to badanie wrażliwości na erytromycynę, a nie test na erytrytol, natomiast CFZ to test hamowania wzrostu przez cefazolinę.

4/ W opisie badania *in vivo* pewnych wyjaśnień wymagają następujące kwestie:

a/ jaką metodą badane były 3-dniowe pisklęta na obecność bakterii *Campylobacter*? Skoro wszystkie ptaki były ujemne, jak wytłumaczyć późniejszy wzrost stężenia swoistych przeciwciał u piskląt kontrolnych?

b/ jaki był stosowany koagulant oraz antykoagulant do przygotowywania próbek surowicy lub osocza? Nie jest to opisane w sekcji Materiały/Odczynniki.

c/ z jakich odcinków przewodu pokarmowego pobierano wymazy w 39. dniu (po eutanazji)?

d/ czy nie byłoby wskazane użycie dodatkowej grupy kontrolnej kurcząt, nie zakażanych w 24. dniu? Pozwoliłoby to na lepszą ocenę skuteczności odpowiedzi immunologicznej u ptaków immunizowanych.

e/ o jaką mieszaninę antygenów chodzi w punkcie 5.5.2? Skąd wiadomo, że izolaty CJ5 i CJ6 są zróżnicowane pod względem antygenowym? Czy Autorka miała na myśli zawiesinę komórek bakteryjnych? W jaki sposób drobnoustroje były inaktywowane?

f/ w punkcie 5.5.1 Doktorantka powołuje się na 3 pozycje literaturowe odnoszące się do badań eksperymentalnych z użyciem *C. jejuni*. Tymczasem żadna z tych publikacji nie uwzględnia tego drobnoustroju.

W kolejnej części dysertacji Doktorantka opisuje uzyskane przez siebie wyniki. Porównując różne metody izolacji przeciwciał IgY z żółtek jaj kur immunizowanych, Autorka wykazała, że najbardziej optymalną pod względem wydajności, a także uzyskanej czystości i aktywności przeciwciał jest technika precypitacji z chlorkiem sodu. Jednak, niezależnie od zastosowanej metody oczyszczania przeciwciał, część z nich było zawsze traconych w etapach pośrednich każdej zastosowanej procedury. Doktorantka wykazała również, że uzyskane przeciwciała IgY były zdolne do hamowania wzrostu *C. jejuni* na podłożu płynnym, przy czym największa skuteczność tego procesu miała miejsce przy dodaniu przeciwciał w dawce 0,5 mg/ml w momencie inokulacji podłoża.

Dodatkowo, w badaniach *in vivo*, określone zostały stężenia swoistych przeciwciał IgY w surowicy, stężenia cytokin w osoczu oraz stężenia przeciwciał klasy IgA w treści jelit kurcząt. Stwierdzono, że najsilniejsza odpowiedź immunologiczna (wyrażona jako stężenia IgY w surowicy, IgA w treści jelit oraz interleukin 1 β , 8 i 10 w osoczu) miała miejsce u ptaków w grupie D, immunizowanych pierwszą dawką antygeny doustnie, a drugą - domięśniowo. Zarówno sam opis wyników, jak i załączone ryciny i tabele są jasne i czytelne, a interpretacja na ogół poprawna. Jednak, w opinii recenzenta, kilka kwestii wymaga wyjaśnienia oraz szerszego omówienia. Szkoda, że w niewielkim tylko stopniu kwestie te zostały poruszone w Dyskusji, która wydaje się być raczej skróconym opisem uzyskanych wyników.

1/ Co to znaczy „pojedyncza dawka” przeciwciał (s. 31 oraz 46)?

2/ Na rycinie 13 (panel C), w 24. godzinie inkubacji jest wyraźnie mniejsza liczba komórek *C. jejuni* w grupie „24h” w stosunku do kontroli („KN”; różnica jest nawet statystycznie istotna). Przecież skoro przeciwciała były dodawane dopiero po 24 godz. inkubacji, w tym momencie obie grupy powinny mieć jednakową liczbę komórek? Jak to wyjaśnić?

3/ Jak wytłumaczyć wzrost stężeń przeciwciał IgY u kurcząt kontrolnych (grupa K AB i K CD) poczynawszy od 14. dnia życia (Ryc. 14)? Stężenia te są praktycznie takie same jak w grupie B, otrzymującej 2 dawki antygeny *C. jejuni*. Sam opis ryciny 14 budzi pewne zastrzeżenia, np. nie wynika z niej, że był wzrost stężenia przeciwciał w grupie B po pierwszym podaniu antygeny (jak podaje Doktorantka), ani też że grupy kontrolne wykazywały „jedynie śladowe poziomy IgY” (matczyne), które „następnie uległy stopniowemu obniżeniu”. Raczej u wszystkich grup kurcząt obserwowano stopniowy spadek przeciwciał matczyne, które utrzymywały się do mniej więcej 14. dnia.

4/ Również Rycina 15 zasługuje na szersze omówienie. Jak wytłumaczyć często wyższe stężenia przeciwciał IgA w grupie K AB (tj., kontrolnej) niż grupie B (immunizowanej dwiema dawkami antygenów *C. jejuni*)? W niektórych przypadkach oznaczone stężenia tej grupy kontrolnej dorównywały wartościom zmierzonym dla grupy D (absorbancja na poziomie 0,8).

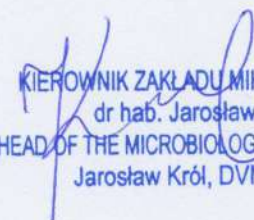
5/ Rycina 16 przedstawia oczywiście stężenia interleukiny w osoczu, a nie w treści jelit.

Oprócz powyższych uwag merytorycznych, z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na pewne błędy terminologiczne w ocenianej dysertacji, np. zastosowanie przez Autorkę określenia „wici” (w bakteriologii używamy pojęcia „rzęski” na określenie narządu ruchu bakterii), „czas generacji komórek” (lepsze byłoby określenie „czas między podziałami komórek” lub „czas podwojenia populacji”), „drobne przeżuwacze” (powinno być „małe przeżuwacze”), „faza spoczynku” hodowli (chyba chodzi o „fazę przygotowawczą/zastoju”), a także „aglutynacja płynna” i „posiew na murawę”.

W podsumowaniu rozprawy doktorskiej Autorka zawarła 5 wniosków. W opinii recenzenta, przeprowadzone (i opisane) badania uzasadniają tylko pierwsze cztery z nich. Ponieważ Doktorantka nie przeanalizowała w swej dysertacji działania przeciwciał IgY w badaniach *in vivo*, wniosek nr 5, wskazujący na potencjał wykorzystania tych przeciwciał w ograniczaniu kolonizacji jelit u kurcząt, należałoby pominąć.

Ocena końcowa

Powyższe uwagi nie umniejszają w sposób znaczący walorów poznawczych i aplikacyjnych pracy. Oceniana rozprawa doktorska została zaplanowana i zrealizowana w sposób skrupulatny i kompleksowy, a uzyskane wyniki mogą być bardzo obiecujące z punktu widzenia opracowania strategii ograniczania nosicielstwa *Campylobacter* u drobiu. Szczególnie wysoko oceniam tę część przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, które dotyczyły porównania metod izolacji przeciwciał IgY i oceny ich swoistości oraz efektywności w badaniach *in vitro*. Badania *in vivo*, mimo niepowodzenia izolacji *Campylobacter jejuni* od kurcząt eksperymentalnych zakażanych wcześniej tym drobnoustrojem, mogą natomiast stanowić wartościowy wstęp do przyszłych badań nad epidemiologią zakażeń *C. jejuni*, w tym nad opracowaniem optymalnego modelu doświadczalnego. Biorąc powyższe pod uwagę, **stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Pauliny Czoski pt. „Zakażenia bakteriami *Campylobacter jejuni* – badania oddziaływań bakterii, przeciwciał i układu odpornościowego” odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 poz. 574 z późn. zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**


KIEROWNIK ZAKŁADU MIKROBIOLOGII
dr hab. Jarosław Król
HEAD OF THE MICROBIOLOGY DEPARTMENT
Jarosław Król, DVM, PhD