

Prof. dr hab. Krzysztof Kwiatek

Puławy, dnia 01.02.2017 r.

Państwowy Instytut Weterynaryjny -

Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Korpysa-Dzirba

pt. „Molekularna charakterystyka enterotoksycznych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka surowego”

wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Jacka Oska (promotor) w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - PIB w Puławach. Badania wykonano w ramach projektu badawczego NCN – DEC-2011/01/N/NZ7/04310.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej z dnia 30.11.2016 roku (BRN-410/11/16, zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej PIWet-PIB w Puławach z dnia 20.04.2011 r.).

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest oprawionym wydrukiem komputerowym formatu A4 liczącym 97 ponumerowanych stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich i składa się z 6 rozdziałów głównych i 7. rozdziału ze spisem piśmiennictwa, obejmującego 211 pozycji literaturowych, krajowych i zagranicznych. W tej liczbie zawarto 2 pozycje współautorskie, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Podkreślić należy bogaty materiał dokumentacyjny wyników badań, na który składają się tabele w liczbie 17 oraz 33 ryciny zamieszczone w tekście odpowiednich rozdziałów. Ponadto, wartościowy jest zamieszczony na wstępie dysertacji wykaz używanych skrótów stosowanych w pracy. W recenzowanej pracy zamieszczono także streszczenie w j. polskim i angielskim.

Ocena merytoryczna rozprawy

Drobnoustroje z gatunku *Staphylococcus* są częstym i bardzo trudnym do zwalczania czynnikiem etiologicznym mastitis czyli zapalenia gruczołu mlekowego u krów. Z uwagi na

sposób szerzenia się w stadzie zaliczane są do drobnoustrojów zakaźnych. Zapalenia wymion spowodowane przez *S. aureus* są z reguły przewlekłe i przebiegają bez objawów klinicznych. Natomiast patogenność gronkowca złocistego jest skutkiem ekspresji szeregu czynników wirulencji, które prowadzą do adhezji, ucieczki przed systemem obronnym oraz rozprzestrzeniania się w organizmie gospodarza. Prawie wszystkie szczepy wytwarzają enzymy i cytotoksyny, takie jak: hemolizyna, nukleaza, proteaza, lipaza, hialuronidaza oraz kolagenaza. Wykazano, że część szczepów wytwarza także jedną lub więcej dodatkowych egzoprotein, do których należą enterotoksyny, toksyna wstrząsu toksycznego (TSST-1), eksofoliatyny i leukocydyny. Enterotoksyny i TSST-1 należą do pirogennych egzotoksyn i mają właściwości superantygenów.

Badania wykonane w Polsce przez Kuźmę i wsp. (Med. Wet. 2005, 61, 3) wykazały, że 22,1% szczepów gronkowców wyizolowanych z wydzieliny zapalnej wymienia krów cechowało się zdolnością wytwarzania jednej lub dwóch enterotoksyn. Wcześniejsze badania tego samego Autora wykazały, że szczepy izolowane z przypadków mastitis cechowały się też posiadaniem szeregu genów odpowiedzialnych za produkcję enterotoksyn.

Wyniki nowszych badań nad wytwarzaniem enterotoksyn przez „mastitogenne” gronkowce wskazują na ich zmienność i zróżnicowanie. Rodzi to potrzebę dalszych pogłębionych badań naukowych z zastosowaniem nowoczesnych technik biologii molekularnej. Zagadnienie to staje się coraz bardziej istotne w warunkach intensyfikacji produkcji mlecznej krów i rosnącym problemem subklinicznych postaci mastitis co skutkuje częstą obecnością tego zarazka w mleku surowym.

W tym kontekście podjęte przez Doktorantkę badania w zakresie charakterystyki szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka surowego, należy uznać za trafne i celowe, gdyż mają one na celu doskonalenie i zastosowanie metod biologii molekularnej do wykrywania i charakterystyki różnicowej chorobotwórczych szczepów gronkowców ważnych z punktu widzenia zapewnienia bezpieczeństwa produktów mlecznych. Można też wskazać, że mają one nie tylko charakter poznawczy, ale także posiadają pewien aspekt użyteczny co stanowi wyjście naprzeciw potrzebom lekarzy weterynarii klinicystów, higienistów żywnościowych i epidemiologów.

W ramach podjętego tematu Doktorantka postawiła sobie 4 cele badawcze, a mianowicie:

- opracowanie testów mPCR do identyfikacji *S. aureus*, gronkowców koagulazododatnich (CPS) oraz wykrywania genów klasycznych enterotoksyn gronkowcowych;

- określenie przy pomocy opracowanych testów mPCR częstości występowania szczepów *S. aureus* i CPS w mleku krowim oraz dokonanie identyfikacji szczepów enterotoksycznych;

- określenie możliwości wytwarzania in vitro enterotoksyn gronkowcowych przez enterotoksyczne szczepy *S. aureus*;

- dokonanie molekularnej charakterystyki enterotoksycznych *S. aureus* przy użyciu wybranych metod genotypowania. Cel ten pod względem brzmienia jest najbardziej zbieżny z tytułem rozprawy.

Podane powyżej cele pracy obejmują wiele aspektów badawczych w zakresie fenotypowej i genotypowej charakterystyki różnicowej gronkowców wyizolowanych z surowego mleka.

Założone cele Doktorantka realizowała etapowo, począwszy od wyizolowania szczepów, a następnie ich identyfikacji przy użyciu techniki PCR z zastosowaniem opracowanych testów mPCR1 i mPCR2. W kolejnej fazie badań oznaczano inne markery patogenności tj. geny *mecA*, *mecC*, *pvl* i *spa* przy zastosowaniu testów mPCR3 oraz geny *femA*, *eta*, *etb*, *tst* i *mecA* za pomocą testu mPCR4. Ponadto w ramach tej fazy badań dokonano sprawdzenia ekspresji genów enterotoksyczności *sea*, *seb*, *sec*, *sed* i *see* szczepów *Staphylococcus aureus* przy wykorzystaniu techniki immunoenzymatycznej z odczytem immunofluorescencyjnym (ELFA). Ostatnim i najważniejszym celem pracy była molekularna charakterystyka różnicowa enterotoksycznych szczepów *S. aureus* przy zastosowaniu nowoczesnych metod molekularnych tj. PCR-RFLP, PFGE i MLST.

Na część opisową recenzowanej pracy składają się rozdziały takie jak: wstęp, wspomniany powyżej cel pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo.

W obszernym wstępie dysertacji Doktorantka w sposób syntetyczny wprowadza w przedmiotowe zagadnienie obejmujące charakterystykę drobnoustrojów rodzaju *Staphylococcus* w zakresie cech fenotypowych, występowania, chorobotwórczości i gronkowcowych zatruc pokarmowych. W szczególności dokonano pełnego i krytycznego przeglądu stanu wiedzy i badań w zakresie odmian enterotoksyn gronkowcowych, regulacji ekspresji i warunków ich wytwarzania. Zajęto się też przeglądem stanu wiedzy w zakresie szczepów MSRA pod kątem występowania u nich czynnika wirulencji czy wytwarzania enterotoksyn. W dalszej części wstępu wykonano przegląd danych i badań w zakresie metod identyfikacji i typowania gronkowców koagulazo-dodatnich z podziałem na metody fenotypowe i genotypowe. W opisie metod hodowlanych (określanych w pracy jako

fenotypowe, mikrobiologiczne) ograniczono się do podania tradycyjnych technik mikrobiologicznych zawartych w normach serii PN EN ISO 6888.

W kolejnym podrozdziale Autorka opisała metody wykorzystywane w genotypowaniu drobnoustrojów. Wskazała, że zgodnie z danymi piśmiennictwa najczęściej stosowanym w genotypowaniu tzw. złotym standardem jest analiza makrorestrykcyjna – PFGE. Ponadto wskazała na użyteczność analizy restrykcyjnej PCR-RFLP oraz sekwencjonowania genów lub całych genomów bakteryjnych przy zastosowaniu metod tj. MLST i NGS.

W rozdziale materiał i metody podano, że przedmiotem badań było 396 koagulazododatnich i 53 koagulazo-ujemnych szczepów gronkowców, które wyizolowano z 1081 próbek mleka surowego, pobieranych w latach 2009-2011 na terenie dwóch województw. Opisano metody izolacji i identyfikacji szczepów gronkowców koagulazododatnich. Nie podano natomiast precyzyjnej procedury uzyskiwania i określania szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych. W dalszej części rozdziału materiał i metody Doktorantka opisała wszystkie metody, tak hodowlane, jak i molekularne oparte na technice PCR, wykorzystujące opracowane testy mPCR do identyfikacji gronkowców koagulazododatnich i gatunku *S. aureus* (mPCR1, mPCR2) oraz do oznaczania innych określonych markerów patogenności enterotoksycznych szczepów *S. aureus* (mPCR3 i mPCR4).

Powyższa część badań została powiązana z kolejnym zadaniem jakim była molekularna charakterystyka różnicowa enterotoksycznych szczepów *S. aureus* przy zastosowaniu testu PCR-RFLP, analizy PFGE i genotypowania techniką MLST.

Podkreślam precyzyjne i jasne przedstawienie wszystkich metod badawczych, które zostały dobrze przemyślane, wykonane prawidłowo w zakresie wystarczającym do osiągnięcia celów badawczych. W odniesieniu do enterotoksycznych *S. aureus* dokonywano pogłębionej analizy polegającej na sprawdzeniu ekspresji genów odpowiedzialnych za wytwarzanie enterotoksyn A-E. Dla zapewnienia wiarygodności wyników przeprowadzonych badań opracowane metody zostały poddane optymalizacji i walidacji.

W rozdziale wyniki liczącym 25 stron maszynopisu i podzielonym na podrozdziały, dokonano obszernego przedstawienia w formie opisowej i graficznej (4 tabele i 31 rycin) otrzymanych wyników badań w zakresie cech fenotypowych i genotypowych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka. Uzyskane wyniki badań testami mPCR odpowiednio zestawiono, zobrazowano i szczegółowo przeanalizowano pod względem parametrów tj. specyficzność i czułość, co pozwala uznać prezentowane cechy i wartości za wiarygodne. Na podkreślenie zasługuje czytelne i staranne opracowanie wyników wykonanych badań oraz ich logiczna interpretacja. Podobnie dotyczy to wyników badań przedmiotowych

szczepów gronkowców przy użyciu metod tj. PCR-RFLP, PFGE i MLST. Właściwie zaplanowane, dobrze wykonane oraz udokumentowane wyniki przeprowadzonych badań przemawiają za dużym doświadczeniem, systematycznością i dobrym opanowaniem warsztatu laboratoryjnego przez Doktorantkę.

W rozdziale Dyskusja (na 14 stronach) Autorka dokonała analizy uzyskanych wyników i odniosła je do badań innych autorów przedstawionych w dobrze dobranym piśmiennictwie. W umiejętny sposób przeprowadziła interpretację otrzymanych wyników, którą uzupełnia własnymi komentarzami co nabiera wartości ze względu na zróżnicowanie szczepów gronkowców. Zaprezentowana dyskusja dowodzi szerokiej znajomości przedmiotowego zagadnienia i piśmiennictwa. Dyskusję uzyskanych wyników uważam za wartościową i wnoszącą szereg istotnych nowych danych naukowych. Szczególnie interesująca jest dyskusja dotycząca sekwencjonowania techniką MLST fragmentów genów metabolizmu podstawowego i ustalanie typu sekwencyjnego. Dyskusja jest wyczerpująca, na dobrym poziomie co świadczy o dużej znajomości tematu, możliwości krytycznej oceny, umiejętności argumentowania i prawidłowego posługiwania się cytacjami.

Rozprawa doktorska jest zakończona pięcioma wnioskami, które są rezultatem badań wykonanych w trakcie jej realizacji, które świadczą o głębokim wejściu w problem naukowy i osiągnięciu założonych celów badawczych.

Z obowiązku Recenzenta chciałbym wskazać na drobne błędy, pomyłki, nieścisłości, niedoskonałości czy uchybienia, które mają charakter dyskusyjny i ewentualnie powinny być poprawione przed oddaniem publikacji do druku, a mianowicie:

- wydaje się, że wnioski 2-5 wymagają zmiany redakcyjnej tak, aby miały charakter bardziej uogólniony, a nie stanowiły stwierdzeń dotyczących konkretnych wyników pracy;
- wydaje się, że celowym byłoby wysunięcie wniosku na temat oceny przydatności opracowanych i zwalidowanych testów mPCR;
- podobnie można podejść do kwestii oceny technik molekularnych zastosowanych do typowania szczepów gronkowców;
- uporządkowania wymaga kwestia stosowania terminów: „izolat” i „szczep”. W tytule pracy zawarty jest termin „szczepy”, natomiast w całej pracy, niezależnie od etapu badań, stosowane są naprzemiennie oba terminy;
- dyskusyjna jest poprawność użytego określenia metody fenotypowe (str. 27). W mojej opinii bardziej zalecana nazwa to metody hodowlane;

- w cytacjach i dyskusji odczuwam brak wzmianki o pracach zespołu prof. E. Malinowskiego, które dotyczą mastitis na tle gronkowcowym;
- na str. 25, wiersz 11 - sformułowanie: "systemu *agr*" proponuję uzupełnienie o słowo „od” ("od systemu *agr*");
- str 27, wiersz 8 - wyrażenie: "często obecność" proponuję zastąpić słowami "częstą obecność";
- str.32, p. 3.3 - wiersz 1 - sformułowanie: "uzyskany wzrost bakterii przenoszono..." proponuję doprecyzować;
- wymaga uściślenia posługiwanie się terminem „gen *23S rRNA*” i „fragment genu *23S rRNA*” (str. 33, 47, 68). Wydaje się, że np. stwierdzenie "...posiadały geny *23S rRNA*" (str. 68, wiersz 3) jest zbyt dużym uogólnieniem, gdyż podjednostka *23S rRNA* nie jest specyficzna dla *S. aureus*. Tę konserwatywną podjednostkę posiadają wszystkie organizmy bakteryjne, a dla *S. aureus* specyficzny jest tylko fragment tego genu.
- na str. 42, wiersz 8 - w rozdziale "Materiał i metody" stwierdzono, że tolerancja pozycji prążka wynosiła 2%, podczas gdy w rozdziale wyniki wskazano na 1% tolerancję (str. 60);
- dlaczego parametry elektroforezy dla rozdziału produktów uzyskanymi metodami mPCR 1, 2, 3 różnią się od mPCR 4. Jakie są powody przyjęcia innych wartości ?.

Przytoczone powyżej uwagi krytyczne, o zróżnicowanym charakterze, w większości porządkowym, wyjaśniającym lub polemicznym, nie mają większego znaczenia, i nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy, a także nie mają wpływu na jej pozytywną ocenę.

Całościowa ocena wartości naukowej i wnioski końcowe recenzji

Dokonując całościowej oceny zakresu i charakteru przeprowadzonych badań, merytorycznej interpretacji uzyskanych wyników oraz końcowych wniosków uważam, że stanowią one powiązaną i logiczną całość. Praca ma przede wszystkim charakter naukowo-badawczy, ale są też pewne potencjalne elementy aplikacyjne, stąd też pozytywnie oceniam sposób zaplanowania i przygotowania pracy.

Na podkreślenie zasługuje bardzo szczegółowa analiza porównawcza wyizolowanych szczepów gronkowców i interpretacja uzyskanych wyników. Pozwala to na stwierdzenie, że oceniana rozprawa stanowi wkład do rozwoju badań w zakresie charakterystyki genotypowej, typowania i epidemiologii zakażeń gronkowcowych.

Na podkreślenie zasługuje czytelne i staranne opracowanie oraz poprawne zinterpretowanie wyników badań. Prawidłowo zaplanowane i dobrze wykonane oraz udokumentowane wyniki przeprowadzonych badań przemawiają za sporym doświadczeniem, systematycznością i dobrym opanowaniem warsztatu badawczego przez Doktorantkę.

W szeroko zakrojonych, dobrze zaplanowanych i konsekwentnie realizowanych badaniach, przy użyciu odpowiednich metod laboratoryjnych, Doktorantka uzyskała bardzo interesujące i wartościowe wyniki o znaczeniu zarówno poznawczym, jak i w pewnym wymiarze aplikacyjnym.

Do ważnych osiągnięć Doktorantki zaliczam:

- opracowanie testów mPCR do identyfikacji enterotoksycznych *S. aureus*;
- wykazanie, że wśród gronkowców koagulazo-dodatnich (CPS) tylko 12,9% ma charakter enterotoksyczny;
- stwierdzenie, że najwięcej z wyizolowanych szczepów gronkowców posiadało gen „*sec*” kodujący wytwarzanie enterotoksyny C;
- wykazanie, w badaniach genotypowych przy zastosowaniu metody PFGE licznych szczepów *S. aureus*, wysokiego stopnia ich zróżnicowania, który wyrażał się stwierdzeniem 16 grup klonalnych;
- wykazanie, że żaden z badanych szczepów koagulazo-ujemnych *S. aureus* nie posiadał genu kodującego klasyczne enterotoksyny gronkowcowe;
- zastosowanie w przeprowadzonych badaniach molekularnych reakcji mPCR z użyciem wielu starterów specyficznych dla sekwencji genomu *S. aureus*;
- równoczesne zastosowanie trzech różnych technik molekularnych tj. PCR-RFLP, PFGE oraz MILST do różnicowej charakterystyki genotypowej licznych szczepów wyizolowanych z mleka szczepów *S. aureus*.

Biorąc powyższą treść recenzji mogę stwierdzić, że Autorka rozprawy doktorskiej posiada ugruntowane doświadczenie badawcze i szeroki zakres wiedzy w zakresie dziedziny objętej pracą. Uzyskane wyniki badań odpowiadają założonym celom pracy. Stąd mogę stwierdzić, że nie mam zasadniczych i zarazem krytycznych uwag dotyczących recenzowanej dysertacji.

We wniosku końcowym stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska pod tytułem „Molekularna charakterystyka enterotoksycznych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka surowego”, w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach

i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2014 r. poz. 1852 ze zm. w Dz.U. z 2015 r. poz. 249) i dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej PIWet-PIB w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Weroniki Korpysa-Dzirba do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Krzysztof Kwiatek