

Olsztyn, 21 stycznia 2017

Prof. dr hab. Joanna Sztejn prof.zw.
Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego
w Olsztynie

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Weroniki Korpysa-Dzirba pt.: „Molekularna charakterystyka enterotoksycznych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka surowego” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Oskę w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIW-PIB w Puławach

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjęta w dniu 20.04.2011r oraz skierowane do mnie pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej prof. dr hab. Dariusza Bednarka.

Temat pracy uważam za ważny i aktualny dla szacowania ryzyka zagrożenia spowodowanego przez żywność zawierającą enterotoksyczne szczepy *Staphylococcus aureus*. Nasilające się tendencje żywieniowe spożywania żywności jak najmniej przetworzonej, a równocześnie obecność w mleku gronkowców stwarza realne zagrożenie dla konsumentów. *S.aureus* posiada bardzo bogaty zestaw czynników wirulencji, zarówno będących integralną częścią struktury komórkowej, jak czynników wydzielanych do środowiska, które ułatwiają przystosowanie do zmieniających się warunków. Dokonanie zatem charakterystyki molekularnej szczepów pochodzących z żywności, a w szczególności z mleka surowego jest uzasadnione i nowatorskie.

Rozprawa doktorska obejmuje 97 stron wydruku komputerowego i poprzedzona jest spisem treści, streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim, a oprócz tego Doktorantka zamieściła obszerny wykaz skrótów

stosowanych w tekście. Kolejne rozdziały mają układ typowy dla tego typu opracowań.

Wstęp pracy bardzo starannie przygotowany, stanowi przegląd najnowszego piśmiennictwa (211 pozycji). Autorka przedstawiła w nim zarówno zagadnienia podstawowe dotyczące morfologii i występowania gronkowców, ich klasyfikacji, jak i szczegółowe związane z wytwarzaniem enterotoksyn i ich charakterystyki. Omówiła dane dotyczące występowania gronkowcowych zatruc pokarmowych w Polsce i krajach Unii Europejskiej. Rozdział kończą informacje na temat identyfikacji i typowania gronkowców koagulazo-dodatnich z użyciem metod pozwalających na określenie cech fenotypowych i genotypowych.

Doktorantka dla realizacji zadania, jakim jest charakterystyka molekularna szczepów gronkowców podzieliła pracę na 4 etapy, wyznaczając równocześnie 4 cele. Pierwszym z nich było opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji i wykrywania szczepów koagulazo-dodatnich (CPS) i genów pięciu klasycznych enterotoksyn gronkowcowych. Walidacja testów pozwoliła na ocenę częstości występowania szczepów *S. aureus* i CPS w próbkach mleka surowego z dwóch województw podlaskiego i lubelskiego. Pozyskanie tak bogatego materiału, łącznie 396 kolonii CPS, zbieranego przez okres trzech kolejnych lat (2009-2011), dało możliwość prześledzenia różnorodności występowania genów, fragmentów insercyjnych i restrykcyjnych pozwalając na charakterystykę molekularną gronkowców.

W rozdziale: „Materiał i metody” Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy opisuje plan i procedury badawcze, łatwo zatem dokładnie prześledzić przebieg doświadczeń. Autorka wykorzystuje w pracy wiele technik badawczych rozpoczynając od metod hodowlanych - izolacji i identyfikacji gronkowców na podłożach mikrobiologicznych, poprzez separację materiału genetycznego, identyfikację enterotoksycznych i metycylinoopornych szczepów *S. aureus* oraz genów enterotoksyczności i genów metabolizmu podstawowego techniką PCR, analizę polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych PCR-RFLP, a skończywszy na metodzie sekwencjonowania materiału genetycznego (MLST) szczepów *S. aureus*. Umiejętne wykorzystanie tak licznych technik badawczych świadczy o solidnym przygotowaniu

teoretycznym pani mgr Weroniki Korpysa-Dzirba a także o dużych zdolnościach planowania i organizacji badań.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione bardzo szczegółowo na 24 rycinach i czterech tabelach umiejętnie rozmieszczonych w tekście rozdziału. Doktorantka potwierdziła obecność koagulazo-dodatnich gronkowców w mleku surowym. Odsetek wyizolowanych z mleka szczepów gronkowców enterotoksycznych wyniósł 12,9% i wszystkie, na podstawie obecności genów *23S rRNA*, *spa*, *femA*, zakwalifikowane zostały do gatunku *S. aureus*. Najliczniejszą grupę stanowiły szczepy posiadające gen *sec*, kodujący enterotoksynę C, nie wykazała natomiast obecności izolatów posiadających gen kodowania enterotoksyny E. U nielicznych (6) spośród 51 szczepów wykryto geny chorobotwórczości *pvl*, *eta*, *etb*, *tst* i oporności na metycylinę. Wykorzystanie elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym dało obraz znacznego zróżnicowania na 16 grup klonalnych. Najliczniejsza (1) zawierała 14 izolatów, a kolejna co do liczebności - 10 izolatów. W grupie pierwszej jeden szczep miał gen enterotoksyny innej niż SEC i jeden nie wytwarzał enterotoksyny, a w grupie drugiej większość posiadała gen *SEA*. Liczebność pozostałych grup klonalnych wynosiła od 1 do 4 szczepów. Zależności pomiędzy sekwencjami jest uznana za bardzo dokładny wyznacznik stopnia pokrewieństwa. W przypadku patogenu, jakim jest *S.aureus* koniecznym jest prowadzenie analizy filogenetycznej pozwalającej na wykrycie m.in. horyzontalnego transferu genów, który w znacznym stopniu jest przyczyną zmienności szczepów.

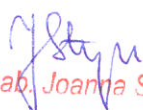
W dyskusji, podobnie jak we wstępie rozprawy, Doktorantka wykazała się dobrą znajomością aktualnego piśmiennictwa oraz umiejętnością porównania wyników własnych badań z pracami innych autorów. Szeroko omówiła zagadnienie występowania gronkowców w mleku surowym i produktach z mleka surowego. Porównując opracowane w pracy dwa testy mPCR, Doktorantka wykazała, że ich czułość jest zdecydowanie wyższa niż opisanych w literaturze. Wykorzystując trzy techniki molekularne w badaniach genotypów potwierdziła, podobnie jak inni autorzy małą przydatność techniki PCR-RFLP.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka wyciągnęła pięć w pełni uzasadnionych wniosków.

Ponieważ zadaniem i obowiązkiem recenzenta jest też szukanie słabych punktów, pomimo ogólnej pozytywnej oceny nasuwają się nieliczne uwagi. Pierwsza uwaga dotyczy braku wniosku odnoszącego się do pierwszego celu pracy. Kolejna zaś, drugiego wniosku, w którym zawarto określenie: „ enterotoksyczne szczepy *S.aureus*, występowały na zbliżonym poziomie w województwie lubelskim i podlaskim”. Czy jest to zasadne w przypadku, kiedy w roku 2009 nie pobierano i nie wykonywano badań próbek mleka krowiego z województwa podlaskiego? Na str. 25 wiersz 6 od góry cytuję „ w fazach postekspotencjalnej ..” uważam za nieodpowiednie. Nieliczne błędy literowe i punktacji, te drugie w części Materiał i metody zaznaczyłam na marginesie pracy. Wspomniane niedociągnięcia mają najczęściej charakter dyskusyjny lub dotyczą niezręcznych sformułowań i drobnych błędów literowych,. Nie obniżają one wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko

Podsumowując, temat pracy jest poprawnie sformułowany i dotyczy zagadnień mających ścisły związek z bezpieczeństwem żywności. Praca jest dobrze zaplanowana, a liczne zadania w pełni wykonane. Autorka w opisie posługuje się jasnym, precyzyjnym językiem. Opracowanie dwóch testów mPCR o wysokiej czułości i specyficzności, pozwalających na szybką identyfikację *S.aureus* i genów pięciu klasycznych enterotoksyn gronkowcowych, może zostać wykorzystane w praktyce do szybkiej diagnostyki. Bez wątpienia, silną stroną pracy jest też wykazanie molekularnego zróżnicowania występujących w mleku gronkowców.

W mojej ocenie praca doktorska pani mgr Weroniki Korpysa-Dzirba: „Molekularna charakterystyka enterotoksycznych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka surowego” jest kompleksowym opracowaniem naukowym dotyczącym ważnego problemu badawczego i spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę, więc do Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Weroniki Korpysa-Dzirba do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. Joanna Sztejn