INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19
faks: 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327 NIP 777-00-02-062
http://www. ibch.poznan.pl

Poznań, 14 października 2021

Prof. dr hab. Piotr Kozłowski

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Hornik
pt. „Opracowanie multipleksowego systemu badań przesiewowych patogenów w mleku wywołujących mastitis i genów lekooporności metodą multipleksowej amplifikacji PCR połączonej z detekcją fluorescencyjną"

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest pismo z dnia 1 października 2021 r. wystosowane przez Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Panią prof. UPP dr hab. Bożenę Danyluk.
Oceniana rozprawa przedstawia wyniki doktoratu wdrożeniowego, który został wykonany w Katedrze Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem prof. Agnieszki Piotrowskiej-Cyplik.
Praca powstała w wyniku realizacji I edycji konkursu w programie MNiSW „Doktorat wdrożeniowy" i była realizowana w latach 2017-2020.

Partnerem biznesowym, w którego laboratoriach były wykonywane prace eksperymentalne oraz na rzecz którego realizowane było wdrożenie jest Instytut Genetyki Sądowej w Bydgoszczy, stabilne przedsiębiorstwo od lat działające na polskim rynku testów genetycznych i diagnostyki medycznej.

Przedstawiona do oceny rozprawa dotyczy ważnego problemu, opracowania i walidacji multipleksowego testu PCR, który pozwalałby na jednoczesną analizę/detekcję szeregu patogenów przyczyniających się do większości przypadków mastitis, choroby zapalnej wymion często występującej u bydła mlecznego i innych zwierząt hodowlanych, stanowiącej duży problem ekonomiczny.

Opracowany test łącznie obejmował detekcję 18 amplikonów (fragmentów DNA), w tym detekcję 13 gatunków bakterii, 1 rodzaju grzyba, 1 rodzaju glonów, 2 genów bakteryjnych, warunkujących oporność na antybiotyki oraz 1 fragmentu genomu bydła domowego, stanowiącego kontrolę pozytywną. Chociaż reakcja PCR multipleks jest narzędziem często wykorzystywanym w biologii molekularnej czy genetyce opracowanie rzetelnego testu składającego się aż z 18 amplikonów, zdecydowanie nie należy do rutyny i wymaga dużej wiedzy i doświadczenia w tego typu analizach. Ważnym elementem opracowanego testu jest zastosowanie znakowania fluorescencyjnego w czterech różnych kanałach, co umożliwia analizę (detekcję patogenów) przy użyciu elektroforezy kapilarnej, co z kolei daje możliwość rzetelnej i statystycznej oceny wyników oraz automatyzji analizy.

Rozprawa ma klasyczną strukturę i składa się z następujących części: (i) Wstęp, (ii) Celu pracy, (iii) Materiały i metody, (iv) Wyniki, (v) Dyskusja, (vi) Podsumowanie (vii) Wnioski, (viii) Spis literatury oraz (viii) Streszczenia po polsku i angielsku, które są jednocześnie wyróżnionymi rozdziałami rozprawy. Dodatkowo do rozprawy, w formie załącznika, dołączona jest Procedura Badawcza PB-16 „Oznaczenie jakościowe patogenów wywołujących mastitis w mleku metodą multiplex-PCR z detekcją fluorescencyjną", która jest zasadniczym wynikiem realizacji niniejszego doktoratu.

Wstęp

Wstęp jest rozdziałem, który zdecydowanie wyróżnia się spośród wstępów do doktoratów, które miałem okazję czytać. Zamiast, jak to zwykle bywa, szeroko opisanych poszczególnych zagadnień, często luźno związanych z przedmiotem rozprawy, tutaj mamy wstęp, który stanowi spójną całość dobrze wprowadzający w podejmowane zagadnienie. Poza dobrze zbalansowanym przedstawieniem ogólnego tła badań, we wstępie znajdziemy przekonujące uzasadnienie podejmowanych badań, stan wiedzy w obszarze testów mastitis, ich zalet i ograniczeń oraz charakterystykę najważniejszych patogenów wywołujących chorobę. Jedyne czego mi zabrakło we wstępie jest podsumowanie, najlepiej graficzne, udziału poszczególnych patogenów (częstości) w przypadkach mastitis u bydła. Wiem, że opisywane są te częstości obserwowane w różnych badaniach ale brakuje mi ogólnego podsumowania.

Cel pracy

Cel pracy został sprecyzowany jasno i jest adekwatny do przeprowadzonych badań przedstawionych w kolejnych rozdziałach.

Materiały i metody

Nie mam szczególnych uwag do tej części pracy. W części tej prawidłowo zostały opisane poszczególne procedury oraz metody obliczania poszczególnych parametrów, wraz z uzasadnieniem przyjmowanych założeń.

Wyniki

W tej części, w skrócie, mgr Hornik (i) przeprowadził analizę i wybór optymalnej metody izolacji DNA z mleka, (ii) przetestował poszczególne amplikony, najpierw w warunkach pojedynczych reakcji bez znakowania fluorescencyjnego a następnie w warunkach multipleks i ze znakowaniem fluorescencyjnym, (iii) opracował optymalne warunki reakcji PCR oraz warunki elektroforezy kapilarnej w dwóch automatycznych analizatorach kapilarnych ABI3130xl i ABI3500, (iv) na podstawie analizy kontroli negatywnych wyznaczył limit detekcji oraz limit oznaczalności dla poszczególnych kanałów w obu wspomnianych analizatorach kapilarnych, oraz (v) dla każdego badanego amplikonu wyznaczył poziom czułości oraz zakres liniowości. Wszystkie analizy zostały wykonane prawidłowo. Dopatrzyłem się tylko jednej drobnej nieścisłości w przypadku analizy zakresu liniowości dla amplikonu mecA. Wydaje mi się, że zakres liniowości w tym przypadku mógłby być szerszy niż wskazany i wynosić 25-250 kopii (zamiast 50-250 kopii). Jeśli dobrze przeliczyłem to dla zakresu 25-250 kopii wartość R2 jest nawet nieco wyższa, a ze względu na wyższą liczbę stopni swobody korelacja w tym szerszym zakresie powinna być również dużo bardziej istotna. Uwaga ta nie ma jednak wpływu na ostateczny wynik ponieważ oba zakresy mieszczą się w obrębie założonego progu R2.

Jedyne czego mi brakowało w tym rozdziale to przedstawienia przykładowych elektroforegramów dla poszczególnych analiz. Takie przykłady znajdują się dopiero w dołączonej procedurze badawczej.

Dyskusja

W rozdziale tym zostało przedstawione podsumowanie i interpretacja wyników. Nie dopatrzyłem się w tym rozdziale ani w całej pracy żadnych nadinterpretacji. Podoba mi się, że rozdział ten nie został „przegadany", co często zdarza się w dyskusjach doktoratów. Rozdział ten jest wręcz krótki. Odpowiada to jednak formie doktoratu.

Uwagi i pytania:

Poza drobnymi uwagami zgłaszanymi powyżej chciałbym żeby doktorant podczas obrony odniósł się również do następujących dwóch pytań.

1. Gdyby obecnie doktorant miał podjąć się opracowania testu genetycznego na mastitis to czy, w świetle zdobytych doświadczeń, zmienił by coś w procedurze, i jeśli tak to dlaczego?
2. Jaki jest zakres stosowania opracowanej procedury? W jakim stopniu opracowany test może być stosowany w diagnostyce mastitis w innych gatunkach czy innych obszarach geograficznych, np. w Azji czy Afryce?

Podsumowując, na podstawie przedstawionej dokumentacji uważam, że praca została zrealizowana prawidłowo i postawiony cel został osiągnięty. Uważam, że opracowany test spełnia kryterium testu genetycznego i będzie mógł być zastosowany w realnej diagnostyce mastitis. Wstęp pracy mógłby z łatwością posłużyć do przygotowania arytykułu przeglądowego.

W związku z powyżej przytoczonymi argumentami jestem przekonany, że złożona rozprawa spełnia wszystkie warunki rozprawy doktorskiej i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, zawarte u ustawie z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Bartosza Hornik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Piotr Kozłowski