UNIWERSYTET
EKONOMICZNY
W POZNANIU

Poznań, dnia 26.10.2021 r.

Dr hab. inż. Daniela Gwiazdowska, prof. UEP
Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

RECENZJA
rozprawy doktorskiej **mgr inż. Łukasza Kaczorowskiego**
pt.: „Opracowanie zestawu systemów do jakościowej i ilościowej diagnostyki patogenów w mleku wywołujących mastitis i genów lekooporności metodą real-time PCR"
napisanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Cyplika

Recenzja została przygotowana na podstawie pisma z dnia 01.10.2021 wystosowanego przez Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Panią prof. UPP dr hab. Bożenę Danyluk.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska powstała w wyniku realizacji konkursu w programie MNiSW „Doktorat wdrożeniowy", a jej celem było opracowanie i walidacja metody do wykrywania i analizy ilościowej wybranych mikroorganizmów patogennych odpowiedzialnych za mastitis u bydła, wykorzystując w tym celu technikę real-time PCR.
Zapalenie wymienia, czyli mastitis to jedna z najczęściej występujących chorób bydła o zasięgu globalnym, w większości przypadków wywoływana przez infekcje bakteryjne. Ze względu na różnorodność mikroorganizmów odpowiedzialnych za chorobę, dokonuje się podziału na mastitis zakaźne i środowiskowe, a z kolei w obrębie zapaleń wywołanych przez patogeny wyróżnia się różne postaci uwzględniające objawy, jak postać kliniczna, przedkliniczna i przewlekła. Choroba pociąga za sobą ogromne straty ekonomiczne, wynikające z obniżonej wydajności produkcji, obniżonej jakości mleka, przedwczesnego brakowania krów, a także kosztów związanych z rozpoznaniem i leczeniem. Koszty te, jak podkreślił Autor, są trudne do oszacowania i mogą się różnić pomiędzy krajami czy nawet regionami danego kraju.
Zarówno ze względów ekonomicznych, jak i biorąc pod uwagę dobrostan zwierząt diagnostyka mastitis powinna być szybka i dokładna, aby umożliwić wczesne wykrywanie zapalenia wymienia w celach terapeutycznych. Ponieważ najskuteczniejszym sposobem leczenia jest terapia celowana, konieczne jest stosowanie metod, pozwalających na wykrycie mikroorganizmu, odpowiedzialnego za infekcję. Zainteresowania Autora pracy

al. Niepodległości 10
61-875 Poznań
tel. +48 61 856 90 00
fax +48 61 856 90 00
NIP: 777-00-05-497
REGON 00000-1525

www.ue.poznan.pl

skoncentrowały się na wykorzystaniu metody real-time PCR czyli reakcji PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym. Jest to technika jakościowo- -ilościowa o dużej specyficzności i wysokiej czułości. Techniki analityczne wykorzystujące amplifikację DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy stają się coraz bardziej powszechne jako narzędzie do rutynowych badań laboratoryjnych i, jak podkreślił Autor, są standardem molekularnej identyfikacji patogenów. Na rynku dostępne są wprawdzie zestawy diagnostyczne PCR do wykrywania mastitis, jednak istnieje konieczność uwzględniania w testach szerszego zakresu patogenów, nie tylko tych dominujących w zakażeniach.

Formalna oceny pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 123 strony, nie licząc załączników. Struktura pracy jest typowa dla prac o charakterze empirycznym, z uwzględnieniem podziału na część literaturową oraz doświadczalną. Część literaturowa, zatytułowana: „Wstęp" obejmuje 7 podrozdziałów i liczy 28 stron, natomiast część doświadczalna zawierająca cele pracy, metodykę badań, opis wyników, dyskusję, podsumowanie i wnioski obejmuje 67 stron. Spis literatury obejmuje 213 pozycji, w tym głównie publikacje obcojęzyczne. Ponadto, w pracy znajdują się 23 tabele i 27 rysunków. Na końcu pracy znajdują się załączniki, zawarte na 29 stronach.

Merytoryczna ocena pracy

Część literaturowa pracy stanowi wprowadzenie do podjętej problematyki, w którym Autor, w kolejnych rozdziałach, przedstawia charakterystykę zapalenia wymienia, opisuje straty ekonomiczne spowodowane wystąpieniem choroby, a następnie skupia się na etiologii, charakterystyce mikroorganizmów odpowiedzialnych za jej rozwój i metodach wykrywania mastitis. Zagadnienia przedstawione w tej części pracy są ułożone w logicznej kolejności i właściwie dobrane, stanowiąc tym samym dobre wprowadzenie do części doświadczalnej. Autor wykazał się przy tym znajomością krajowego oraz światowego dorobku naukowego w realizowanej tematyce.

Część literaturowa skupia się przede wszystkim na etiologii zapalenia wymienia i charakterystyce mikroorganizmów, które są odpowiedzialne za chorobę. Podział mikroorganizmów na patogenne i środowiskowe, zwłaszcza w świetle aktualnych danych literaturowych, wskazujących na rosnący udział tych drugich w wywoływaniu choroby, jest jak najbardziej uzasadniony.

Uważam jednak, że w tym zwartym opracowaniu Autor mógł nieco szerzej przedstawić problem strat ekonomicznych, związanych z wystąpieniem zapalenia wymienia i w bardziej przejrzysty sposób scharakteryzować podział na straty bezpośrednie i pośrednie. W opisie dotyczącym poszczególnych przyczyn strat brakuje często informacji, jak duże mogą one być, żeby podkreślić wagę problemu. Warto byłoby również zwrócić uwagę, że wielkość strat jest

związana z rodzajem/gatunkiem mikroorganizmu patogennego, fazy laktacji na początku choroby i nasilenia infekcji. Ponadto, jeżeli problem jest tak aktualny, to dlaczego cytowane są tylko przykładowe koszty z roku 2002? W literaturze można znaleźć więcej przykładów z różnych krajów, również bardziej aktualnych.
Istotne z punktu widzenia realizacji doktoratu wdrożeniowego jest przedstawienie metod wykrywania zapalenia wymienia, począwszy od najbardziej popularnej i najprostszej metody określenie liczby komórek somatycznych, poprzez testy biochemiczne, aż do identyfikacji mikroorganizmów z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF i różnych odmian PCR. W tej części najbardziej brakuje mi rzetelnego określenia zalet i wad wszystkich metod. W opisie można znaleźć wprawdzie wady niektórych omawianych metod, jednak zostały one zupełnie pominięte w opisie reakcji PCR. Biorąc pod uwagę, że praca doktorska ma silny nacisk na opracowanie metody, pozwalającej na wykrycie i ilościowe oznaczenie czynnika odpowiedzialnego za chorobę, warto byłoby zrobić takie zestawienie, które w czytelny sposób pokazałoby przewagę wybranej przez Autora metody. Szczególnie ważne wydaje mi się odniesienie do metody MALDI-TOF, która w ostatnich latach coraz częściej jest wykorzystywana do identyfikacji mikroorganizmów, również tych, odpowiedzialnych za zapalenie wymienia.
Podsumowując, mimo powyższych uwag, treści zawarte w części literaturowej wpisują się w uzasadnienie podjętych badań, dlatego **należy uznać wybór tematu pracy przez Doktoranta za uzasadniony z naukowego, poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia.**

Cele pracy: naukowy i wdrożeniowy zostały sformułowane w sposób jasny, chociaż nie w pełni korespondują z tytułem pracy. W tytule podkreślona jest jakościowa i ilościowa diagnostyka, podczas gdy w celach nacisk został położony wyłącznie na analizy ilościowe. Brakuje natomiast hipotez, które w pracy naukowej powinny zostać sformułowane i weryfikowane w oparciu o uzyskane wyniki.

Materiały i metody badań zostały opisane w sposób wyczerpujący, jednak uważam, że sposób opisania poszczególnych zadań powinien być typowo metodyczny z pominięciem dodatkowych opisów jak np. charakterystyka narzędzia Primer-BLAST czy dodatkowe wyjaśnienia w opisie poboru próbki mleka. Przeniesienie obszernej tabeli zawierającej sekwencje starterów oraz sond do załącznika 1 uważam za uzasadnione, jednak w metodyce brakuje odniesienia do tej listy. Informacja ta pojawia się dopiero w omówieniu wyników. Ponadto, Autor wspomniał w metodyce, że część sekwencji starterów i sond została zaczerpnięta z danych literaturowych, a część zaprojektowana samodzielnie. Uważam, że źródła literaturowe powinny być podane, jednak w tabeli 1 w załączniku 1 nie znalazłam takich informacji. Brakuje również informacji czy też charakterystyki znaczników sond, które

pojawiają się w tabeli 3 na str. 46. Wyjątek stanowi wzmianka o znaczniku przeznaczonym do reakcji kontrolnej. W definicji liniowości na str. 40 brakuje końca zdania.

Wyniki

Omówienie wyników zawiera się w jednym rozdziale podzielonych na 5 podrozdziałów, chociaż numeracja poszczególnych części jest niewłaściwa (po punkcie 4.3. ponownie pojawia się punkt 4.1. i 4.2.). Autor kolejno przedstawia rezultaty izolacji DNA z próbek mleka przeprowadzonej czterema metodami, optymalizację reakcji PCR dla poszczególnych zestawów multipleksowych oraz ich walidację. W pierwszej części doświadczeń Autor dokonał wyboru metody izolacji DNA z próbek mleka wraz z odpowiednim zestawem. Modyfikacja procesu polegała na zwiększeniu prędkości wirowania próbki mleka na początkowym etapie procesu izolacji, co pozwoliło na uzyskanie satysfakcjonujących rezultatów. Startery i sondy, które wykorzystano w badaniach, poddano ocenie pod względem ich specyficzności oraz możliwości tworzenia wiązań primer-dimer i struktur drugorzędowych przez odpowiednio dobrane narzędzia. Dodatkowo, wszystkie startery i sondy zostały przetestowane z wykorzystaniem odpowiednich wzorców DNA. Autor zaprojektował następnie 6 zestawów reakcji multipleksowych, w skład których wchodziły reakcje wykrywania wybranych patogenów lub patogenów i genów oporności na wybrane antybiotyki. W kolejnym etapie poszczególne zestawy reakcji multipleksowych zostały zoptymalizowane. Przygotowanie materiałów i optymalizacja warunków reakcji umożliwiły podjęcie właściwych badań, zmierzających do walidacji poszczególnych zestawów multipleksowych. Walidacja została przeprowadzona zgodnie z zaleceniami przedstawionymi w międzynarodowej normie PN-EN ISO/IEC 17025:2017 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących". Autor poddawał walidacji zaprojektowane zestawy reakcji oceniając ich specyficzność, wyznaczając limit detekcji (LOD), limit oznaczalności (LOQ), liniowość, wydajność reakcji (Eff%), zakres roboczy, powtarzalność i precyzję. Badania potwierdziły specyficzność poszczególnych reakcji przeznaczonych do wykrywania mikroorganizmów i oporności na antybiotyki w zestawach multipleksowych, a walidacja przebiegła pomyślnie w przypadku 23 na 24 reakcje. Warunków walidacji nie spełniła reakcja wykrywania drożdży *Candida* spp. Przeprowadzona na końcu reakcja odtwarzalności, z wyłączeniem reakcji wykrywania *Candida* spp. dała satysfakcjonujące rezultaty.

Część doświadczalna jest spójna, ułożona w logiczny ciąg i konsekwentnie, zgodnie z celem, zrealizowana. Bardzo brakuje mi jednak na początku tego rozdziału określenia planu badań bądź przedstawienia schematu, który w sposób czytelny określiłby zakres realizowanych doświadczeń, tym bardziej, że opis wyników również nie zawiera żadnego wprowadzenia. Układ doświadczeń nie jest skomplikowany, ale schematyczne przedstawienie kolejnych kroków z zaznaczeniem ważniejszych informacji (przykładowo: wybór starterów i sond dla 21

al. Niepodległości 10
61-875 Poznań
tel. +48 61 856 90 00
fax +48 61 856 90 00
NIP: 777-00-05-497
REGON 00000-1525

www.ue.poznan.pl

mikroorganizmów, zaprojektowanie 6 reakcji multipleksowych, itd.) zdecydowanie ułatwiłoby ogólny pogląd na całość pracy i śledzenie kolejnych etapów. Jednak największym mankamentem omówienia wyników jest oszczędna forma opisu. Autor, realizując kolejne etapy doświadczeń, z reguły nie dodaje żadnych wyjaśnień czy wprowadzenia, przez co, momentami, praca przybiera formę raportu. Przykładowo, wprowadzając modyfikacje do metody izolacji DNA z próbek mleka Autor mógł rozpocząć od krótkiej informacji, dlaczego akurat takie a nie inne warianty zostały wybrane. Z kolei w rozdziale dotyczącym walidacji (4.2.2, powinien być 4.5.2.) takie wprowadzenie można znaleźć. Niektóre tego typu informacje znalazły się w metodyce, nie zawsze potrzebnie. Dodatkowo, Autor, chcąc prawdopodobnie uniknąć powtórzeń, w części wynikowej wspominał o tym, co zostało już zawarte w metodyce, zdawkowo, tracąc niekiedy sens wypowiedzi. Na przykład dobór poszczególnych reakcji w zestawach multipleksowych został wyjaśniony w części metodycznej, natomiast w części wynikowej informacja ta została na tyle skrócona, że wskazuje na inne kryterium wyboru. W części metodycznej Autor wyjaśnił, że zaprojektowanie poszczególnych reakcji multipleksowych odbyło się poprzez wykluczenie możliwych interferencji pomiędzy starterami i sondami. W części wynikowej jest mowa o tym, że klasyfikacji drobnoustrojów dokonano głównie na podstawie wykluczenia ich wzajemnych interakcji, co sugeruje, że pod uwagę brano interakcje pomiędzy mikroorganizmami. Według mnie niewłaściwe jest tu również użycie słowa klasyfikacja, ponieważ Autor nie dokonywał klasyfikacji mikroorganizmów, a tylko dobierał poszczególne zestawy starterów dedykowanych wykryciu określonych bakterii lub genów oporności na antybiotyki.

Część doświadczalna mogłaby być bardziej dopracowana pod względem językowym i redakcyjnym. Tabele przedstawiające wyniki walidacji zestawów reakcji multipleksowych powinny być opatrzone legendą, co nie zmuszałoby czytelnika do szukania wyjaśnień w tekście (skróty NO i ND). Ze względu na wielokrotne powtórzenia podobnych tytułów poszczególnych etapów walidacji (*Walidacja reakcji dla wykrywania* ...itp.). Autor mógł konsekwentnie stosować jeden schemat zapisu zamiast wprowadzać różne modyfikacje, nie zawsze udane.

Podsumowując, pomimo wspomnianych uwag, omówienie wyników zostało zaprezentowane w sposób uporządkowany i systematyczny, a wykorzystane przez Autora metody pozwoliły na zrealizowanie założonego celu oraz uzyskanie wyników o dużej wartości aplikacyjnej.

Dyskusja nie jest zbyt rozbudowana, obejmuje niecałe 4 strony. W dyskusji Autor uzasadnia wybór mikroorganizmów patogennych do projektowanej metody w oparciu o dane literaturowe, a także podsumowuje uzyskane rezultaty. Z punktu widzenia realizacji doktoratu wdrożeniowego cenne jest odniesienie do oferty rynkowej w zakresie zestawów

diagnostycznych, co pozwala łatwo pokazać przewagę opracowanego przez Autora zestawu. Z naukowego punktu widzenia brakuje mi jednak porównania z danymi literaturowymi. Stąd moje pytanie – czy Autor analizował podobne procesy walidacji reakcji real-time PCR dostępne w literaturze i porównywał z uzyskanymi wynikami?

Wnioski opracowane są w sposób dość nietypowy. Tylko niektóre mają charakter typowych wniosków wypływających z przeprowadzonych doświadczeń, inne stanowią raczej efekty pracy i plany ich wykorzystania. Autor mógł rozdzielić te dwie kwestie poprzez wyłączenie osobno uzyskanych efektów, co dodałoby przejrzystości.

Uwagi

Tekst został przygotowany starannie, jednak Autor nie ustrzegł się drobnych błędów, które nie obniżają jednak wartości merytorycznej pracy. Poniżej podaję kilka przykładów:

- W części literaturowej Autor używa określeń mikroflora (str. 7) lub flora bakteryjna (str.23), które lepiej byłoby zastąpić określeniem „mikrobiota" lub „mikrobiom".
- Niekonsekwentne stosowanie formy zapisu nazw mikroorganizmów. W tytułach rozdziałów czy w wielu tabelach pominięto kursywę podając nazwy gatunkowe mikroorganizmów, natomiast w tekście kursywą wielokrotnie zapisana jest forma staphylococci, która z kolei powinna być pisana bez kursywy, a najlepiej byłoby zastąpić to słowo określeniem gronkowce. Nadużywanie formy „staphylococci" jest również przyczyną błędów gramatycznych w niektórych zdaniach (np. na str. 11 „na rzecz patogenów z rodzaju *Streptococcus* oraz koagulazo-ujemnych staphylococci…"). Również skrót ssp. powinien być pisany bez kursywy. Dodatkowo, w całej pracy, Autor posługuje się na przemian pełnymi i skróconymi nazwami mikroorganizmów, a wystarczyłoby użyć pełnej nazwy tylko za pierwszym razem.
- Niekonsekwentne tłumaczenie skrótów. Niektóre skróty są wyjaśnione, inne nie. Na przykład, skrót CNS, pojawiający się po raz pierwszy na str. 17 czy MGE na str. 20 nie zostały rozwinięte, natomiast skrót NDM jest wyjaśniony.
- Wielokrotnie powtarzane, w różnych wersjach, tytuły fragmentów pracy dotyczących walidacji poszczególnych reakcji powinny być uproszczone np. „Walidacja reakcji wykrywania genu …", bez słowa „dla" w środku.
- W pracy pojawiają się drobne błędy literowe lub skróty myślowe

Podsumowanie

Podsumowując, należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana magistra Łukasza Kaczorowskiego pt. Opracowanie zestawu systemów do jakościowej i ilościowej diagnostyki patogenów w mleku wywołujących mastitis i genów lekooporności

al. Niepodległości 10
61-875 Poznań
tel. +48 61 856 90 00
fax +48 61 856 90 00
NIP: 777-00-05-497
REGON 00000-1525

www.ue.poznan.pl

UNIWERSYTET
EKONOMICZNY
W POZNANIU

metodą real-time PCR" mieści się w zakresie dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia. Autor wykazał umiejętność korzystania z dotychczasowego dorobku nauki w przedmiotowym zakresie badań. Część doświadczalna pracy została poprawnie zaplanowana i konsekwentnie zrealizowana przy wykorzystaniu odpowiednio dobranych metod badawczych, co wskazuje na odpowiednią wiedzę merytoryczną i swobodę poruszania się w obszarze interesującej Doktoranta tematyki. Założony cel pracy został osiągnięty, a uzyskane wyniki mają wartość aplikacyjną. Pod względem merytorycznym pracę oceniam wysoko, a wspomniane wcześniej błędy językowe czy niefortunne sformułowania nie wpływają na wartość naukową i aplikacyjną pracy.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do oceny rozprawą doktorską mgr Łukasza Kaczorowskiego stwierdzam, że w pełni spełnia ona wszelkie wymogi formalne stawiane tego typu opracowaniom zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 (Dz. U. Nr 65, poz 595 z późniejszymi zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Kaczorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Daniela Gwiazdowska

al. Niepodległości 10
61-875 Poznań
tel. +48 61 856 90 00
fax +48 61 856 90 00
NIP: 777-00-05-497
REGON 00000-1525

www.ue.poznan.pl