UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Poznań, 20 października 2021

Prof. dr hab. Krzysztof Sobczak
Zakład Ekspresji Genów

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Kaczorowskiego zatytułowanej „Opracowanie zestawu systemów do jakościowej i ilościowej diagnostyki patogenów w mleku wywołujących mastitis i genów lekooporności metodą real-time PCR"

Niniejszą recenzję wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Naukową Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Łukasza Kaczorowskiego została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod opieką merytoryczną prof. UPP dr hab. inż. Pawła Cyplika, pełniącego funkcję promotora w przewodzie doktorskim. W macierzystym zespole od wielu lat prowadzone są z sukcesem badania w różnych obszarach biotechnologii mikrobiologicznej, a oceniana praca wpisuje się właśnie w ten nurt badań.

Poważnym problemem hodowców bydła mlecznego jest powszechne występowanie u krów zapalenia wymienia, zwanego także mastitis. Główną przyczyną tej dysfunkcji jest infekcja bakteryjna lub infekcja innymi mikroorganizmami, takimi jak algi czy drożdżaki, ale również mechaniczne uszkodzenia wymienia. Choroba powoduje wielomiliardowe straty u producentów mleka na całym świecie. Większość metod diagnostycznych w kierunku mastitis opiera się na prostym teście liczebności komórek somatycznych w mleku lub badaniu innych parametrów fizykochemicznych i biochemicznych. Jednak najbardziej skuteczną metodą wykrywania mastitis jest identyfikacja chorobotwórczych mikroorganizmów, co umożliwia na celowaną terapię zwierząt. Ten właśnie obszar diagnostyczny stał się podstawą sformułowania głównego celu pracy doktorskiej, jakim było opracowanie i eksperymentalna walidacja czułej metody pozwalającej na szybką identyfikację jakościową i ilościową wybranych drobnoustrojów wywołujących mastitis. Ponadto na podstawie opracowanej metody doktorant chciał opracować procedurę badawczą zgodną z stosownymi wymogami jakościowymi.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Pierwsza to dość obszerny, liczący blisko 30 stron, wstęp omawiający istniejący stan wiedzy w zakresie ogólnej charakterystyki

ul. Umultowska 89, Cllegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 59 50, fax. +48 61 829 59 49
ibmib@amu.edu.pl

choroby i jej wpływu na gospodarkę, etiologii mastitis oraz stosowanych metod diagnostycznych. Część ta napisana jest w sposób kompetentny i informatywny, chociaż pewne wątki mogłyby być nieco rozwinięte. Drugą część pracy stanowi prawidłowo i jednoznacznie nakreślony cel badawczy. Trzecim i najbardziej obszernym elementem jest drobiazgowy opis zasadniczej części pracy, rozpoczynający się przedstawieniem metodyki badawczej, a kończący się dokładnym opisem i krótkim przedyskutowaniem uzyskanych wyników. Jest to tradycyjny układ rozprawy, pozwalający na przedstawienie spójnej narracji z logicznym podziałem treści.

Celem **pierwszej części pracy** było porównanie kilku metod izolacji DNA z mleka. Ta część pracy została zrealizowana minimalistycznie i jedynym porównywanym parametrem była całkowita ilość izolowanego DNA, bez krytycznego odniesienia się do celu projektu, jakim jest identyfikacja różniących się wielkością, często niewielkich drobnoustrojów. Nie dowiadujemy się zatem jak te metody sprawdziłyby się w uzyskiwaniu DNA z prób mleka zawierających różne modelowe mikroorganizmy. Można się bowiem spodziewać, że udział procentowy DNA potencjalnych patogenów będzie znacząco różny dla porównywanych metod, choćby ze względu na różny ich rozmiar, a tym samym różną stałą sedymentacji. Szkoda też, że tak uzyskane próbki DNA nie posłużyły do przetestowania zestawów diagnostycznych opisanych w dalszej części pracy.

Ze względu na brak wskazania podstaw wyboru stosowanych metod izolacji DNA chciałbym aby na publicznej obronie Doktorant odniósł się do trzech wątków.

(1) Dlaczego w dwóch metodach (wariant 2 i 3) zastosowano w pierwszym kroku wirowanie przy odpowiednio 1000 i 2300 *g*, co może spowodować nierównocenną izolację różnych klas komórek. Na pewno oczyszczą się wówczas dobrze komórki somatyczne, ale czy również wszystkie badane patogeny?

(2) Inną zagadką wymagającą wyjaśnienia jest to, że uzyskano znacznie większą wydajność izolacji DNA metodą pierwszą. Z 300 mikroL mleka (bez uprzedniego etapu wirowania) wyizolowano ostatecznie prawie tyle samo DNA co z 10 mL mleka metodami drugą i trzecią, wykorzystującymi wirowanie. Ponadto jak można wytłumaczyć fakt, że w niektórych próbkach (np. 6 i 8) ilość uzyskanego DNA była istotnie mniejsza, bez względu na zastosowaną metodę izolacji?

(3) Na rysunku 2 nie przedstawiono wyników analizy statystycznej. Dlatego też nie jest uprawnione stwierdzenie przedstawione na str. 43, że „… najlepsze wyniki uzyskano dla …”. Raczej powiedziałbym na tej podstawie, że trzy metody (wariant 1, 2 i 3) pozwoliły na uzyskanie podobnej ilości DNA. Ponadto na rysunku 2 nie podano jednostek, w jakich wyrażone jest stężenie (opis osi 0Y). Tą informację można jednak znaleźć w opisie Tabeli 2.

W drugiej części pracy Doktorant przedstawił wyniki dotyczące projektowania i eksperymentalnego walidowania zestawów pozwalających na jakościową i ilościową detekcję specyficznych patogenów

w oparciu o analizy PCR prowadzone w czasie rzeczywistym (qPCR), z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie sond oligonukleotydowych typu TaqMan. Takie podejście pozwala na zastosowanie multipleksowania, a jednocześnie wykorzystując sondy typu TaqMan zwiększa specyficzność, ale również czułość metody. Patogeny zostały starannie wybrane na podstawie dogłębnej analizy źródeł literaturowych. Zostały zatem ostatecznie zaprojektowane i zoptymalizowane zestawy multipleksowe pozwalają na wykrywanie nawet niewielkich ilości DNA patogenów, najczęściej przy dolnej granicy czułości w zakresie 10 lub 100 kopii DNA na reakcję. Metoda dla większości testów cechuje się wysoką powtarzalnością, odtwarzalnością i precyzją. Wykonano również właściwie zaplanowany test specyficzności dla opracowanych multipleksów z wykorzystaniem wzorcowego DNA drobnoustrojów. Ten cel pracy doktorskiej został w pełni zrealizowany.

Ze względu na pewne nieścisłości w opisie stosowanych metod chciałbym jednak aby na publicznej obronie Doktorant odniósł się do dwóch kwestii.

(1) W rozdziale 3.6. nie podano metody oczyszczania lub szacowania czystości zamówionych cząsteczek DNA, służących jako matryce do ilościowych analiz PCR pozwalających na określanie liczby kopii DNA. Jeśli syntetyzowany DNA nie podlegał oczyszczaniu np. przez HPLC, to czy sprawdzano czystość DNA innymi metodami. Synteza chemiczna, zwłaszcza tak długich cząstek DNA, nigdy nie przebiega z wysoką wydajnością. Zawsze uzyskujemy heterogenną populację cząsteczek, w większości nie pełnej długości (bez miejsca komplementarnego do starterów). Wówczas automatyczne przeliczenie na liczbę kopii cząstek pełnej długości jest bardzo problematyczne. Ponadto nie opisano jak zaplanowane syntetyczne DNA mają się do lokalizacji starterów (innymi słowy czy startery komplementarne są bezpośrednio do końców syntetycznych DNA i jak długie były te syntetyczne DNA)? Szkoda, że sekwencje te nie zostały przedstawione w załączniku.

(2) Czy wszystkie zamówione, certyfikowane wzorce DNA były względem siebie podobne – czy były to zawsze izolaty DNA z patogenów? Jak obliczano liczbę kopii na podstawie stężenia wyrażonego w ng/mikroL, a jak gdy wartość stężenia nie została podana przez producenta?

Trzecim celem postawionym w rozprawie doktorskim było stworzenie procedury badawczej zgodnej z wymogami systemu jakości Instytutu Genetyki Sądowej sp. z o. o (IGS) w Bydgoszczy. Procedura ta stanowi integralną część rozprawy - załącznik 2. Ten cel został w pełni zrealizowany. Przeprowadzone badania pozwoliły na przygotowanie procedury badawczej PB-17 w kierunku identyfikacji jakościowej i ilościowej 20 drobnoustrojów wywołujących mastitis oraz trzech genów lekooporności bakterii. Wdrożenie takiej zgodnej z normą procedury pozwoli na istotne zwiększenie portfolio usług IGS. Usługa może być oferowana zarówno małym jak i dużym producentom mleka w kraju ze względu na szerokie spektrum badanych drobnoustrojów i relatywnie niewielki koszt analizy pojedynczej próbki.

Z dogłębnej analizy wszystkich elementów rozprawy doktorskiej jasno wynika, że mgr Łukasz Kaczorowski w sposób poszerzony przestudiował zagadnienia dotyczące etiologii oraz podstaw diagnostyki mastitis, głównie w kontekście ilościowej metody identyfikacji mikroorganizmów z zastosowaniem metody PCR w czasie rzeczywistym. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele, doktorant zaplanował logiczny ciąg poszczególnych etapów badań. Wyjątkiem jest brak krytycznego przedstawienia optymalnej metody izolacji DNA dla osiągnięcia głównego celu projektu. Pokazał jednak, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać ze odpowiedniego narzędzia badawczego, interpretując najczęściej w sposób właściwy uzyskane wyniki. Jak wspomniałem powyżej w kilku przypadkach na podstawie przedstawionych w rozprawie wyników wyciąganie wniosków było nie do końca uprawnione, albo w pełni uprawnionym byłoby, gdyby Doktorant przedstawił nieco szczegółowiej pewne wątki metodyczne pracy. Dyskusja obserwacji eksperymentalnych przeprowadzona została w wystarczający sposób, chociaż niektóre elementy można by przedstawić w nieco szerszym kontekście. Praca doktorska odpowiada na ważne wyzwanie z obszaru diagnostyki zwierząt hodowlanych. Wskazane powyżej uchybienia i wątpliwości interpretacyjne nie wpływają w istotny sposób na moją pozytywną ocenę rozprawy.

Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Łukasza Kaczorowskiego spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami)**.** Uważam, że Doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodnił, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Uzyskał istotne wyniki, poprawnie je opisał i wyciągnął uprawnione wnioski. Dlatego też z pełnym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Łukasza Kaczorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie mu stopnia naukowego doktora.

Krzysztof Sobczak

ul. Umultowska 89, Cllegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 59 50, fax. +48 61 829 59 49
ibmib@amu.edu.pl