

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Genetyczne różnicowanie wybranych serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*”

Mgr Anna Krzyżanowska

Promotor Dr hab. Paweł Parniewski

- I. Ocena rozprawy ze względu na zgodność z wymogami Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r. Nr 65, poz. 595 ze zmianami).

Przedłożona do oceny rozprawa na stopień naukowy doktora ma formę maszynopisu książki liczącego 102 strony, napisanego w języku polskim, z załączonym streszczeniem w języku angielskim. Rozprawa została przygotowana pod opieką promotora, którego imię i nazwisko jest umieszczone na tytułowej stronie maszynopisu.

Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, którego celem było opracowanie prostego testu molekularnego przydatnego do różnicowania wariantów serologicznych (serotypów) pałeczek *Salmonella enterica* subs. *enterica*. Oryginalne podejście badawcze i rozwiązanie problemu naukowego polegało na wykorzystaniu zróżnicowania trójnukleotydowych sekwencji powtórzonych (TRS) GTG i CAC wykrywanych metodą PCR. Dodatkowo badano zróżnicowanie liczby tandemowych sekwencji powtórzonych (VNTR) w wytypowanym przez doktorantkę locus Sal-175. Przeznaczeniem opracowanych metod jest wsparcie klasycznej metody typowania serologicznego pałeczek *Salmonella enterica* subs. *enterica*, celem ograniczenia do niezbędnego minimum liczby koniecznych do przeprowadzenia testów serologicznych w procesie określania serotypu.

Sekcje „Wprowadzenie” i „Dyskusja” ocenianej rozprawy potwierdzają ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki w zakresie badanego problemu naukowego, która w rozprawie odwołuje się do 121 pozycji piśmiennictwa fachowego, głównie w języku angielskim, wśród których dominują publikacje naukowe, które ukazały się w okresie ostatnich dziesięciu lat. Sekcje „Materiały i metody” oraz „Wyniki” wskazują na to iż doktorantka w dostatecznym stopniu posiadała podstawy niezbędne do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

- II. Szczegółowa ocena rozprawy doktorskiej ze względu na zakres i przyjęty sposób oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Podjęty przez doktorantkę problem naukowy, polegający na zaproponowaniu nowych metod genetycznych usprawniających różnicowanie szczepów pałeczek *Salmonella enterica* subs. *enterica* do określonych typów serologicznych (serowarów) stanowiących w przypadku tej grupy drobnoustrojów podstawową jednostkę wymaganą w badaniach mikrobiologicznych i epidemiologicznych, stanowi poważne wyzwanie. Pałeczki *Salmonella enterica* subs. *enterica* stanowią grupę drobnoustrojów o szczególnie wysokim zróżnicowaniu właściwości antygenowych, a liczba wyróżnianych typów serologicznych tych pałeczek przekracza półtora tysiąca. Zapewnienie możliwości serotypowania tych pałeczek wymaga zaopatrzenia laboratorium diagnostycznego w znaczną liczbę surowic diagnostycznych, co wiąże się z dużym kosztem funkcjonowania laboratorium. Ponieważ pałeczki *Salmonella enterica* subs. *enterica* stanowią wciąż poważny problem zdrowia publicznego i w wielu krajach prowadzony jest nadzór sanitarny oraz rejestracja ognisk zakażeń tymi drobnoustrojami, podejmowano liczne próby opracowania alternatywnych do serotypowania metod

genetycznych przydatnych do różnicowania *Salmonella enterica* subs. *enterica* do określonych typów serologicznych (serowarów). Dotychczas opracowane metody geno-serotypowania tych drobnoustrojów różnią się efektywnością i kosztem analiz, dlatego wciąż poszukiwane są nowe rozwiązania. Przedłożona do oceny rozprawa stanowi taką właśnie próbę. Doktorantka zastosowała w badaniach własnych dwie metody genetyczne, które nie są nakierowane wyłącznie na markery związane z determinacją antygenowych właściwości tych drobnoustrojów, lecz analizują polimorfizm trójnukleotydowych sekwencji powtórzonych na poziomie globalnym genomu bakteryjnego lub jak marker VNTR Sal-175 ograniczone są do analizy polimorfizmu lokalnego. W założeniu metody te nie są klasycznymi metodami geno-serotypowania, lecz wykorzystują markery których występowanie, choć nie związane z właściwościami antygenowymi, może wykazywać korelację z przynależnością badanego szczepu do określonego serowaru. Markery te jednak mogą być wykrywane przy użyciu względnie prostego testu PCR w procesie preselekcji poprzedzającym typowanie serologiczne. Opracowane przez doktorantkę metody, pozwoliły w trakcie prowadzonych przez nią badań zidentyfikować szczepy błędnie zaklasyfikowane serologicznie do określonych serowarów.

Cel badań obejmował:

1. Ocenę skuteczności metody TRS-PCR w różnicowaniu serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
2. Opracowanie metody różnicującej serowary *Salmonella enterica* subsp. *enterica* w oparciu o obecność motywów VNTR w regionie Sal-175.
3. Ocenę stabilności genetycznej elementów VNTR stosowanych w genotypowaniu serowarów *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* oraz porównanie ze stabilnością regionu Sal-175.

Badania przeprowadzono na kolekcji liczącej 169 izolatów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, należących do 7 serowarów: Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow, Hadar, Newport, Anatum. Ta grupa obejmuje serowary, które są dość licznie reprezentowane na terenie kraju, co ze względu na przewidziane zastosowanie metod genetycznych do preselekcji szczepów przed ich serotypowaniem może usprawiedliwiać badanie zaledwie 7 z ponad 1,5 tys. serotypów.

W prowadzonych badaniach doktorantka dokonała analizy teoretycznej „in silico” pozwalającej na wybór najbardziej przydatnych sekwencji TRS oraz określiła strukturę i środowisko genetyczne markera VNTR Sal-175, a także zaprojektowała startery do amplifikacji tych markerów metodą PCR. Następnie na wybranych szczepach przeprowadzono optymalizację warunków testu-PCR, a w przypadku TRS-PCR, w drodze eksperymentu dokonano wyboru właściwych sekwencji trójnukleotydowych, którymi okazały się GTG i CAC. W kolejnym etapie badań, zoptymalizowane metody: TRS-PCR i VNTR Sal-175 poddano ocenie na grupie 169 badanych szczepów. Analiza ta pokazała, że z obu metod TRS-PCR, test GTG-PCR okazał się bardziej przydatny. Opisany w rozprawie proces etapowej, eksperymentalnej selekcji właściwych markerów i optymalizacji warunków technicznych PCR należy uznać za prawidłowy. Wymagał on przeprowadzenia przez doktorantkę wielu pracochłonnych analiz. W przypadku metody VNTR Sal-175 przeprowadzona została ocena stabilności genotypu tego markera w wybranych szczepach różnych serotypów, poddanych szeregowym przesiewom (n= 35) w warunkach laboratoryjnych. Ocena ta wykazała zmienność markera VNTR Sal-175, którą obserwowano, gdy niektóre z badanych szczepów (*S. Typhimurium*) poddane zostały więcej niż 10 przesiewom. Ocena stabilności markerów VNTR w warunkach laboratoryjnych stanowi podstawę dla możliwości ich wykorzystania w genotypowaniu. Mimo, iż można uważać, że analizę tą doktorantka powinna przeprowadzić na większej liczbie szczepów i w przynajmniej dwóch powtórzeniach dla każdego szczepu, to jednak warunek przeprowadzenia oceny stabilności markera VNTR został spełniony. Kolejnym etapem ważnym w ocenie przydatności markerów VNTR dla celów badań epidemiologicznych jest ich stabilność „in vivo”, najczęściej w

grupie izolatów z tego samego ogniska. Tego etapu badań doktorantka nie przeprowadziła, co w prawdzie nie podważa metodologicznej poprawności przeprowadzonych badań, a taka właśnie poprawność w rozprawie doktorskiej jest wymagana, to jednak powoduje, że przydatność markera VNTR Sal-175 do celów w rozprawie wymienionych należy traktować wyłącznie w kategoriach teoretycznych. Badania stabilności VNTR Sal-175 „*in vivo*” mogą jednak zostać wykonane w przyszłości, bez konieczności ich uwzględniania w ocenianej rozprawie. Zaobserwowana u wielokrotnie przesiewanych szczepów zmienność markera VNTR Sal-175 została przez doktorantkę porównana w osobnym eksperymencie ze zmiennością markerów VNTR wykorzystywanych przez innych badaczy w genotypowaniu szczepów *S. Enteritidis* (MLVA SENTER) i *S. Typhimurium* (MLVA STTR). Doktorantka w swoich badaniach wykazała, że genotypy MLVA badanych szczepów również ulegają podobnie do VNTR Sal-175 zmianie w następstwie wielokrotnego przesiewania szczepów w laboratorium, co było wynikiem zmian dotyczących jednego lub większej liczby loci VNTR. To pogłębione studium stabilności VNTR wskazuje na zaangażowanie doktorantki w dążeniu do krytycznej weryfikacji wyników uzyskanych przy użyciu opracowanych we własnym zakresie metod badawczych. Wyniki przedstawione przez doktorantkę w sekcji 6.3.2. pt. „Ocena stabilności genetycznej regionów SENTER oraz STTR” potwierdzają fakt dużej zmienności regionów VNTR, poddając tym samym w wątpliwość przydatność schematu MLVA opartego na markerach SENTER i STTR w typowaniu *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Obserwacje doktorantki można uznać, za zbieżne z obserwacjami innych badaczy (V. Wuyts et al. PLOS ONE 2013), którzy oceniali przydatność MLVA z użyciem markerów STTR, wskazując na fakt, że do identyfikacji szczepów *S. Typhimurium* z ognisk, obok MLVA należy stosować dodatkowo jeszcze inną metodę typowania.

Podsumowując przeprowadzone badania, można stwierdzić, że przyjęty przez doktorantkę tok badawczy był w ogólnym zarysie prawidłowy, a zgromadzony materiał był wystarczający do przeprowadzenia zaplanowanych badań. Wyniki badań uzyskane metodami własnymi doktorantka odnosiła do wyników innych metod genetycznych, aczkolwiek ograniczonych wyłącznie do metod wykorzystujących PCR (BOX, ERIC, REP), co przy powszechnym stosowaniu metody PFGE w różnicowaniu pałeczek *Enterobacteriaceae*, jest rozwiązaniem zaledwie dostatecznym, choć możliwym do wytłumaczenia ze względu na koszt i pracochłonność analiz PFGE. Uzyskane wyniki badań zilustrowano 20 rycinami i 27 tabelami, które należycie spełniają funkcję informacyjną uzupełniając opis zamieszczony w tekście bez zbędnych duplikacji. Wyniki badań przeprowadzonych przez doktorantkę pokazały, że opracowane przez nią metody, a zwłaszcza GTG-PCR mogą być potencjalnie przydatne do osiągnięcia celu postawionego w rozprawie, tj. stworzenia łatwej w użyciu metody preselekcji *Salmonella enterica* subsp. *enterica* do 7 wybranych typów serologicznych.

Oceniając rozprawę doktorską pani Mgr Anny Krzyżanowskiej nie można jednak nie zauważyć, iż autorka często stosowała duże skróty myślowe, które wraz z brakiem dostatecznej precyzji formułowanych zdań, utrudnia czytelnikowi zrozumienie opisywanych zagadnień obniżając tym samym wartość rozprawy. Ze względu na fakt, iż przedłożona do oceny rozprawa ma formę maszynopisu, wskazane niżej nieprecyzyjne sformułowania, będą wymagać doprecyzowania przed upowszechnieniem rozprawy drukiem.

- Problem nadmiernego uproszczenia opisu wyników analizy VNTR Sal-175 (str. 70) ilustruje zwrot „...ze względu na **jednolitość** otrzymanych wyników na rysunku uwzględniono 8 szczepów z każdego serowaru.”. Nie pozwala on zrozumieć co autorka ma na myśli, pisząc o jednolitości, gdyż rycina 16 (do której doktorantka odwołuje się w tym zdaniu) przedstawia prąжки zróżnicowane pod względem liczby i wielkości, choć uporządkowane w klastrach odpowiadających badanym serowarom. Czy doktorantka ma na myśli, klasteryzację profili VNTR Sal-175 w obrębie serowaru? Równie enigmatyczny jest opis wyniku przedstawiony na

stronie 72, który brzmi następująco „W przypadku szczepów S204 (*S. Anatum*) oraz S203 (*S. Hadar*) uzyskano produkty, które różniły się długością **od tych, otrzymanych przez inne szczepy odpowiadających serowarów**”. W dalszej części akapitu, doktorantka opisując zróżnicowanie genotypów VNTR Sal-175 wśród badanych szczepów *S. Typhimurium*, napisała zdanie, które ma charakter wniosku „Takie zróżnicowanie nie pochodzi także od materiału z którego pobrana była próbka, daty i regionu izolacji (Tab.2)”. Czy doktorantka miała na myśli stwierdzenie braku korelacji pomiędzy genotypem VNTR Sal-175, a rodzajem materiału, z którego szczep wyizolowano, datą izolacji i regionu, w którym szczep wyizolowano? Jeśli tak, to należy podać metodykę badania korelacji.

- W kolejnym zdaniu doktorantka stawia tezę w obszarze zagadnienia, którego nie badała, pisząc: „Najwidoczniej **w toku ewolucji** serowaru *S. Typhimurium* doszło do rearanżacji w regionie Sal-175, w wyniku czego rozwinęły się dwie linie z różną liczbą powtórzeń VNTR w tym regionie.” Być może doktorantka czytała o podobnych badaniach, ale w takiej sytuacji należy podać autora badań, a tego typu hipotezy omawiać w sekcji dyskusja. Przestrzeganie zasady oddzielania badań własnych od badań innych autorów, oraz formułowania wniosków na podstawie wyników przeprowadzonych badań własnych jest jednym z podstawowych kanonów rozpraw naukowych, w tym rozprawy doktorskiej. Formułowanie tez, wymaga szczególnej rozwagi. Przykładem, poddającym w wątpliwość (a wręcz obalającym) wyżej przywołaną tezę „o ewolucyjnym” czyli ukształtowanym w rozległej skali czasowej zróżnicowaniu genotypów VNTR Sal-175 *S. Typhimurium* na dwie grupy jest wynik uzyskany przez samą doktorantkę, opisany w sekcji 6.3.1. zatytułowanej „Ocena stabilności genetycznej regionu VNTR Sal-175”, w której doktorantka stwierdza na str. 75 „Badany region z powtórzeniami typu VNTR w szczepie *S. Typhimurium* S005 uległ destabilizacji po XV przesiewie,...” znajdując tym samym odpowiedź, że do rearanżacji genotypu VNTR Sal-175 dochodzi u *S. Typhimurium* znacznie szybciej niż w toku ewolucji.
- Stosowanie w sekcji Dyskusja skrótów myślowych utrudniających zrozumienie tekstu np. „Długość i **intensywność** produktów PCR...” (str. 84). Znając metodykę badań można w prawdzie domyślić się, że doktorantka używając słowa intensywność mogła mieć na myśli poziom luminescencji prążków wynikający ze stężenia fragmentów DNA o określonej długości w uzyskanym produkcie PCR.
- W dyskusji, na str. 85, doktorantka omawiając swoje badania odnosi się do szczepu S183 *S. Virchow*, który „jako jedyny ze wszystkich szczepów, których pochodzenie **było nam znane**, był wyizolowany z tkanki.” Brak zdefiniowania o jaką tkankę chodzi jest tu w sprzeczności ze znanym pochodzeniem szczepu, dlatego wymaga komentarza, bo o tym, że nie jest to prosty błąd edycyjny, świadczy zapis w Tabeli 2. zawierającej informacje o pochodzeniu badanych szczepów, gdzie materiał, z którego wyosobniono szczep S183 określony jest jako „tkanka”. Co więcej, opisując znaczną odmiennność profilu prążków tego szczepu od pozostałych badanych szczepów *S. Virchow*, doktorantka zauważa, że różnica ta nie jest zależna „od **źródła**, z którego wyizolowany był szczep S183.”. Nie jest więc wiadome, czy doktorantka ma na myśli rodzaj materiału klinicznego, z którego szczep wyosobniono (tkanka), czy jednak pojęcie „źródło” w tym zdaniu odnosi się do człowieka (mężczyzny o nieustalonym wieku, jak wynika z Tabeli 2).
- Doktorantka omawiając na str. 86 metodę referencyjną ERIC-PCR stwierdza, że metodę tą charakteryzuje słaba „powtarzalność testu – 78%”, która jej zdaniem nie pozwala ustalić, czy stwierdzone w badaniach „różnice we wzorach prążkowych są rzeczywistymi różnicami na poziomie molekularnym, czy może są artefaktami...”. Ponadto, doktorantka przytacza wyniki badań innych autorów, które świadczą o niskiej przydatności ERIC-PCR do genoserotypowania pałeczek *Salmonella*. W takiej sytuacji, pojawia się pytanie, dlaczego

metodę ERIC-PCR doktorantka określiła w swojej rozprawie jako metodę referencyjną? Czy miała na myśli metodę odniesienia, z którą porównywała wyniki metod ocenianych w swoich badaniach? W dalszej części Dyskusji (str. 87) doktorantka stwierdza, że złotym standardem w dochodzeniach epidemiologicznych jest metoda PFGE i do niej porównuje metodę MLVA, którą uważa za tańszą i łatwiejszą w wykonaniu niż PFGE. Z tego względu rodzi się pytanie, dlaczego w prezentowanej rozprawie nie użyto metody PFGE? Doktorantka tej kwestii nie omawia w Dyskusji ani we wstępie do niniejszej rozprawy, nie podaje argumentacji wskazującej na brak konieczności użycia PFGE w badaniach własnych.

- Omawiając na str. 89 wyniki oceny stabilności markera VNTR Sal-175 w szczepie *S. Typhimurium* poddawanych wielokrotnym pasażom doktorantka przywołała fakt, iż w jednym z dwóch badanych przez nią szczepów *S. Typhimurium*, genotyp markera Sal-175 uległ zmianie po X pasażu, i na tej podstawie napisała „**wywnioskowałam**, że taki jest limit, do którego można wykorzystać w badaniach przesiewane hodowle”. Świadomość możliwości zmian genotypu VNTR w wyniku kolejnych przesiewów w warunkach laboratoryjnych jest, rzeczą ważną w ocenie jakościowej, jednak obiektywne wyznaczanie liczby pasaży (ocena ilościowa), do której genotyp danego markera VNTR można uznać za nie zmieniony w stosunku do genotypu wariantu wyjściowego, wymaga przeprowadzenia odrębnych badań, z użyciem większej liczby szczepów i poddaniu ich pasażowaniu w co najmniej kilku powtórzeniach, gdyż zmiany genotypu VNTR są zjawiskiem występującym z pewnym statystycznym prawdopodobieństwem i do ich oceny wymagany jest reprezentatywny materiał badań oraz użycie metod analiz statystycznych. Recenzent ma podstawy do przekonania, że doktorantka ma świadomość statystycznego charakteru zjawiska mutacji markerów VNTR, gdyż poświęciła ona kwestii oceny stabilności genotypu VNTR blisko dwie strony dyskusji, cytując liczne i adekwatne publikacje, a zwrot „wywnioskowałam” jest tu niefortunną grą słów, a nie wnioskiem w rozumieniu badań naukowych.

III. Ocena struktury rozprawy doktorskiej

Struktura rozprawy jest zasadniczo zgodna z ogólnie przyjętym schematem rozpraw na stopień naukowy doktora, zawiera następujące sekcje: Streszczenie (Abstract); Wprowadzenie, Cel badań; Materiały i metody; Wyniki; Dyskusja; Literatura. Rozdziały i podrozdziały ujęte zostały w spisie treści. Rozprawa zawiera wykaz stosowanych skrótów.


Przedłożona do oceny rozprawa nie zawiera wyszczególnionych wniosków podsumowujących przeprowadzone badania. Wnioski z przeprowadzonych badań stanowią zwyczajowo istotny element struktury rozprawy doktorskiej, który mimo iż nie jest wymagany literą prawa, pełni funkcję zwięzłego, rzeczowego podsumowania pracy. Przy wielowątkowości opisanych w rozprawie badań i wyznaczeniu trzech podstawowych celów badań, brak wyodrębnionych wniosków, zebranych razem, należy uznać za niedopracowanie struktury rozprawy.

W ostatnim akapicie sekcji 6.3.2. pt. „Ocena stabilności genetycznej regionów SENTER oraz STTR” zamykającej sekcję Wyniki (str. 81-82), doktorantka umieściła dywagacje o technicznych i teoretycznych ograniczeniach metody MLVA, które ze względu na ogólnie przyjętą kompozycję rozprawy doktorskiej powinny zostać rozdzielone do sekcji Wstęp (ogólnie znane fakty) i do sekcji Dyskusja (dywagacje związane z uzyskanymi wynikami badań oraz badaniami planowanymi w przyszłości). Zdaniem recenzenta dywagacje te są jednak na tyle ogólne i niezwiązane z tematem rozprawy, że ich pominięcie nie obniżyłoby wartości rozprawy.

IV. Rekomendacje

Według oceny recenzenta, przedłożona rozprawa na stopień naukowy doktora, spełnia wymogi ujęte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r. Nr 65, poz. 595 ze zmianami), co pozwala wnioskować o dopuszczenie pani Mgr Anny Krzyżanowskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa dn. 11.12.2014


.....
dr hab. n. med. Rafał Gierczyński

Lista uwag o charakterze edycyjnym do skorygowania przed upowszechnieniem rozprawy drukiem.

1. Przy opisie materiału badań w streszczeniu i abstrakcie nie podano liczby zbadanych szczepów ogółem jak i dla poszczególnych serotypów. Informacje te należy uzupełnić w formie zapisu (n=X), gdzie X oznacza liczbę szczepów danego srowaru.
2. W sekcji Materiały i metody (str. 44) użyty jest zwrot „żel akrylamidowy”, prawidłowa nazwa to żel poliakrylamidowy.
3. Brak podania wersji programu BioNumerics w sekcji Materiały i metody.
4. W pozycji 13 piśmiennictwa brak roku wydania monografii.
5. Na str. 18 w Tabeli 1 cytowane są dane Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH bez podania źródła lub sposobu ich pozyskania, a określone zostały one jako ogólnodostępne. Co więcej, dane które zawarto w tabeli zebrane zostały z opracowań przygotowywanych przez Zakład Epidemiologii NIZP-PZH w formie biuletynów rocznych „Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce”. W nagłówku Tabeli 1. należy podać nazwę właściwego zakładu NIZP-PZH.
6. Stosowane żargonowe zwroty „przygotowanie stocków glicerynowych” (str. 34) i „mieszając w eppendorfie” (str. 40) należy zastąpić słownictwem ogólnie przyjętym w rozprawach naukowych.
7. Na str. 25 w drugim od góry akapicie, w którym omawiana jest nowa, opracowana w IBM metoda typowania najwyraźniej zgubiono nazwę tej metody, nazwa ta pojawia się dopiero w kolejnym akapicie.
8. Na str. 27 po opisie nowo wykrytego przez IBM markera VNTR Sal-175 dość nieoczekiwanie pojawia się ponownie informacja o epidemiologii zakażeń pałeczkami *Salmonella* w UE i w kraju. Akapit ten pełni rolę swoistego podsumowania i powinien być poprzedzony tytułem podrozdziału.
9. Doktorantka używa parokrotnie liczby mnogiej w odniesieniu do swoich badań, w tym w sekcji wyniki np. „zastosowaliśmy” str. 70, a prezentowana do oceny rozprawa nie stanowi części pracy zbiorowej. Należy zastosować liczbę pojedynczą.
10. Na rysunku 17 (str.74) należy poprawić numerację przesiewów dla szczepu S005.