



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

dr hab. Paweł Stączek, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Molekularnej UŁ

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Kazimierczak pt. „Opracowanie metody diagnostycznej do identyfikacji szczepów *Escherichia coli* patogennych dla drobiu”.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska, została wykonana przez mgr Joannę Kazimierczak w firmie Proteon Pharmaceuticals S.A. w Łodzi, pod kierunkiem prof. dr. hab. Jarosława Dastycha i dr. Dominika Strapagiela, prof. UŁ. Tematyka pracy dotyczy, istotnej z punktu widzenia diagnostyki weterynaryjnej, kwestii prawidłowego różnicowania szczepów w obrębie gatunku *Escherichia coli*, będących narastającą przyczyną chorób ptactwa hodowlanego, prowadzących do dużych strat ekonomicznych w przemyśle drobiarskim.

Pałeczka okrężnicy to jeden z najlepiej scharakteryzowanych drobnoustrojów na Ziemi, zasiedlający różnorodne środowiska dzięki arsenałowi licznych genów, zlokalizowanych w stosunkowo dużych rozmiarów genomie, ale też dużemu zróżnicowaniu genetycznemu. Wśród przedstawicieli tego gatunku znajdujemy szereg komensalnych szczepów, odgrywających istotną rolę w fizjologii dolnego odcinka układu pokarmowego zwierząt stałocieplnych, w tym człowieka, jednakże można też wyróżnić dużą grupę szczepów stanowiących patogeny dla swoich gospodarzy, występujące zarówno w obrębie jelit, jak i pozajelitowo, będące czynnikiem etiologicznym wielu chorób. Zdolność do patogenez i charakter wywołwanego schorzenia jest silnie uzależniony od właściwości poszczególnych szczepów, stąd też opracowano wiele schematów klasyfikacji tych drobnoustrojów, opartych o różnorodne kryteria, m.in. zdolność do wywoływania określonego typu zakażenia, budowę antygenów powierzchniowych, występowanie czynników wirulencji czy pokrewieństwo filogenetyczne. Jednakże duża heterogenność izolatów *E. coli* oraz dualistyczny, komensalny lub patogenny charakter poszczególnych przedstawicieli tego gatunku, powoduje ogromne trudności w wyselekcjonowaniu odpowiednich markerów diagnostycznych, pozwalających na właściwe zaklasyfikowanie badanych szczepów pod kątem ich potencjału chorobotwórczego. Z takim ambitnym zadaniem opracowania nowej metody diagnostycznej, skutecznej w różnicowaniu szczepów *E. coli* wywołujących zakażenia u ptaków (*Avian Pathogenic Escherichia coli* - APEC) zmierzyła się mgr Joanna Kazimierczak. Uważam tę tematykę za niezmiernie interesującą oraz ze wszech miar celową i uzasadnioną, zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska ma formę klasycznej monografii o układzie typowym dla prac eksperymentalnych. Obejmuje 148 stron wydruku, opatrzonego stosownymi rycinami i tabelami, podzielonego na 9 rozdziałów: wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenia w jęz. polskim i angielskim oraz bibliografia.

We wstępie mgr Joanna Kazimierczak przybliżyła problematykę występowania kolibakterioz wywoływanych przez szczepy APEC, zwracając uwagę m.in. na rolę szczepów odzwierzęcych w infekcjach człowieka. Scharakteryzowała też pałeczkę okrężnicy jako czynnik etiologiczny kolibakterioz oraz dokonała przeglądu schematów podziału przedstawicieli tego gatunku ze względu na ich potencjał chorobotwórczy na tzw. patotypy. Następnie skupiła się na opisie czynników wirulencji, jakimi dysponuje ten drobnoustroj (na uznanie zasługuje tutaj zebranie informacji na temat blisko 200 takich czynników i ich tabelaryczne przedstawienie wraz z odnośnikami literaturowymi), serotypów najczęściej występujących w przebiegu ptasich kolibakterioz, czy też obecności genów lekooporności. Wskazała również na mały potencjał diagnostyczny analiz filogenetycznych, czy identyfikacji na poziomie typów sekwencyjnych, jako metod klasyfikujących izolaty do grupy szczepów wirulentnych. Dalsza część wstępu została poświęcona zastosowaniom różnorodnych technik diagnostycznych do identyfikacji szczepów patogennych, ale też profilaktyce i leczeniu kolibakterioz. W podsumowaniu tego rozdziału pracy, Autorka słusznie wskazała na ogromny potencjał diagnostyczny technik opartych o pełnogenomowe sekwencjonowanie, wspartych szerokim udziałem analiz bioinformatycznych, w identyfikowaniu patogennych szczepów *E. coli* wywołujących choroby drobiu, pozwalający na przełamanie trudności wynikających z dużego zróżnicowania genetycznego i fenotypowego tego drobnoustroju.

Jako cel pracy wskazano opracowanie metody diagnostycznej identyfikującej szczepy *E. coli* patogeniczne dla drobiu i wskazano sześć celów cząstkowych, prowadzących do jego osiągnięcia.

Materiały wykorzystywane w pracy zostały przedstawione w przejrzysty sposób, natomiast opis stosowanych metod doświadczalnych i analitycznych pozwala na ich odtworzenie w przyszłości. W obu przypadkach Doktorantka często posiłkowała się ujęciami tabelarycznymi, co znacząco ułatwiało zapoznanie się z prezentowanymi treściami. Całość może świadczyć o opanowaniu przez mgr Joannę Kazimierczak złożonego warsztatu badawczego, który wykorzystwała do realizacji recenzowanej pracy doktorskiej.

Również część wynikowa zawiera dużą liczbę tabel, co na pierwszy rzut oka może nieco zniechęcać czytelnika, uważam jednak, że to dobre rozwiązanie przy przedstawieniu tak wielu danych w tak różnorodnych ujęciach. Obiektem badań było 112 szczepów *E. coli* (ta liczba została później zredukowana do 111 po wykazaniu identyczności dwóch izolatów), które wstępnie zróżnicowano przy pomocy dość rzadko wykorzystywanej, ale wykazującej dużą siłę różnicującą, metody PCR-MP. Pozwoliło to na wygenerowanie dendrogramów i ustalenie w tym zakresie podobieństwa poszczególnych szczepów. Stosując metodę multipleks PCR dokonano typowania badanych szczepów, dzięki czemu można było je przypisać do odpowiednich grup filogenetycznych, pozwalając na wstępne zróżnicowanie izolatów na patogeny i komensale, zgodnie z zaproponowanym w literaturze schematem. Ze względu na wskazany wcześniej przez Doktorantkę fakt niedoskonałości takiego podejścia, badane izolaty poddano pełnogenomowemu sekwencjonowaniu (WGS) i na podstawie uzyskanych danych, stosując przeznaczone do tego narzędzia bioinformatyczne, zaklasyfikowano poszczególne szczepy do serotypów, określono także występowanie genów lekooporności oraz czynników wirulencji. Dzięki temu oznaczono najczęściej występujące serotypy, potwierdzając wcześniejsze obserwacje, że przynależność do określonego serotypu nie jest warunkiem wystarczającym do określenia patogenności szczepu. Również obecność genów lekooporności nie była wskaźnikiem zjadliwości szczepu, gdyż determinanty takie występowały także w genomach szczepów potencjalnie komensalnych. Podobnie, identyfikacja w oparciu o rodzaj i liczbę posiadanych genów kodujących określone czynniki wirulencji, nie pozwoliła na tego typu różnicowanie szczepów.

Wobec faktu, że żadna z zastosowanych metod nie okazała się skuteczna w typowaniu badanej kolekcji szczepów *E. coli*, mgr Joanna Kazimierczak podjęła próbę doświadczalnego

scharakteryzowania patogenności badanych izolatów, wykorzystując test przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu *in ovo*. Pozwoliło to na zweryfikowanie pierwotnej klasyfikacji szczepów jako patogennych i niepatogennych. Posiadając takie informacje, Doktorantka postanowiła dokonać wyboru reprezentatywnej grupy genów, które pozwoliłyby na skuteczne różnicowanie szczepów APEC. W tym celu posłużyła się testem Fisher'a, pozwalającym na weryfikację hipotezy zerowej, zakładającej, że dany gen występuje z taką samą częstością w grupie szczepów patogennych i niepatogennych. Pozwoliło to na wytypowanie puli genów, których częstość występowania różniła się na wysokim poziomie istotności statystycznej pomiędzy obiema grupami szczepów. Na te wyniki nałożono także analizę częstości występowania poszczególnych serotypów w obrębie badanej puli szczepów, co dodatkowo zwiększyło potencjał różnicujący. W następnym etapie przeprowadzono weryfikację skuteczności modeli predykcyjnych, wykorzystujących różnorodne kombinacje wybranych 11 czynników wirulencji i oznaczając dla każdego z nich parametry takie jak czułość, specyficzność, dokładność, wartość predykcyjna dodatnia oraz ujemna, a także dokonując analizy matematycznej uzyskanych wyników w oparciu o opracowany algorytm, pozwalający na wyznaczenie krzywej umożliwiającej ocenę zależności pomiędzy czułością a specyficznością poszczególnych modeli. Dzięki zastosowaniu tak kompleksowego podejścia, możliwe było wytypowanie kombinacji trzech genów – *iroC*, *hlyF* i *wzx*, których obecność bądź brak pozwalała wnioskować o przynależności badanego izolatu do grupy patogenów bądź komensali. Na uwagę zasługuje fakt, że model predykcyjny oparty o tę kombinację genów charakteryzował się wysoką czułością (98,8%) oraz równie wysokimi wartościami dokładności oraz dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej (92-93%), przy nieco niższej specyficzności, osiągającej 63%. W oparciu o tak dokonany wybór, zaprojektowano startery do reakcji multiplex PCR, służącej wykrywaniu obecności wytypowanych trzech genów i uzyskano 100% potwierdzenie eksperymentalne identyfikacji dokonanej z zastosowaniem modelowania predykcyjnego.

W rozdziale „Dyskusja” mgr Joanna Kazimierzczak w dojrzały i wyważony sposób zestawiała uzyskane przez siebie wyniki z aktualnym stanem wiedzy, przedstawionym w dostępnej literaturze naukowej. Pozwoliło to Doktorantce na wyciągnięcie ośmiu w pełni uzasadnionych wniosków końcowych. Co istotne, wskazała też na konieczność dalszej walidacji opracowanego testu, co dobrze świadczy o Jej krytycznym podejściu, przydatnym w opracowywaniu rezultatów własnych badań. Zamieszczone streszczenia w języku polskim i angielskim w dobrym stopniu oddają najistotniejsze treści pracy. Rozprawę zamyka spis 85 pozycji bibliograficznych obejmujący właściwe dla omawianej tematyki publikacje naukowe, w większości anglojęzyczne pochodzące z ostatniej dekady, natomiast w przypadku prac dawniejszych, ich wykorzystanie znajduje uzasadnienie w historycznym charakterze zawartych w nich danych.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została napisana poprawnym językiem naukowym, przedstawiając w sposób klarowny i rzeczowy zarówno podstawy teoretyczne problematyki badawczej, jak i uzyskane wyniki oraz przemyślenia Autorki na ich temat, w zestawieniu z aktualnymi danymi literaturowymi. Doświadczenia zaplanowano w logiczny sposób i wykonano je w oparciu o dobrze dobrany zestaw metod badawczych, co umożliwiło opracowanie oryginalnego schematu diagnostycznego, opartego na teście multiplex PCR, różnicującego szczepy patogene od niepatogennych w obrębie izolatów *E. coli* występujących u drobiu. Biorąc pod uwagę ogromne doświadczenie Promotora w komercyjnym wdrażaniu różnego rodzaju produktów biotechnologicznych, mam nadzieję, że po przeprowadzeniu pełnej walidacji przedstawionego testu, uda się go z powodzeniem wprowadzić do praktyki weterynaryjnej.

Z obowiązku recenzenta, chciałbym zwrócić uwagę na kilka sformułowań i zagadnień, które wzbudziły moje drobne wątpliwości. Z lektury rozprawy doktorskiej można odnieść wrażenie, że termin kolibakterioza odnosi się wyłącznie do chorób ptaków, tymczasem wydaje mi się, że jest on stosowany do określenia schorzeń różnych zwierząt, dla których czynnikiem etiologicznym jest pałeczka okrężnicy. Podobnie, nazwa patotypu APEC jest w pracy często rozwijana jako patogene szczepy

E. coli wywołujące choroby drobiu, a nie ogólnie ptaków. Oczywiście zdaję sobie sprawę z przedmiotu badań Doktorantki, jednakże w przypadku stosowania ustalonej terminologii zalecałbym większą precyzję. Poziom edytorski pracy uważam generalnie za wysoki, choć znalazłem niewielkie niedociągnięcia stylistyczne (np. analizy porównawcze zsekwencjonowanych genomów... charakteryzują się brakiem obecności... genów wirulencji – str. 32), niektóre ryciny stałyby się bardziej informatywne gdyby zostały opatrzone stosownymi legendami (np. Rys. 3, Rys. 7), warto też konsekwentnie używać raz przyjętej terminologii w całej pracy, tymczasem we wstępie pojawia się termin „tetraplex PCR”, tymczasem w wynikach używana jest wobec tej metody nazwa „kwadruplex PCR”. Mam też drobne zastrzeżenia do organizacji części teoretycznej, gdzie fragmenty dotyczące zakażeń drobiu mieszają się z informacjami na temat szeroko pojętych infekcji szczepami *E. coli*. Jednak te uwagi natury redakcyjnej w żadnym stopniu nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej rozprawy.

Biorąc pod uwagę tematykę poruszaną w pracy doktorskiej, chciałbym prosić mgr Joannę Kazimierczak o przedstawienie swojej opinii w kwestii kwalifikowania genów lekooporności do grupy czynników wirulencji drobnoustrojów. W wielu publikacjach można znaleźć informację, że determinanty lekoopornościowe są czynnikami zjadliwości, tymczasem w innych (przykładem jest także niniejsza rozprawa doktorska), wskazuje się, że również szczepy niezjadliwe dysponują tego rodzaju arsenalem. Z kolei w odniesieniu do informacji podanej na str. 14, dotyczącej zintensyfikowania w ostatnich latach użycia antybiotyków w hodowli zwierząt rolnych, chciałbym spytać Doktorantkę, czy ma jakąś wiedzę na temat realnego poziomu stosowania antybiotyków jako stymulatorów wzrostu w hodowli drobiu na terenie Unii Europejskiej, bądź przynajmniej w Polsce. O ile pamiętam, w pierwszej dekadzie XXI wieku wprowadzono pewne ograniczenia w tym zakresie na terenie UE, ograniczając wykorzystanie antybiotyków jedynie do celów terapeutycznych. Jednocześnie zdaję sobie sprawę, że obecność określonych przepisów, nie musi iść w parze z faktycznym poziomem zużycia antybiotyków w rolnictwie. Prosiłbym też o wyjaśnienie, czy podczas stosowania techniki PCR-MP prowadzono optymalizację etapu denaturacji. Liczba uzyskanych amplikonów w tej metodzie jest bowiem zależna od subtelnych różnic w temperaturze denaturacji DNA i z reguły wymaga starannego doboru, tymczasem w opisie nie znalazłem takiej informacji. Ciekaw również jestem, czy Doktorantka prowadzi jakieś działania celem przedstawienia zamieszczonych wyników na szerszym forum naukowym, bądź też, być może, planowane są jakieś formy ochrony patentowej?

Wniosek końcowy

Przesłana mi do recenzji praca spełnia, w świetle obecnie obowiązujących przepisów, wszelkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Joanny Kazimierczak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



dr hab. Paweł Stączek, prof. UŁ