



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Dr hab. Dorota Wojnicz  
Katedra i Zakład Biologii  
i Parazytologii Lekarskiej  
Uniwersytetu Medycznego  
we Wrocławiu

Wrocław, 13.06.2019

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Doroty Morki

pt. „**Identification, genotype and virulotype analysis of *Yersinia* sp. isolated from humans, domestic and wild-living animals**”

wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii  
pod kierunkiem promotora dr hab. Gabrieli Bugli-Płoskońskiej, prof. UW  
oraz promotora pomocniczego dr inż. Ewy Wałęckiej-Zacharskiej

Podstawą formalną do wykonania niniejszej recenzji jest Uchwała nr 3/2019 Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 24 stycznia 2019 r.

### Tematyka pracy

Jersinioza wywoływana przez pałeczki *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* jest jedną z chorób odzwierzęcych podlegających zarówno w Polsce jak i w Europie obowiązkowej rejestracji. Drobnoustroje te są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, występują zarówno u zwierząt domowych jak i dzikich, a także w wodzie i glebie. Za najczęstszą przyczynę zarażenia uznaje się spożycie surowej lub niedogotowanej wieprzowiny, zanieczyszczonej odchodami zakażonych zwierząt wody, mleka lub jego przetworów.

Szczepy *Y. enterocolitica* podzielono na sześć biotypów: 1A, 1B, 2, 3, 4 i 5 na podstawie określonych cech biochemicznych. Za najbardziej patogenne dla ludzi uważa się szczepy należące do biotypu 1B, za średnio chorobotwórcze szczepy biotypów 2 – 5, niepatogenne szczepy przynależące do biotypu 1A. Na podstawie antygenu somatycznego O wśród pałeczek *Y. enterocolitica* wyróżniono kilkadziesiąt grup serologicznych. Szczepy, które są

najczęściej izolowane od człowieka należą do bioserotypu 4/O:3, 2/O:5,27, 3/O:5,27, 1B/O:8 i 2/O:9. Określenie patogennego potencjału szczepów *Y. enterocolitica* opiera się na wykrywaniu plazmidowych i chromosomowych markerów zjadliwości odgrywających istotną rolę w inwazyjności tych bakterii. Obecność tych markerów jest szczególnie ważna w przypadku szczepów należących do biotypu 1A, powszechnie uznawanych za niechorobotwórcze, a jak wynika z literatury coraz częściej izolowanych z klinicznych przypadków jersiniozy u ludzi.

Epidemiologia zakażeń *Y. enterocolitica* jest złożona. Wiadomym jest, że głównym rezerwuarem szczepów patogennych dla ludzi są świnie. Warto jednak podkreślić, że gryzonie mogą przyczyniać się do szybkiego rozprzestrzeniania pałeczek w środowisku naturalnym, w tym na zwierzęta wolno żyjące, np. dziki, sarny. Niestety w literaturze naukowej niewiele jest artykułów poświęconych ocenie rozprzestrzenienia szczepów *Y. enterocolitica* w populacji dzikich zwierząt, a także ich charakterystyce biochemicznej czy genotypowej, dlatego uważam, że recenzowana przeze mnie praca stanowi cenne uzupełnienie tego tematu.

Podjęty przez Doktorantkę temat badań dotyczący identyfikacji, analizy genotypowej i wirulotypowej szczepów *Yersinia* sp. pochodzących od ludzi oraz zwierząt domowych i dzikich jest w pełni uzasadniony i aktualny.

### **Ocena formalnej strony pracy**

Rozprawa ma układ powszechnie stosowany w pracach doświadczalnych, typowy dla rozprawy doktorskiej i zawiera 130 stron maszynopisu, w tym 37 rycin i 15 tabel, 179 pozycji piśmiennictwa oraz wykaz stosowanych skrótów. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje dziesięć rozdziałów: (i) Wprowadzenie, (ii) Cele badań, (iii) Materiały i metody, (iv) Wyniki, (v) Dyskusję, (vi) Wnioski, (vii) Streszczenie w języku angielskim, (viii) Streszczenie w języku polskim, (ix) Materiały uzupełniające oraz (x) Bibliografię. Szata graficzna pracy jest bardzo staranna i przejrzysta.

### **Ocena merytoryczna pracy**

W rozdziale **Wprowadzenie** Doktorantka dokonała wprowadzenia w problematykę pracy, uzasadniła istotę i znaczenie podjętych badań. Autorka przedstawiła klasyfikację bakterii z rodzaju *Yersinia*, biochemiczną charakterystykę jednego z gatunków – *Y. enterocolitica* oraz opisała szczegółowo warunki wzrostu tych drobnoustrojów. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka zwróciła również uwagę na trzy inne gatunki *Y. kristensenii*, *Y. pekkanenii* oraz *Y. frederiksenii* określane jako *Y. enterocolitica* – podobne,

które są co prawda potencjalnie niepatogenne dla człowieka, ale ze względu na to, że nieznacznie różnią się właściwościami biochemicznymi od *Y. enterocolitica* mogą zostać błędnie zidentyfikowane. W następnym podrozdziale Autorka szeroko przedstawiła patogenne działanie *Y. enterocolitica* w organizmie człowieka. Podkreśliła także, że obecność genów *yadA* i *ail* kodujących adhezyny może warunkować oporność tych bakterii na surowicę. Stąd w kolejnej części przedstawiła rolę białek układu dopełniacza (komplementu) w walce z patogenami, a następnie opisała relację pomiędzy pałeczkami *Y. enterocolitica* i dopełniaczem. Doktorantka szczegółowo przedstawiła oddziaływania pomiędzy adhezyną YadA i białkiem wiążącym regulator dopełniacza C4 (C4bp) oraz osoczym czynnikiem H, które w efekcie chronią pałeczki przed aktywacją komplementu na drodze klasycznej, lektynowej i alternatywnej. Zwróciła też uwagę na istotną rolę białka Ail, poriny OmpC i lipopolisacharydu w działaniu białek dopełniacza. W dalszej części Wprowadzenia Autorka przedstawiła dane epidemiologiczne jersiniozy w krajach Unii Europejskiej i w Polsce, a także podkreśliła znaczącą rolę świń domowych i dzików w rozprzestrzenianiu tej choroby. Kolejny podrozdział poświęcony został izolacji i identyfikacji szczepów *Y. enterocolitica* z wykorzystaniem rutynowych metod mikrobiologicznych opartych na cechach fenotypowych i biochemicznych, a także na bardziej zaawansowanych technikach: molekularnych czy tych wykorzystujących spektrofotometrię mas (MALDI-TOF MS). W ostatniej części Doktorantka scharakteryzowała metody wykorzystywane w genotypowaniu bakterii (m.in. PFGE-CHEF, MLVA) oraz wyjaśniła ich zastosowanie w przypadku szczepów *Y. enterocolitica* izolowanych z różnych źródeł. Podsumowując rozdział Wprowadzenie został przygotowany bardzo starannie, opiera się na właściwie wybranych i omówionych publikacjach. Bez wątpienia, część teoretyczna dysertacji prezentuje bardzo dobry poziom merytoryczny i świadczy o znakomitej znajomości zagadnień związanych z tematem rozprawy.

**Cele pracy** zamieszczone w kolejnym rozdziale zostały sformułowane prawidłowo, a przedstawiona koncepcja ich rozwiązania jest klarowna i nie budzi zastrzeżeń recenzenta.

Rozdział **Materiały i metody** zawiera szczegółowy opis metod, którymi Doktorantka posłużyła się w celu realizacji części empirycznej pracy. Opisy przeprowadzonych eksperymentów są bardzo precyzyjne i z całą pewnością pozwalają na ich odtworzenie. Dobór metod jest trafny, a szeroki zakres badań świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu warsztatowym Doktorantki.

Kolejny rozdział rozprawy zatytułowany **Wyniki**, który podzielono na podrozdziały, został napisany z dbałością o jasność oraz precyzję poszczególnych etapów i kolejno

uzyskiwanych wyników. Na pochwałę zasługuje bardzo czytelna i staranna dokumentacja wyników w postaci tabel, rycin i fotografii, która ułatwiła ich interpretację. Bardzo pozytywnie oceniam również przedstawienie przez Doktorantkę krótkich podsumowań po kilku tematycznie związanych ze sobą podrozdziałach. Do najważniejszych wyników otrzymanych przez Doktorantkę można zaliczyć:

1. Określenie występowania szczepów *Yersinia* sp. wśród dzików (1.6%), saren europejskich (1.1%), świń domowych (16.9%) oraz ludzi (1.0%) w zachodniej Polsce w latach 2014-2018.
2. Potwierdzenie konieczności stosowania kilku metod celem identyfikacji szczepów *Yersinia* sp. pochodzenia zwierzęcego.
3. Wykazanie dominacji patogennego bioserotyp 4/O:3 wśród izolatów pozyskanych od ludzi oraz świń domowych.
4. Oznaczenie 20 wirulotypów wśród zidentyfikowanych pałeczek *Yersinia* sp. i wskazanie, że najpowszechniej występującymi genami wirulencji były *ymoA*, *ureC*, *inv*, *myfA* i *yst*, których produkty są odpowiedzialne za wytwarzanie toksyn oraz regulację ekspresji czynników chorobotwórczości, a także umożliwienie inwazji enterocytów i kolonizacji jelit.
5. Wykazanie podobnych typów wirulencji pałeczek *Yersinia* sp. izolowanych od ludzi, świń domowych i psów, co może wskazywać na rozprzestrzenianie się tych drobnoustrojów pomiędzy tymi trzema gospodarzami.
6. Zaobserwowanie korelacji bioserotyp – wirulotyp szczególnie wśród izolatów *Y. enterocolitica* pochodzących od świń domowych (4/O:3).
7. Odnotowanie tendencji klasteryzacji szczególnie wśród szczepów wyizolowanych od świń domowych i należących do bioserotypu 4/O:3.
8. Wskazanie, że szczepy wyizolowane od świń domowych oraz ludzi tworzyły najbardziej spokrewnioną grupę, cechującą się 80% podobieństwem genetycznym.
9. Wykazanie, że szczepy *Yersinia* sp. pochodzące od dzików charakteryzowały się dużą różnorodnością genetyczną w przeciwieństwie do izolatów pochodzących od świń domowych, co wskazuje na mało prawdopodobną transmisję pałeczek między tymi gospodarzami.

10. Zaobserwowanie korelacji pomiędzy obecnością genów *yadA* i *ail* w komórkach *Yersinia* sp., a ich opornością na surowicę ludzką.
11. Pośrednie potwierdzenie roli białek Ail, YadA i OmpC w nadawaniu bakteriom oporności na działanie surowicy ze względu na to, że ekspresja genów *ail*, *yadA*, *ompC* była wyższa po inkubacji bakterii w surowicy aktywnej niż w surowicy inaktywowanej przynajmniej w jednym punkcie pomiarowym.

Biorąc pod uwagę dużą ilość uzyskanych wyników o wysokiej wartości poznawczej kolejny rozdział **Dyskusja** wymagał od Doktorantki szczególnego opracowania. Uważam, że Dyskusja została przeprowadzona w sposób dojrzały. Autorka odniosła się do wszystkich etapów badań zamieszczonych w pracy. Szczegółowo zinterpretowała otrzymane wyniki i przedstawiła je na tle rezultatów opublikowanych w literaturze krajowej i zagranicznej. W oparciu o dokonany przegląd najnowszej literatury Doktorantka bardzo przekonująco i rzeczowo dowiodła trafności i aktualności podjętego przez siebie tematu badań.

**Wnioski** wynikające z analizy wyników badań eksperymentalnych i syntetyczne podsumowanie uzyskanych rezultatów przedstawiono w kolejnym rozdziale. Doktorantka zamieściła w nim 13 dobrze sformułowanych konkluzji, które w pełni odpowiadają postawionym celom badawczym.

**Bibliografia** obejmuje zbiór 179 pozycji, w którym znalazły się również 4 publikacje Doktorantki (w trzech występuje jako pierwszy autor, w jednej jako współautor). Można więc sądzić, że zdobyte przez Doktorantkę rozeznanie w tematyce rozprawy jest wystarczająco rozległe i obejmuje najnowszy stan wiedzy.

### **Ocena wyników naukowych**

Przedstawione wyniki badań eksperymentalnych dowodzą, że postawione przez Doktorantkę w pracy cele zostały zrealizowane. Liczne fragmenty rozprawy mają oryginalny charakter, co potwierdza umiejętność zaplanowania i wykonania przez Doktorantkę zadań doświadczalnych. Udokumentowaniem rezultatów są zamieszczone w pracy liczne zestawienia tabelaryczne, ryciny oraz zdjęcia. Bez wątpienia do zalet pracy należą praktyczne aspekty uzyskanych wyników, które mogą mieć dużą wartość użytkową.

### **Uwagi szczegółowe**

Na podstawie wnikliwej analizy pracy mogę stwierdzić, że nie nasuwają się zasadnicze uwagi krytyczne o charakterze merytorycznym. Z obowiązku recenzenta należy wymienić drobne uchybienia zauważone podczas lektury niniejszej rozprawy, takie jak:

1. Str. 22, Doktorantka napisała, że białko Ail ułatwia wiązanie oraz inwazję *Y. enterocolitica* do komórek nabłonkowych, a także chroni komórki bakteryjne przed bakteriobójczą aktywnością dopełniacza poprzez wiązanie z czynnikiem H i C4bp. Następne zdanie o treści: „Dzieje się tak, ponieważ antygen O, komponent LPS, maskuje Ail na błonie zewnętrznej” jest dla recenzenta niejasne w kontekście poprzedniej informacji.
2. Str. 50, Doktorantka odnosząc się w tekście do tabeli 12 informuje, że wśród 51 izolatów 47 zostało oznaczone jako *Y. enterocolitica*, 2 jako *Y. kristensenii*, 1 jako *Y. frederiksenii* i 1 jako *Y. pekkanenii*. Informacja ta jest błędna, ponieważ jak wynika z danych zawartych w tabeli 12, 50 szczepów zostało zidentyfikowanych jako *Y. enterocolitica*, a tylko 1 jako *Y. frederiksenii*.
3. Str. 60, Doktorantka napisała, że na rycinach 9-13 przedstawiono produkt amplifikacji każdego powtórzenia tandemowego o zmiennej liczbie. Nie jest to jednak zgodne z prawdą, bowiem wyniki te zostały zaprezentowane na rycinach 10-14.
4. Ryciny 18 i 19 są tak samo zatytułowane, zatem można byłoby połączyć je w jedną, zawierającą sześć wykresów.
5. Rycina 20 przedstawiająca wyniki bakteriobójczego działania surowicy wobec 12 szczepów pochodzących od dzików jest słabo czytelna. Pokazanie rezultatów na jednej rycinie, która zawierałaby dwa wykresy (A, B), zwiększyłoby ich czytelność.
6. Tabela 11 przedstawia wyniki podobieństwa sekwencji genu *ail* szczepu 205dz z innymi testowanymi szczepami *Y. enterocolitica* oraz sekwencjami tego genu zdeponowanymi w bazie GenBank. Wyniki te można byłoby ułożyć w tabeli od wartości największych do najmniejszych.
7. W tabeli 11 największa wartość to 100%, dlaczego więc Doktorantka w tekście napisała, że podobieństwo wynosiło od 96 do 99.7%?
8. W tekście rozprawy w niektórych miejscach pojawiły się błędnie napisane wyrazy (str. 24 jest *acording*, powinno być *according*; str. 31 jest *voivodship*, powinno być *voivodeship*; str. 67 jest *strains was*, powinno być *strains were*; str. 67 jest *distiguated*, powinno być *distinguished*; str. 82 jest *are align with*, powinno być *are aligned with*; str. 88 i 89 *Fredriksson-Ahoma et al. has*, powinno być *Fredriksson-Ahoma et al. have*; str. 90 jest *of this results*, powinno być *of these results*; str. 92 jest *this findings*, powinno być *these findings*; str. 93 jest *others genes*, powinno być *other genes*; str. 93 jest *wihin*,

powinno być within; str. 94 jest thalaseмии, powinno być thalasseмии; str. 96 jest Platt-Samoraj et al. has, powinno być Platt-Samoraj et al. have; str. 96 jest effecting, powinno być affecting; str. 98 jest identifiacion, powinno być identification; str. 99 jest additonal, powinno być additional)

Te drobne uwagi nie zmieniają jednak mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy. Są one jedynie wskazówkami do ewentualnych poprawek, jeżeli Autorka zamierza opublikować wyniki swojej pracy.

### **Wniosek końcowy**

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że w opiniowanej rozprawie doktorskiej pt.: „Identification, genotype and virulotype analysis of *Yersinia* sp. isolated from humans, domestic and wild-living animals” mgr Katarzyna Dorota Morka posługując się dobrze dobranymi, nowoczesnymi technikami eksperymentalnymi rozwiązała postawione cele badawcze, wykazała się szeroką wiedzą naukową oraz umiejętnościami wymaganymi dla uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych. Stwierdzam, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązujące przepisy i w związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Doroty Morki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy ze względu na nowatorski charakter tematyki przeprowadzonych badań oraz dużą wartość naukową uzyskanych wyników.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Wydział Lekarski  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII  
I PARAZYTOLOGII LEKARSKIEJ  
adiunkt  
Dorota Wojnicz  
dr hab. Dorota Wojnicz