

prof. dr hab. Jacek Bania,
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ LEK. WET. MAGDALENY ŁOPATEK
z tytułu pracy „Występowanie *Vibrio parahaemolyticus* w żywności pochodzenia morskiego i charakterystyka wyizolowanych szczepów”, wykonanej w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-PIB w Puławach pod opieką prof. dr hab. Jacka Oska jako promotora oraz dr hab. Kingi Wieczorek, prof., nadzw. jako promotora pomocniczego.

Bakterie z gatunku *Vibrio parahaemolyticus* odgrywają istotną rolę w patogenezie zatruc pokarmowych, których źródłem są owoce morza i morskie ryby. Badania ostatnich lat wskazują na wzrost liczby zachorowań wywołanych przez *V. parahaemolyticus* w krajach azjatyckich i w USA. W Polsce zachorowania z udziałem *V. parahaemolyticus* nie były dotąd notowane, jednak nie można lekceważyć możliwości wystąpienia takich przypadków choćby z uwagi na to, iż są one notowane w innych krajach europejskich, a dostępność i spożycie owoców morza w Polsce stale wzrasta.

Badania przeprowadzone przez lek. wet. Magdalenę Łopatek w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-PIB w Puławach pozwoliły na oszacowanie zagrożenia związanego z występowaniem *V. parahaemolyticus* obecnego w żywności pochodzenia morskiego oferowanego w Polsce.

We wstępie pracy lek. wet. Magdalena Łopatek przedstawia charakterystykę bakterii *V. parahaemolyticus*, omawiając jej występowanie w środowisku morskim oraz możliwości transmisji do żywności. Scharakteryzowana została patogeneza zatruc pokarmowych z udziałem *V. parahaemolyticus* oraz występowanie tych zatruc w Europie i w świecie. Wyczerpująco omówiono czynniki wirulencji *V. parahaemolyticus*, metody identyfikacji gatunkowej *V. parahaemolyticus* oraz zarówno biochemicznej jak i molekularnej charakterystyki izolatów tego gatunku. We wstępie mogłaby znaleźć się zwięzła informacja na temat struktury chromosomu *Vibrio*, o którym wiadomo, że zawiera dwie koliste cząsteczki DNA. Informacja na ten temat pojawia się w opisie systemu sekrecji typu III oraz

w tabeli 2 i nie jest rozwijana. Mocną stroną tej części pracy jest wyczerpujący opis metod identyfikacji gatunkowej *V. parahaemolyticus* oraz typizacji izolatów w obrębie tego gatunku.

W opisie celów pracy oprócz oceny występowania *V. parahaemolyticus*, określenia potencjału chorobotwórczego i wrażliwości izolatów na środki przeciwbakteryjne oraz badania genetycznego pokrewieństwa izolatów, podano opracowanie testów PCR do wykrywania i identyfikacji *V. parahaemolyticus*. Nie wyszczególniono jednak na czym miało polegać opracowanie testów PCR, gdyż sekwencje starterów do identyfikacji izolatów *V. parahaemolyticus* oraz starterów do detekcji czynników wirulencji podano zgodnie z cytowanymi danymi literatury. Jeśli dokonywano optymalizacji warunków reakcji to należałoby podać zakresy parametrów w jakich dokonano optymalizacji. Pisząc o PCR nie trzeba dodawać określenia „reakcja”, gdyż skrót już to określenie zawiera.

Metodyka została dobrze zaplanowana i opisana adekwatnie do założonego planu badań. Opis zastosowanych metod i planu badań obrazuje dobry poziom badań zrealizowanych przez Doktorantkę.

W części doświadczalnej pracy lek. wet. Magdalena Łopatek wyosobniła 113 izolatów z 595 próbek żywności i na podstawie testów biochemicznych zaliczyła je do gatunku *V. parahaemolyticus*. Jednak badanie z użyciem gatunkowo specyficznych starterów w PCR wykazało, iż część izolatów nie może być zaliczona do gatunku *V. parahaemolyticus*. Ostatecznie 104 izolaty zostały zidentyfikowane jako *V. parahaemolyticus* i te izolaty poddano charakterystyce. Lek. wet. Magdalena Łopatek zidentyfikowała 3 oraz 11 izolatów posiadających odpowiednio geny hemolizyn *tdh* oraz *trh*. We wszystkich 11 izolatach posiadających gen hemolizyny TRH zidentyfikowano jednocześnie gen *ureR*, kodujący ureazę. Jednak produkcję ureazy stwierdzono w 12 izolatach *V. parahaemolyticus*. Aktywność proteolityczną stwierdzono we wszystkich izolatach *V. parahaemolyticus*. Proteaza A została wymieniona we wstępie jako czynnik wirulencji, choć nie opisano jej roli w patogenezie zatruc *V. parahaemolyticus*. Ureaza jako czynnik wirulencji *V. parahaemolyticus* wspomniana jest dopiero w dyskusji, lecz brak informacji o jej roli.

Oceniono wrażliwość izolatów *V. parahaemolyticus* na wybrane substancje antymikrobiologiczne stwierdzając oporność na przynajmniej jedną substancję u 91 izolatów, a na wszystkie testowane substancje u 13 izolatów *V. parahaemolyticus*.

Doktorantka oceniła również zróżnicowanie genetyczne kolekcji izolatów *V. parahaemolyticus*. W tym celu zastosowała dwie metody, dzięki którym można uzyskiwać

bardzo stabilne i powtarzalne wyniki, tj. makrorestrykcję genomu połączoną z rozdziałem uzyskanych fragmentów w PFGE oraz MLST polegającej na analizie sekwencji fragmentów siedmiu stabilnych genetycznie loci w obrębie genomu *V. parahaemolyticus*. Wyniki genotypowania zanalizowano i przedstawiono w formie dendrogramów obrazujących stopień podobieństwa izolatów. Opisano dokładnie sposób konstrukcji dendrogramu obrazującego wyniki PFGE, nie podano jednak w jaki sposób stworzono dendrogram typów ST oraz minimum spanning tree.

Na wyróżnienie zasługuje fakt, iż część wyników pracy została opublikowana w dobrym czasopiśmie z zakresu mikrobiologii żywności - *Journal of Food Protection*.

Podkreślić należy, iż wszystkie wyniki zostały przedstawione w jasny i czytelny sposób, co zilustrowano przejrzystymi tabelami, rycinami oraz zdjęciami.

Obszerna dyskusja wyników zawiera trafne stwierdzenia i komentarze. Doktorantka wyczerpująco omawia wyniki pracy odwołując się do literatury przedmiotu.

Komentarze zawarte w tej recenzji w żadnym stopniu nie umniejszają wysokiej merytorycznej wartości wyników uzyskanych przez lek. wet. Magdalenę Łopatek. Na uwagę zasługuje ogrom pracy poświęconej na realizację i opisanie ocenianej dysertacji. Za jej znaczące osiągnięcia uważam ocenę poziomu zanieczyszczenia produktów żywności dostępnych w Polsce bakteriami *V. parahaemolyticus* oraz wskazanie rodzaju produktów wśród których poziom zanieczyszczenia tymi bakteriami może być wysoki.

Stwierdzam, że praca doktorska lek. wet. Magdaleny Łopatek spełnia wszelkie warunki stawiane rozprawom doktorskim, w tym określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki. Dlatego też przedkładałam Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Magdaleny Łopatek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 20 kwietnia 2017 r.

