

Warszawa, dnia 2.05.2017 r.

Prof. dr hab. Jacek Szczawiński  
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Łopatek  
"Występowanie *Vibrio parahaemolyticus* w żywności pochodzenia morskiego  
i charakterystyka wyizolowanych szczepów"  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Oska (promotor) oraz dr hab.  
Kingi Wieczorek (promotor pomocniczy) w Zakładzie Higieny Żywności  
Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-PIB w Puławach**

Podstawą formalną wykonania recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 26.06.2013 r. w sprawie powołania recenzentów oraz skierowane do mnie pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej PIWet-PIB w Puławach – prof. dr hab. Dariusza Bednarka (numer pisma BRN-410/5/17) z prośbą o recenzję rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma objętość 114 stron. Na początku rozprawy Autorka zamieściła stronę tytułową, podziękowania dla osób, które przyczyniły się do powstania pracy, informację o źródle finansowania badań, wykaz artykułów i doniesień w których wykorzystana została część wyników, spis treści, wykaz używanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, po których następują kolejne rozdziały rozprawy doktorskiej, tj. wstęp, cele badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo. Na końcu pracy Autorka zamieściła aneks, w którym podała skład pożywek używanych w badaniach, przygotowanych przez Zakład Pożywek PIWet-PIB. Rozprawa została wydrukowana czytelnym drukiem wysokiej jakości i bardzo estetycznie oprawiona.

Do niedawna *Vibrio parahaemolyticus* wydawał się drobnoustrojem egzotycznym, który nie stanowi zagrożenia dla mieszkańców Polski, ponieważ

wywołuje zatrucia pokarmowe w Japonii i innych dalekich krajach azjatyckich. W ostatnich latach doszło do zmian, które stawiają znaczenie *Vibrio parahaemolyticus* dla bezpieczeństwa żywności w naszym kraju w zupełnie innym świetle. W wyniku poprawy sytuacji ekonomicznej Polski i wzrostu obrotów w handlu międzynarodowym na polski rynek trafia coraz więcej owoców morza z importu, między innymi z Bangladeszu, Indii i Wietnamu, a także z USA, Tajlandii i Indonezji.

Na naszym rynku obecne są również ostrygi, omułki, ryby i inne owoce morza z różnych krajów europejskich, w których wodach morskich coraz częściej pojawia się *Vibrio parahaemolyticus*, co tłumaczy się wzrostem temperatury mórz i oceanów związanym z globalnym ocieplaniem się klimatu. W krajach europejskich o wysokim spożyciu owoców morza, szczególnie mięczaków konsumowanych bez obróbki termicznej, wyraźnie wzrasta liczba zatruc pokarmowych na tle *Vibrio parahaemolyticus*.

W Rozporządzeniu Komisji (WE) Nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych przytoczona jest opinia SCVPH (Sub-Committee on Veterinary Public Health) na temat *Vibrio vulnificus* i *Vibrio parahaemolyticus*. W opinii stwierdzono, że dostępne obecnie dane naukowe nie dają podstaw do ustalenia szczegółowych kryteriów dla bakterii chorobotwórczych *V. vulnificus* i *V. parahaemolyticus* dla żywności pochodzenia morskiego. Zaleca się stworzenie kodeksu postępowania dla zapewnienia stosowania dobrej praktyki higienicznej oraz opracowania rzetelnych metod w odniesieniu do zagrożeń mikrobiologicznych związanych z *Vibrio parahaemolyticus*. Badania podjęte przez Panią Magdalenę Łopatek wychodzą naprzeciw tym oczekiwaniom. Temat ocenianej pracy doktorskiej jest zatem bardzo aktualny i istotny dla higieny żywności pochodzenia zwierzęcego oraz ochrony zdrowia publicznego.

Rozdział „Wstęp” obejmuje 19 stron tekstu. Autorka podaje w nim kolejno informacje dotyczące charakterystyki, występowania, zakażeń pokarmowych i chorobotwórczości dla człowieka *Vibrio parahaemolyticus* oraz szczegółowo omawia metody identyfikacji i typowania tego mikroorganizmu.

Podany we wprowadzeniu przegląd piśmiennictwa oraz jego zestawienie wskazują, że Autorka posiada rozległą wiedzę ogólną na temat *Vibrio parahaemolyticus* oraz imponującą wiedzę specjalistyczną w zakresie najnowszych, złożonych metod diagnostycznych umożliwiających identyfikację badanego drobnoustroju oraz jego typowanie z wykorzystaniem metod biochemicznych, serologicznych i genotypowych, takich jak hybrydyzacja, PCR i analizy makrorestrikcyjne z użyciem PFGE. Cytowane we wstępie publikacje są ściśle związane z tematem. Większość z nich stanowią oryginalne prace z ostatnich lat, opublikowane w języku angielskim w renomowanych czasopismach.

Podane we wstępie informacje są nie tylko aktualne i interesujące pod względem merytorycznym, ale też właściwie usystematyzowane poprzez odpowiedni podział tekstu na podrozdziały. Moim zdaniem rozdział „Wstęp” zasługuje na odrębną publikację w formie artykułu przeglądowego. Stanowi on logiczne uzasadnienie podjęcia badań własnych.

Cele badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej zostały sformułowane jasno i logicznie.

Materiały i metody badań zostały szczegółowo opisane na 18 stronach tekstu pracy.

Precyzyjny opis materiałów uzupełniony został 17 kolorowymi fotografiami wysokiej jakości przedstawiającymi wykorzystane w badaniach gatunki małży blaszkoskrzelnych (8 zdjęć) oraz ryb (9 zdjęć).

Właściwy opis metod badań Autorka poprzedziła czytelnym, kolorowym schematem przedstawiającym kolejne etapy doświadczeń, co bardzo ułatwia zrozumienie układu wielokierunkowych eksperymentów. W kolejnych podrozdziałach szczegółowo opisane są metody wykorzystane przy izolacji i identyfikacji biochemicznej i molekularnej *Vibrio parahaemolyticus*, oznaczaniu czynników wirulencji, badaniu wrażliwości wyizolowanych mikroorganizmów na czynniki przeciwbakteryjne oraz różnicowanie molekularne otrzymanych izolatów metodami molekularnymi, tj. typowanie metodą PFGE i MLST.

Przyjęte metody badań zostały właściwie dobrane do realizacji ambitnych celów, które wytyczyła sobie Autorka. Umiejętne wykorzystanie skomplikowanych procedur analitycznych zastosowanych w przeprowadzonych badaniach wymaga

dobrego przygotowania teoretycznego oraz wyjątkowej biegłości w pracy laboratoryjnej. Sposób rozwiązania problemów metodycznych związanych z realizacją pracy oraz wprowadzane modyfikacje i udoskonalenia niektórych oznaczeń świadczą o dużej wiedzy Kandydatki z zakresu mikrobiologicznej diagnostyki laboratoryjnej oraz umiejętności prowadzenia trudnych prac eksperymentalnych na wysokim poziomie.

Wyniki badań zostały opracowane statystycznie i przedstawione w sposób bardzo profesjonalny w 4 tabelach oraz na 25 rycinach zawierających zdjęcia, wykresy, obrazy elektroforetyczne i rysunki drzew filogenetycznych. Na uznanie zasługuje solidne udokumentowanie uzyskanych wyników oraz ich pełne wykorzystanie, polegające na przeprowadzeniu wszystkich możliwych porównań, ich szczegółowej interpretacji oraz efektownej wizualizacji. Pozytywnie należy ocenić logiczny układ poszczególnych tabel i wykresów oraz wysoką jakość techniczną zdjęć, obrazów, rysunków i innych materiałów ilustracyjnych prezentowanych w rozprawie doktorskiej. Umiejętne rozmieszczenie rycin i tabel w tekście pracy bardzo ułatwia czytelnikowi śledzenie skomplikowanych zależności opisywanych przez Autorkę.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka bardzo konsekwentnie i szczegółowo omawia wyniki poszczególnych oznaczeń i konfrontuje je z wynikami badań innych autorów. W dyskusji, podobnie jak we wstępie rozprawy, Doktorantka wykazała dużą erudycję i dobrą znajomość światowego piśmiennictwa związanego z występowaniem *Vibrio parahaemolyticus* w żywności pochodzenia morskiego, jak również umiejętność krytycznej oceny wyników własnych badań w świetle najnowszych danych z literatury.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka wysuwa logiczne i w pełni uzasadnione wnioski.

Zarówno polskie, jak i angielskie streszczenie pracy doktorskiej zostało napisane poprawnie.

Silną stroną pracy jest obszerny i aktualny spis piśmiennictwa. Zawiera on 190 pozycji opublikowanych w większości w ostatnich latach w języku angielskim w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Cytowane publikacje są ściśle związane z tematem pracy doktorskiej.

Spełniając obowiązek recenzenta powinienem również wskazać ujemne strony ocenianej rozprawy doktorskiej, co w tym przypadku jest sprawą szczególnie trudną, ponieważ badania przeprowadzone przez Kandydatkę reprezentują bardzo wysoki

poziom metodyczny, a opis pracy doktorskiej jest wyjątkowo starannie przygotowany pod względem redakcyjnym, stylistycznym i ortograficznym.

Drobne błędy zauważyłem jedynie w tekście pracy na stronie 94, gdzie w słowie „Większość” jest litera „e” zamiast „ę” oraz w angielskim streszczeniu, w którego drugim akapicie znajduje się określenie „...the presence of *V. parahaemolyticus* ... was carried out”. Wydaje się, że powinno być „...the presence of *V. parahaemolyticus* ... was investigated”. W pierwszym wierszu ostatniego akapitu streszczenia jest “may occurs”, a powinno być “may occur”.

Za drobny mankament opisu pracy można również uznać brak pełnej zgodności celów pracy z jej wnioskami. W celach prowadzonych badań Autorka podaje:

„1. Opracowanie testów PCR do wykrywania i identyfikacji:

- gatunkowo-specyficznych genów charakterystycznych dla *V. parahaemolyticus*
- genów kodujących czynniki chorobotwórczości *V. parahaemolyticus*”

Wymieniony powyżej cel ten został w pełni zrealizowany, ale brakuje o tym wzmianki w skromnie sformułowanych wnioskach pracy.

Powyższe uwagi krytyczne nie obniżają w żadnym stopniu wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo pozytywnie.

W wyniku szeroko zakrojonych, trudnych metodycznie i wielokierunkowych badań Autorka uzyskała wiele wartościowych wyników zarówno pod względem użytkowym jak i poznawczym.

Do niewątpliwych osiągnięć Autorki o charakterze praktycznym można zaliczyć:

- określenie i porównanie częstotliwości występowania *V. parahaemolyticus* w żywych małżach blaszkoskrzelnych i świeżych rybach morskich dostępnych na polskim rynku, pochodzących z Holandii, Włoch, Norwegii, Turcji, Niemiec, Sri Lanki oraz z Polski;

- wykazanie, że znaczna część szczepów *V. parahaemolyticus* wyizolowanych z małży i ryb morskich posiada genetyczne czynniki wirulencji i może zagrażać zdrowiu polskich konsumentów:

- określenie wrażliwości wyizolowanych szczepów *V. parahaemolyticus* na czynniki przeciwbakteryjne, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu zachorowań ludzi wywołanych tym drobnoustrojem i stwierdzenie, że większość

izolatów wykazuje oporność na ampicylinę i streptomycynę oraz wrażliwość na ciprofloksacynę, tetracyklinę i chloramfenikol.

Do osiągnięć Autorki o charakterze poznawczym można zaliczyć:

- pogłębienie wiedzy na temat zróżnicowania molekularnego izolatów *V. parahaemolyticus* występujących u różnych gatunków mięczaków i ryb morskich w różnych rejonach geograficznych,

- stwierdzenie u badanych izolatów *V. parahaemolyticus* nowych typów sekwencyjnych, dotychczas nie występujących w międzynarodowej bazie PubMLST.

Uzyskane przez Kandydatkę wyniki stanowią oryginalny i istotny wkład do krajowego i międzynarodowego piśmiennictwa w zakresie charakterystyki szczepów *Vibrio parahaemolyticus* występujących w żywności pochodzenia morskiego.

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki, a także Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Tym samym praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm. w Dz. U. z 2015 r. poz. 249)

W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autorki – lek. wet. Magdaleny Łopatek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na dużą pracochłonność i szeroki zakres wykonanych badań, a przede wszystkim ze względu na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników, uprzejmie proszę Wysoką Komisję o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. Jacek Szczawiński