

**Prof. dr hab. Krzysztof S. Szkucik**  
Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 25 marca 2020 r.

### Recenzja pracy doktorskiej

**Pani mgr Moniki Kurpas pt. „Zróżnicowanie molekularne oraz oporność na substancje przeciwbakteryjne szczepów *Listeria monocytogenes* pochodzących z żywności oraz z obszarów produkcji żywności”, wykonanej w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-PIB w Puławach pod kierunkiem dr hab. Kingi Wieczorek prof. instytutu**

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach Pana prof. dr. hab. Dariusza Bednarka z dnia 18.02.2020r. (BRN-410/2/20), powołujące się na Uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 26.10.2018r. powołującą recenzentów pracy doktorskiej mgr Moniki Kurpas.

Oczekiwania współczesnego konsumenta dotyczą żywności o korzystnych cechach sensorycznych i wysokiej wartości odżywczej, a przede wszystkim bezpiecznej, wolnej od różnego rodzaju zagrożeń fizycznych, chemicznych oraz biologicznych w tym głównie bakteriologicznych. Drobnoustroje izolowane z żywności to mikroflora rozkładu, a także mikroflora enteropatii pokarmowych, w których *Listeria monocytogenes* odgrywają istotną rolę. Bakteria ta jest drobnoustrojem ubikwitalnym. Stwierdza się ją powszechnie w środowisku jak również może występować w żywności, a także w środowisku jej wytwarzania. Według danych przedstawionych przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) zaobserwowano znaczny wzrost liczby przypadków zachorowań wywołanych przez *L. monocytogenes* i jednocześnie odnotowano wysoki odsetek zakażeń śmiertelnych, który w latach 2013 – 2017 wahał się od 13,8% do 17,7%. Także w Polsce *L. monocytogenes* jest jedną z głównych przyczyn zatruc pokarmowych i występowania listeriozy. Negatywna ocena sanitarno – weterynaryjna, a co za tym idzie wycofanie

K.S.

z obrotu zanieczyszczonej żywności często połączonej z zamykaniem zakładów produkcyjnych niesie za sobą również wymierne straty ekonomiczne.

Mając na względzie wymienione wyżej kryteria bezpieczeństwa, kryterium epidemiologiczne i epizootologiczne, tematyka pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Kurpas dobrze wpisuje się w ten problem i oceniam ją jako bardzo potrzebną tak ze względów poznawczych, a także ze względu na jej charakter aplikacyjny, ukierunkowany na bezpośrednie zastosowanie w szeroko pojętym procesie rozpoznania sytuacji listeriozy w Polsce i postępowaniu epidemiologicznym. W mojej ocenie tytuł pracy został sformułowany zbyt ogólnie. Użyte w tytule określenie żywność jest bardzo szerokim pojęciem. Praca dotyczy bowiem wybranych dwóch grup wędlin i środowiska ich pozyskiwania.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami i posiada klasyczny układ przyjęty dla tego typu opracowań. Praca składa się z 7 rozdziałów liczących 150 stron tekstu zawierającego 35 tabel, 28 rycin i 150 pozycji piśmiennictwa. Pracę rozpoczyna wykaz terminów i skrótów użytych w tym opracowaniu oraz starannie zredagowane i odzwierciedlające całość badań, streszczenia w języku polskim i angielskim. Natomiast zamyka pracę obszerny aneks, w którym uszczegółowiono dane z rozdział „Materiał i metody” i „Wyniki”

W obszernym, obejmującym bowiem 21 stron, wstępie Doktorantka przedstawiła w sposób bardzo rzeczowy, a równocześnie wyczerpujący, obecny stan wiedzy na temat *L.monocytogenes* i listeriozy. Przedstawiono klasyfikację i charakterystykę tego drobnoustroju oraz jego występowanie w środowisku ze szczególnym uwzględnieniem gospodarstw hodowlanych i zwierząt wolno żyjących, a także występowania *L.monocytogenes* w żywności i środowisku jej produkcji. W kolejnych podrozdziałach przedstawiono chorobotwórczość omawianego patogenu charakteryzując patogenezę i epidemiologię listeriozy. Zgodnie z tematem pracy ostatnią część wstępu Doktorantka poświęciła identyfikacji *L.monocytogenes* z uwzględnieniem badań serologicznych i genetycznych, a także określenie jej wrażliwości na czynniki przeciwbakteryjne.

Zawarty we wstępie przegląd piśmiennictwa oraz jego zestawienie stwarzają właściwe tło dla badań własnych i wskazują, że Autorka dobrze przestudiowała i przemyślała problem, w zakresie którego mieści się oceniana rozprawa. Na

K. S.

podkreślenie zasługuje fakt, że cytowane publikacje (łącznie 150 pozycji) obejmują najnowsze zagraniczne jak i nieliczne krajowe prace, które ściśle związane są z tematem pracy i są istotne dla poruszanych zagadnień. Zdecydowana większość to prace z ostatnich lat, w tym także prace z 2020 roku, które zostały opublikowane w języku angielskim. Z cytowanych pozycji literaturowych zdecydowana większość została opublikowana w renomowanych czasopismach znajdujących się w wykazie JCR i posiadających niekiedy wysoki impact factor. Przegląd piśmiennictwa zawarty we wstępie w pełni stwarza podstawę do sformułowania celów podjętych badań.

W drugim rozdziale podano główny cel podjętych badań jakim była charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów *L.monocytogenes* pochodzących z wędlin i środowiska ich wytwarzania. Cel ten postanowiono osiągnąć poprzez:

- określenie zróżnicowania *L.monocytogenes* izolowanych z wędlin surowych i poddanych obróbce termicznej oraz pochodzących z obszarów ich produkcji,
- ocenę wrażliwości izolatów *L.monocytogenes* na substancje przeciwbakteryjne,
- określenie potencjału chorobotwórczego izolowanych *L.monocytogenes*,
- ocenę pokrewieństwa filogenetycznego badanych *L.monocytogenes* z izolatami, pochodzącymi z przypadków klinicznych listeriozy,
- określenie potencjału różnicującego metod genotypowych użytych do typowania molekularnego *L.monocytogenes*.

Cele i założenia dysertacji zostały przedstawione w sposób jasny i nie budzący wątpliwości i są w pełni uzasadnione.

Układ doświadczeń jest logiczny i dobrze przemyślany. Przyjęte metody są odpowiednie do realizacji celów, które wytyczyła sobie Autorka. Zaplanowanie części eksperymentalnej pracy doktorskiej wymagało gruntownego przygotowania teoretycznego. O ile izolaty *L.monocytogenes* zostały pozyskane z laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej a ich diagnostyka oparta jest na standardowym postępowaniu w laboratorium mikrobiologicznym, tak dalsze etapy badań, a zwłaszcza badania genetyczne wymagały dużego doświadczenia, precyzji oraz wiele czasu i wysiłku. Podkreślić należy bardzo dobry dobór materiału badawczego, na który składały się próbki kiełbas surowych miękkich typu metka i wędlin poddanych obróbce termicznej głównie wędzeniu i parzeniu. Uwzględnienie

K. S.

w badaniach izolatów *L.monocytogenes* pochodzących ze środowiska produkcji wędlin uważam za trafne ze względu na postępowanie epidemiologiczne.

W opisie materiału badawczego jest pewna nieścisłość. Autorka pisze o wykorzystaniu 150 izolatów *L.monocytogenes*, a ich suma z dziesięciu województw zgodnie z opisem na str. 42 wynosi 149. Po szczegółowej analizie tab. 1 Aneksu wynika, że w badaniach uwzględniono 69 szczepów pochodzących z województwa wielkopolskiego, a nie 68 jak podaje Autorka.

Szczególną uwagę należy zwrócić na analizę i opracowanie statystyczne wyników badań. Dobór metod analiz statystycznych i pomocnych w ich programów komputerowych jest odpowiedni.

Wyniki badań, zgodnie z celami jakie postawiła sobie Autorka zostały przedstawione według przedstawionego układu w ośmiu etapach choć typowanie molekularne można byłoby przedstawić jako jeden etap uwzględniający w podrozdziałach techniki PFGE, MLST i MVLST, a następnie podsumowujący ten etap badań podrozdział porównujący te techniki i ich wykorzystanie do typowania molekularnego *L.monocytogenes*. Otrzymane wyniki pierwszego etapu badań dotyczące serotypowania molekularnego *L.monocytogenes*. zostały przedstawione w 2 tabelach, w których Doktorantka podała przynależność badanych 150 izolatów *L. monocytogenes* do czterech grup: IIa (48%szczepów), IIc (25,3%), IVb (16%) i IIb (10,7%). W dalszych analizach wykazano zależność pomiędzy przynależnością do określonej serogrupy, a źródłem pochodzenia szczepu.

W drugim etapie badań analizując oporność szczepów na substancji przeciwbakteryjnych Doktorantka wykazała, oporność na trzy z szesnastu substancji przeciwbakteryjnych, a ponad 93% szczepów wykazało oporność na daptomycynę i ponad połowa na oksacylinę. Wyniki te Autorka przedstawiła na 3 rycinach oraz w 3 tabelach. Natomiast w drugiej części Aneksu zaprezentowano wartości minimalnego stężenia hamującego, które poddano analizie porównawczej w zależności od serogrupy oraz od źródła pochodzenia badanych izolatów.

Obecności genów wirulencji *L.monocytogenes* jest poświęcony trzeci etap badań, w którym Doktorantka wykazała, że geny internalin *inIA*, *inIB*, *inIC* oraz *inIJ*, były obecne u wszystkich badanych szczepów *L.monocytogenes* co sprawia, że mogą być one patogenne dla człowieka, ale jednocześnie zidentyfikowano mutacje genowe, które wpływają na obniżenie potencjału zjadliwości szczepów.

H. G.

W kolejnej grupie badań charakteryzujących, użyte w doświadczeniach szczepy *L.monocytogenes*, wykorzystano trzy molekularne metody typowania: PFGE, MLST i MVLST. Stosując odpowiednie parametry statystyczne, które wykazały, że MLST i PFGE w porównaniu do MVLST charakteryzowały się wysokim potencjałem różnicującym.

W ostatnim etapie prowadzonych badań, kierując się kryteriami zachorowalności u ludzi i częstością występowanie w badanych grupach produktów, Doktorantka wybrała 40 izolatów *L. monocytogenes* należących do serogrupy IIb i IVb, na których wykonała sekwencjonowanie całego genomu. Badania te pozwoliły na scharakteryzowanie tych szczepów w kierunku cech genetycznych odpowiedzialnych za chorobotwórczość oraz oporność na substancje przeciwbakteryjne i czynniki środowiskowe.

W rozdziale piątym „Omówienie wyników” Doktorantka szczegółowo omawia wyniki poszczególnych etapów badań. Obszerna dyskusja wyników badań zawiera trafne stwierdzenia i komentarze. Sposób omówienia wyników badań w świetle zebranego i cytowanego piśmiennictwa dowodzi, że Autorka posiada szeroki zakres wiedzy co pozwoliło Jej na skonfrontowanie swoich osiągnięć z badaniami innych autorów. Przy omawianiu wyników Doktorantka wykazała się dużą erudycją i podobnie jak we wstępie rozprawy, dobrą znajomością aktualnego piśmiennictwa związanego z omawianym tematem. Autorka wykazała się również umiejętnością krytycznej oceny wyników badań własnych, w świetle danych przedstawionych w najnowszych, doniesieniach literaturowych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Autorka wyciąga uzasadnione i logiczne wnioski – są one przemyślane i jasno przedstawione. Osiem końcowych wniosków wskazuje, że cel pracy został osiągnięty, a jej rezultaty, mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w analizowaniu ognisk listeriozy oraz dróg zanieczyszczenia żywności i środowiska bakteriami *L.monocytogenes*. W mojej opinii wnioski 7 i 8 – jako podsumowujące całość przeprowadzonych badań są cennymi wskazówkami dla służb nadzorujących produkcję żywności zarówno roślinnego jak i zwierzęcego pochodzenia.

K. Sz.

Spełniając obowiązek recenzenta muszę wskazać także na nieliczne uchybienia redakcyjne.

- Tytułem podrozdziału nie powinien być wyłącznie skrót, a tym bardziej angielski, bowiem praca napisana jest w języku polskim ( rozdział 3.2.6 oraz 3.2.7)

- str. 29, 8 wiersz od dołu – powinno być (Miya i wsp., 2015) a nie 2019

- str. 49, 6 wiersz od góry – zmianie powinien ulec opis tab. 13

- str. 77, 9 wiersz od dołu – powinno być – oparto o analizę

- str. 89, 9 wiersz od góry – dwukrotnie napisano słowo „zapis”

- str. 93, 5 wiersz od dołu – powinno być – wytwarzane

- str. 98, 16 wiersz od dołu – powinno być – z rezultatami

- str. 103, 16 wiersz od dołu – zmianie powinno ulec sformułowanie „izolatów klinicznych od ludzi”

- str. 109, 2 wiersz od góry – powinno być – skoncentrowano się na

Przedstawione uwagi, zarówno redakcyjne jak i stylistyczne oraz sugestie nie rzutują na wartość merytoryczną ocenianej dysertacji i mogą być usunięte przed oddaniem pracy do druku, którą sugeruję opublikować w języku angielskim w renomowanym czasopiśmie o wysokim wskaźniku wpływów IF.

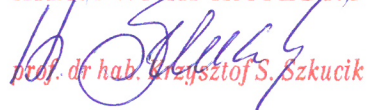
W ocenie ogólnej, recenzowaną dysertację oceniam jako interesującą i bardzo wartościową pozycję, która wnosi nowe istotne elementy poznawcze dotyczące samej bakterii jak i wywołanej przez nią choroby. Otworzyła ona nowe perspektywy wykorzystania badań zwłaszcza typowania molekularnego technikami PFGE i MLST oraz analiz molekularnych z wykorzystaniem metody NSG. Oceniana rozprawa stanowi oryginalne, nowatorskie w skali kraju i nieliczne w świecie rozwiązanie, jakże ważnego z epidemiologicznego punktu widzenia problemu naukowego. Dysertacja wykazała również dużą wiedzę teoretyczną Doktorantki, a także Jej umiejętność prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Oceniana dysertacja w moim przekonaniu spełnia całkowicie wymogi stawiane pracom doktorskim w świetle art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami (jednolity tekst: Dz. U. z 27 września 2017r. poz. 1789)

*H. S.*

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 Pani mgr Moniki Kurpas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając znaczące dla nauki wartości poznawcze wpływające z ocenianego opracowania, oraz możliwość ich zastosowania w nadzorach nad produkcją żywności, a także zastosowania otrzymanych wyników w dochodzeniach epidemiologicznych, uważam, że praca ta zasługuje na wyróżnienie przez Dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

KIEROWNIK KATEDRY

  
prof. dr hab. Grzegorz S. Szukcik