

Prof. dr hab. Łucja Łaniewska-Trokenheim

Olsztyn, 29.06.2018

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności

Wydział Nauki o Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Kamili Beaty Muskalskiej pt. „Identyfikacja, serogrupy i geny wirulencji *L. monocytogenes* izolowanych z żywności i środowisk pokrewnych” wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Waldemara Dąbrowskiego – promotor
dr inż. Barbary Szymczak - promotor pomocniczy
w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej,
Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa,
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

Rodzaj *Listeria* są to gramdodatnie pałeczki szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, izolowane często z gleby, wody, roślin, ścieków i odchodów zwierzęcych. Namnażają się w szerokim zakresie temperatur (z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności wzrost liczebności komórek w trakcie przechowywania w warunkach chłodniczych surowców, półproduktów i produktów stanowi zagrożenie dla zdrowia i życia konsumentów), przeżywają proces mrożenia i długotrwałe okresy wysuszenia. Tolerują znaczne stężenia soli (nawet do 30% NaCl) i przeżywają w szerokim zakresie pH (5.0-9.0). Dodatkową cechą jest zdolność do tworzenia biofilmu który podnosi ich zdolności do utrzymania się w środowisku, w tym również w żywności. Ze względu na szeroki wachlarz występowania w środowisku *Listeria monocytogenes* jest jednym z głównych patogenów przenoszonych drogą pokarmową. Bakterie z gatunku *Listeria monocytogenes* są przyczyną zatruc pokarmowych o ciężkim przebiegu, szczególnie u osób z osłabionym systemem odpornościowym. Źródłem kontaminacji pałeczkami *Listeria monocytogenes* najczęściej jest żywność, zarówno pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego zawierająca powyżej 10^3 komórek w 1 g/ml produktu. Zagrożenie jakie stanowi *Listeria monocytogenes* spowodowało wprowadzenie restrykcyjnych norm i rozporządzeń obowiązujących w Polsce i na świecie. Za zatrucia

pokarmowe odpowiadają nie wszystkie szczepy *Listeria monocytogenes*, a określone serotypy czy serogrupy tego gatunku. Diagnostyka pałeczek *Listeria monocytogenes* w oparciu o cechy biochemiczne i nie spełnia wymaganych oczekiwań. Z uwagi na narastający problem związany z właściwą diagnostyką patogennych szczepów *Listeria monocytogenes* w obrębie gatunku, jak również z coraz częściej pojawiającymi się szczepami atypowymi, a wirulencją i serologią szczepów konieczne jest rozszerzenie podstawowych badań diagnostycznych w oparciu o metody genetyczne i serologiczne.

Praca obejmuje 167 stron wraz z tabelami, rysunkami, aneksem, spisem rycin oraz piśmiennictwem. Podział pracy na rozdziały jest typowy i obejmuje: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki badań, Dyskusję wyników, Wnioski i stwierdzenia końcowe, Piśmiennictwo (brakuje streszczenie w jęz. polskim i angielskim). Wyniki badań przedstawiono na 30 rycinach i w 45 tabelach. Zamieszczone przez Doktorantkę źródła literaturowe obejmują 261 pozycji, w tym 16 w języku polskim (9 pozycji cytowanych PN), pozostałe 245 pozycji to literatura obcojęzyczna, a 135 to prace z ostatniego dziesięciolecia.

Część doświadczalną poprzedza szeroko rozbudowany wstęp, oparty na przeglądzie literatury głównie z ostatniej dekady, wprowadzający w sposób pełny, a równocześnie syntetyczny w tematykę pracy. Autorka przedstawia w nim światowe dane dotyczące serotypów izolowanych z różnych środowisk, dane epidemiologiczne, wirulencji i identyfikacji w oparciu o metody biochemiczne i genetyczne. Bogate piśmiennictwo z zakresu identyfikacji genetycznej *L. monocytogenes* świadczy o dużym zainteresowaniu tematem, a mimo to dotychczas nie ustalono które z genów gatunkowych powinny być wykorzystywane w diagnostyce *L. monocytogenes* w kierunku patogennego szczepu.

W nurcie powyższej problematyki mieści się będąca przedmiotem recenzji praca dysercyjna Pani mgr inż. Kamili Beaty Muskalskiej.

Postawione hipotezy

- I. Diagnostyka szczepów *Listeria monocytogenes* jedynie na podstawie norm ISO nie pozwala na przeprowadzenie wiarygodnej identyfikacji patogenu.
- II. Szczepy *Listeria monocytogenes* różnią się potencjałem chorobotwórczym w zależności od ich typu serologicznego. Sugeruje to, że stwierdzenie obecności *Listeria monocytogenes* w żywności bez określenia przynależności do serogrupy nie powinno być podstawą do wykluczenia danej próbki z handlu.

Do udowodnienia/wykluczenia postawionych hipotez Doktorantka wytyczyła następujące cele badań:

1. Porównanie skuteczności metod biochemicznych i genetycznych stosowanych w identyfikacji *Listeria monocytogenes*.
2. Klasyfikacja szczepów *Listeria monocytogenes* wyizolowanych z żywności i innych środowisk do poszczególnych grup serotypowych za pomocą reakcji multipleks PCR.
3. Określenie zależności pomiędzy występowaniem serogrup *Listeria monocytogenes* a ich pochodzeniem.
4. Ocena potencjału chorobotwórczego grup serotypowych i serotypów *Listeria monocytogenes* na podstawie identyfikacji głównych genów wirulencji.
5. Określenie zależności pomiędzy serotypami *Listeria monocytogenes* a genami wirulencji.

W rozdziałach: Materiały i Metody badań przedstawionych na 14 stronach, Doktorantka podała w sposób bardzo szczegółowy przygotowanie materiału do badań w tym:

- pochodzenie stosowanych szczepów izolowanych z różnych środowisk: żywność, wymazy z tusz, kał dzikich zwierząt, gleba.
- metody izolacji i identyfikacji: identyfikację wg PN, identyfikację z zastosowaniem podłoży chromogennych, identyfikację testem Vitek-2 i identyfikację metodami genetycznym.

Na podkreślenie zasługuje bogaty, wymagający dużego nakładu sumiennej pracy materiał badawczy który w liczbie 177 stanowiły szczepy *L. monocytogenes* izolowane z różnych środowisk.

Część doświadczalna świadczy o wyjątkowym zaangażowaniu Doktorantki w realizację postawionych celów, szerokiej znajomości zagadnienia związanego z wydaniem orzeczenia czy wyizolowany szczep *L. monocytogenes* posiada geny wirulencji czy nie?

Wyniki badań Doktorantka przedstawiła bardzo dokładnie, analizując każdą zaistniałą sytuację powstałą w trakcie przeprowadzanych badań. Każdy wynik, każde spostrzeżenie, uzyskane na podstawie wykonanych doświadczeń, uwarunkowanych wytycznymi wynikającymi z założonych zakresów badań, Doktorantka bardzo dokładnie analizowała. Uzyskane dane liczbowe z badań zamieściła na 30 rycinach i w 45 tabelach w sposób nie budzący (moim zdaniem) zastrzeżeń. Słowa uznania za pracowitość, sumienność i entuzjazm, jednym słowem za „włożone serce” na każdym etapie bardzo istotnych, dlatego że dotyczących bezpieczeństwa i zdrowia szerokiej populacji społeczeństwa badań.

Doktorantka wytrwałością i sumiennością przeprowadzonych badań osiągnęła postawiony cel i potwierdziła słuszność wykonanych badań.

Dyskusję wyników Doktorantka przedstawiła na 33 stronach, w sposób świadczący o bardzo szerokiej znajomości zagadnienia. W sposób wnikliwy porównała uzyskane wyniki badań własnych z wynikami autorów zajmujących się tematyką badań dotyczącą modyfikacji identyfikacji szczepów *L. monocytogenes* z uwagi na wysokie zagrożenie dla zdrowia i życia konsumenta. Wnikliwa identyfikacja ma również duże znaczenie w przetwórstwie i przechowywalności żywności. Doktorantka włączyła się w nurt wciąż toczącej się dyskusji w kręgach diagnostyków, jakie cechy biochemiczne i genetyczne powinny być uwzględniane przy właściwym określeniu gatunku. Wynikami swoich badań może uzupełnić wskazówki o następujące spostrzeżenie: cytuję; „zastosowanie dwóch markerów gatunkowych: *profA* i *lmo0733*, które wydają się być najbardziej wiarygodnymi identyfikatorami *L. monocytogenes*”.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka przedstawiła w pełni uzasadnione wnioski.

Spostrzeżenia/zapytania recenzenta

Pomimo dużej liczby wyizolowanych szczepów (177) z różnych środowisk, proponowałabym - odnoście żywności- izolację z większego zakresu żywności pochodzenia roślinnego, np. z warzyw, różnego rodzaju sałat, z marchwi surowej orz z tusz zwierząt hodowlanych, z drobiu, środowisko: gleba, czy był uwzględniany sposób nawożenia (sztuczne nawozy, nawóz naturalny)

Czy mogłaby Pani na podstawie rozległej wiedzy – na którą wskazują wykonane badania, interpretacja uzyskanych wyników i w sposób „prowadzenia” dyskusji - podać schemat szybkiej, a jednocześnie jednoznacznej identyfikacji patogennych szczepów *L. monocytogenes*.

Ocena pracy

Zaprezentowana przez Doktorantkę tematyka badań zasługuje na wysokie uznanie ze względu na bardzo szeroki zakres prowadzonych analiz, aktualność podjętej problematyki, merytoryczne treści i wartości poznawcze. Zrealizowany przez Panią mgr inż. Kamilę Beatę Muskalską i przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej problem badawczy

dotyczący szeroko pojętej identyfikacji szczepów *Listeria monocytogenes* z uwzględnieniem grup serotypowych i serotypów określenie występowania genów wirulencji i zwrócenie uwagi na atypowe szczepy jest konsekwencją dobrej znajomości i doskonałej analizy współczesnego piśmiennictwa, umiejętności zaplanowania i organizacji badań, a także doboru odpowiednich metod badawczych oraz przedstawienia i opisanie uzyskanych wyników i umiejętności wnioskowania. Na szczególne podkreślenie zasługują badania których wyniki mogą być przyczyną, a nawet podstawą do poszerzonych o metody genetyczne sposoby identyfikacji szczepów patogennych co ma istotne znaczenie praktyczne.

Niezależnie od zamieszczonych w recenzji uwag i spostrzeżeń, które nie umniejszają w najmniejszym stopniu wartości merytorycznej pracy, oceniam rozprawę doktorską Pani mgr inż. Kamili Beaty Muskalskiej jako oryginalną i twórczą.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że praca doktorska pani mgr inż. Kamili Beaty Muskalskiej pt.: „Identyfikacja, serogrupy i geny wirulencji *L. monocytogenes* izolowanych z żywności i środowisk pokrewnych” w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim zgodnie z rozdziałem o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i tym samym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauki o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Kamili Beaty Muskalskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

