

Prof. dr hab. Renata Urban-Chmiel
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 11.10.2022r.

Recenzja
pracy doktorskiej Pani mgr Beaty Lachtary
pt.: "Charakterystyka genomu *Listeria monocytogenes* serogrup IIa i IVb pochodzących z
żywności oraz środowiska jej produkcji"

Podstawą formalną jest pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dn. 22.09.2022r, informujące o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy na mocy uchwały Rady Naukowej PIWet.-PIB w Puławach z dn. 24.04.2019r.

Zakażenia wywoływane przez szczepy *Listeria monocytogenes* zaliczane są do jednych z najgroźniejszych infekcji u ludzi. Dane statystyczne z lat 2016-2021 wskazują na ich powszechne występowanie w krajach UE, Stanach Zjednoczonych, Azji, Australii i Afryce. Listerioza jest zaliczona do chorób odzwierzęcych, a wg najnowszych danych WHO wśród wszystkich odzwierzęcych chorób p. pokarmowego, charakteryzuje się najwyższym odsetkiem hospitalizacji (95%) i śmiertelności (13%).

Rezerwuarem szczepów *L. monocytogenes* jest ptactwo wolnożyjące, głównie bażanty, kuropatwy, perliczki oraz wróble. Ponad 95% przypadków listeriozy u ludzi powodowanych jest spożyciem zanieczyszczonej żywności szczególnie wędzonych ryb, serów miękkich, produktów mlecznych, owoców morza, a także poprzez bezpośredni kontakt z zakażonymi i bezobjawowymi zwierzętami lub ich wydaliniami. Rozpowszechnione występowanie pałeczek *Listeria* stwarza ogromne trudności w kontroli i eliminacji tego patogenu. Wynika to chociażby ze zdolności zasiedlania zróżnicowanych nisz i szczelin zlokalizowanych w podłogach, ścianach oraz urządzeniach wykorzystywanych do produkcji żywności. Bakterie *L. monocytogenes* w celu zwiększenia przeżywalności w środowisku zewnętrznym funkcjonują w postaci biofilmu, wytwarzanego na różnych powierzchniach, co czyni je bardziej opornymi na środki dezynfekcyjne, a także zwiększa ich stabilność na działanie niekorzystnych czynników środowiska zewnętrznego jak promieniowanie słoneczne, UV, pH, temperatura i wilgotność.

Rodzaj *Listeria* obejmuje obecnie 17 gatunków, wśród których najczęściej izolowanym są szczepy *L. monocytogenes*, stanowiące trzecią najczęstszą przyczyną zgonów z powodu zatruc pokarmowych u ludzi. Zakażenia wywołane przez *L. monocytogenes* są szczególnie powszechne w grupach ryzyka, takich jak kobiety w ciąży, niemowlęta, osoby starsze i ludzie z obniżoną odpornością. Listerioza ze względu na ciężki przebieg i wysoką śmiertelność, wymaga terapii, która zwykle obejmuje stosowanie ampicyliny, gentamycyny w

połączeniu z amoksycyliną, meropenem lub w połączeniu z trimetoprimem. Inne leki z wyboru szczególnie dla kobiet w ciąży to erytromycyna, wankomycyna i trimetoprim/sulfametoksazol.

Istotnym problemem poza zdrowotnym konsekwencjami wywołanymi przez zakażenia *L. monocytogenes* jest trudność w zwalczaniu infekcji, ponieważ bakterie cechuje wysoka oporność na antybiotyki. Wykazano, że u *Listeria* spp. głównym mechanizmem odpowiedzialnym za rozwój antybiotykooporności jest pozyskiwanie ruchomych elementów genetycznych np. samotransferowalnych, mobilizujących się plazmidów i transpozonów koniugacyjnych, przenoszących geny oporności na przykład przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., a także pomiędzy gatunkami *Listeria*. Mechanizmy te, zwane pompami efluksowymi, są powiązane z występowaniem lekooporności *L. monocytogenes* na fluorochinolony, makrolidy i cefotaksymy [Charpentier i Courvalin, 2018]. W wielu przypadkach stabilność danego szczepu na określone warunki środowiskowe, jak też oporność na chemioterapeutyki może wynikać z cech gatunkowych i serotypowych bakterii, co utrudnia nie tylko skuteczną diagnostykę ale również kontrolę rozprzestrzeniania się infekcji.

W świetle powszechnego zagrożenia infekcjami wywołanymi przez szczepy *L. monocytogenes*, w połączeniu z występowaniem lekooporności bakterii, podjęcie przez Doktorantkę badań z zakresu kompleksowej genotypowej identyfikacji *L. monocytogenes* izolowanych z żywności oraz miejsc produkcji żywności należy uznać za w pełni aktualne i uzasadnione zarówno z poznawczego jak też aplikacyjnego punktu widzenia.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej podjęto badania obejmujące charakterystykę występowania szczepów *L. monocytogenes* należących do serogrup IIa i IVb, pochodzących z żywności oraz środowiska jej produkcji w kraju, a także porównanie ich z innymi szczepami z wykorzystaniem międzynarodowych baz danych. Należy podkreślić, że badania były prowadzone w oparciu o aktualnie obowiązujące metody diagnostyczne.

Przedstawioną do oceny dysertację doktorską stanowią 3 prace przeglądowe:

- A.1. **Lachtara B.**, Wiczorek K., Osek J. Molekularne metody wykrywania *Listeria monocytogenes* w żywności. *Medycyna Weterynaryjna* 2016, 72, 12-17
- A.2. Osek J., **Lachtara B.**, Wiczorek K. *Listeria monocytogenes*- How this pathogen survives in food-production environments? *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13, 866462
- A.3. Osek J., **Lachtara B.**, Wiczorek K. *Listeria monocytogenes* in foods from culture identification to whole-genome characteristics. *Food Science and Nutrition*, 2022, 1-30.

oraz 2 prace eksperymentalne

- B.1. **Lachtara B.**, Osek J., Wiczorek K. Molecular typing of *Listeria monocytogenes* IVb serogroup from food and food production environments in Poland. *Pathogens*, 2021, 10, 482.

B.2. **Lachtara B.**, Wieczorek K., Osek J. Genetic diversity and relationships of *Listeria monocytogenes* serogroup IIa isolated in Poland. *Microorganisms* 2022, 10, 532.

Należy podkreślić, że wszystkie prace stanowiące dysertację doktorską zostały opublikowane w czasopiśmie wyszczególnionych w *Journal Citation Reports* o współczynniku wpływu IF od 0,161 do 4,926 oraz punktacji MEiN od 15 do 100. Łączna liczba punktów MEiN jest równa 355, natomiast sumaryczny IF wynosi 19,235 i należy go uznać za relatywnie wysoki w odniesieniu do pracy doktorskiej. W obu pracach eksperymentalnych oraz jednej przeglądowej Doktorantka jest pierwszym autorem, natomiast w pozostałych dwóch przeglądowych jest drugim autorem.

Do opracowanej dysertacji Doktorantka dołączyła również wstęp obejmujący kompleksową charakterystykę szczepów *Listeria*, wykaz skrótów, ogólny sumaryczny cel i zakres badań oraz pokrótce przedstawione uzyskane w poszczególnych publikacjach wyniki wraz z omówieniem w postaci jednolitego tekstu w języku polskim oraz 9 rycin i 3 tabel, opracowanych na potrzeby dysertacji doktorskiej. Na podstawie wyników uzyskanych w pracach eksperymentalnych Doktorantka opracowała 8 wniosków stanowiących konkluzję zrealizowanych badań. Pracę kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz 141 pozycji w większości anglojęzycznego piśmiennictwa i aneks zawierający obszerną tabelę nr 1 przedstawiającą informacje dotyczące miejsca pochodzenia izolatów *L. monocytogenes* oraz tabelę 2 zawierającą wykaz, zakres, a także kryteria interpretacji badanych czynników przeciwbakteryjnych. W celu usystematyzowania i ułatwienia czytelności dzieła Autorka zamieściła spis treści i wykaz skrótów.

Układ pracy jest zgodny z wymogami stawianymi pracom naukowym wykonywanym na stopień doktora nauk weterynaryjnych. Obejmuje on przegląd piśmiennictwa, w którym Doktorantka przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczącej występowania zakażeń wywoływanych przez *Listeria* jak też w zakresie ich kompleksowej charakterystyki fenotypowej i molekularnej. Przedstawiony na 20 stronach maszynopisu wstęp jest zwięzłym streszczeniem informacji zawartych w załączonych publikacjach przeglądowych, dotyczących charakterystyki i różnicowania szczepów *L. monocytogenes* oraz wykształcanych mechanizmów obronnych jak biofilm i lekooporność, warunkujących ich przeżywalność w niekorzystnie zmienionych warunkach środowiska. W mojej ocenie jest to poprawna analiza piśmiennictwa będącego inspiracją do podjęcia badań będących tematem zrealizowanej pracy doktorskiej, świadcząca o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. W tej części pracy Autorka skupiła się na ogólnej charakterystyce szczepów *L. monocytogenes* jako drobnoustroju zoonotycznego uczestniczącego w etiopatogenezie zakażeń wywoływanych u ludzi. W dalszej części prezentuje Ona kompleksową charakterystykę metod klasyfikacji tego drobnoustroju wraz z podziałem na serogrupy oraz linie filogenetyczne, do których przyporządkowuje określone serotypy bakterii. W kolejnym podrozdziale Autorka przedstawia zakres występowania szczepów *Listeria* w środowisku naturalnym, środowiskach utrzymania zwierząt oraz miejscach produkcji żywności, podkreślając trudności w eliminacji patogenów z uwagi na bardzo wysokie powinowactwo do zróżnicowanych

powierzchni, szczególnie trudno dostępnych miejsc. W kolejnych podrozdziałach wstępu skupia się na szczegółowym omówieniu aktualnie dostępnych danych z zakresu prewalencji drobnoustroju w produktach żywnościowych w poszczególnych krajach na świecie, jak też charakterystyce ognisk zakażeń listeriozą. Przedstawione przez Doktorantkę informacje zostały poparte aktualnym piśmiennictwem z zakresu izolacji i identyfikacji *L. monocytogenes* jak również zakresem i częstotliwością diagnozowania infekcji w krajach UE, Azji, Afryce, Australii i Stanach Zjednoczonych. Jest to bardzo wartościowa analiza piśmiennictwa, pozwalająca na zrozumienie skali problemu jakim są zagrożenia wywoływane przez *L. monocytogenes*. Chcąc przybliżyć problem dotyczący kontroli i eliminacji bakterii, w dalszej części Doktorantka prezentuje szczegółowo mechanizmy chorobotwórczości oraz czynniki warunkujące przeżywalność *L. monocytogenes* w zróżnicowanych środowiskach. Bardzo ważnym elementem charakterystyki jest przedstawienie danych typowania molekularnego, które stanowi podstawę do różnicowania szczepów w obrębie gatunku, pozwalając jednocześnie na określenie podobieństwa izolatów, co ma istotne znaczenie w charakterystyce epidemiologicznej w ocenie źródła zanieczyszczenia produktów żywnościowych. Autorka skupiła się głównie na charakterystyce wykorzystania technik sekwencjonowania w tym MLST (multi locus sequence typing) oraz HTS (high throughput sequencing), jako najbardziej rozpowszechnionych w diagnostyce. Uzupełnieniem tych informacji są trzy prace przeglądowe włączone do dysertacji doktorskiej (A.1, A.2, A.3), opublikowane w czasopiśmie z JCR, z czego w jednej Autorka jest pierwszym autorem i Jej udział wynosi 70%, natomiast w dwóch pozostałych jest drugim autorem przy udziale po 40%.

Rozdział „Cel i zakres pracy” przedstawiono bardzo syntetycznie, bez powtarzania informacji zawartych we wstępie. Doktorantka sformułowała podstawowy cel badawczy, którym była charakterystyka genotypowa *L. monocytogenes* należących do serogrup IIa i IVb, pochodzących z żywności i środowiska jej produkcji w Polsce oraz porównanie ich ze szczepami zawartymi w międzynarodowych bazach danych. Autorka w oparciu o załączone publikacje eksperymentalne stanowiące pracę doktorską zawarła również cztery cele szczegółowe, w obrębie których zaplanowała typowanie molekularne oraz określenie stopnia różnorodności genetycznej badanych izolatów; ocenę potencjału chorobotwórczego i przeżywalności w środowisku produkcji żywności bakterii na podstawie analizy genomu; określenie stopnia podobieństwa molekularnego pomiędzy izolatami w obrębie poszczególnych serogrup oraz pomiędzy szczepami dostępnymi w międzynarodowych bazach danych, a także oznaczenie lekowrażliwości szczepów na wybrane środki przeciwbakteryjne. W mojej ocenie stwierdzenie zawarte w celu głównym cyt. „Ponadto określano wrażliwość badanych *L. monocytogenes* na wybrane substancje przeciwbakteryjne” stanowi powtórzenie ostatniego celu szczegółowego i z powodzeniem można je usunąć.

Oceniając metodykę badań wykorzystanych w dysertacji doktorskiej, którą poza opisem w publikacjach B.1 i B.2 Doktorantka dodatkowo zamieściła w skrócie rozdziału „Materiał i metody” przedstawionych na 4 stronach wydruku komputerowego, należy podkreślić precyzyjnie przedstawiony zakres zaplanowanych w

poszczególnych etapach badań. W pierwszej części Autorka precyzyjnie przedstawia opis pozyskiwania materiału, a następnie prezentuje zakres badań molekularnych wykorzystanych do oznaczenia serogrup badanych szczepów technikami PCR, identyfikacji typów sekwencyjnych i kompleksów lokalnych na podstawie analizy sekwencji poszczególnych genów, a także identyfikacji alleli i kompleksów klonalnych z wykorzystaniem bazy pubMLST. Szczegółowy opis metodyki został zawarty w publikacjach B.1 i B.2. i tej na podstawie jestem przekonana, że Doktorantka bardzo dobrze opanowała wykorzystywany w pracy warsztat badawczy, na co wskazuje opis technik pozyskiwania i analizy badanego materiału genetycznego. Opis zastosowanych technik nie budzi zastrzeżeń, a forma przedstawienia umożliwia ich powtórzenie oraz konfrontację z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Doktorantka uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej wyniki opublikowała w postaci dwóch prac eksperymentalnych B.1 i B.2 stanowiących dysertację doktorską oraz zawarła w rozdziale „Wyniki” w części opisowej pracy. W celu przybliżenia uzyskanych rezultatów dotyczących prewalencji badanych szczepów zaliczonych do typów ST i CC przy pomocy amplifikacji i sekwencjonowania w badanych produktach, Autorka wykorzystwała formę graficzną i opisową. Na podstawie analizy MLST zakwalifikowała Ona badane szczepy serogrupy IIa w większości do 18 kompleksów klonalnych CC. Przy czym najczęściej występującymi szczepami izolowanymi z mięsa surowego był CC155, natomiast w przypadku wędlin były to szczepy zakwalifikowane jako CC121 i CC8. W przypadku szczepów pozyskanych ze środowiska produkcji żywności najczęściej występującymi były szczepy należące do CC155, CC8 oraz CC121.

Analiza typu sekwencyjnego ST pozwoliła wyodrębnić 21 typów sekwencyjnych, jakkolwiek większość z nich pokrywała się z numerami uzyskanymi na podstawie klasyfikacji do odpowiadających im szczepów CC. W przypadku szczepów *L. monocytogenes* zaliczonych do serogrupy IVb, Doktorantka wykazała trzy kompleksy klonalne CC2, CC6 oraz CC1, które występowały we wszystkich badanych źródłach pochodzenia, czyli mięsa, wędlin oraz środowiska produkcji żywności. Na podstawie kompleksowej analizy badanych izolatów Doktorantka wybrała do sekwencjonowania genomowego (WGS) 191 szczepów, w tym 100 należących do serogrupy IIa oraz 91 z serogrupy IVb, a przeprowadzona analiza molekularna pozwoliła wykazać istotne zróżnicowanie szczepów w obrębie typów cgMLST (CT), co zostało przedstawione w publikacji B.2. Przeprowadzone badania pozwoliły także na potwierdzenie występowania zróżnicowanych genów oporności i wirulencji wśród badanych izolatów oraz ich korelację w zakresie zwiększonej patogenności, przeżywalności i oporności na czynniki antybakteryjne w tym środowiskowe i chemiczne. Doktorantka potwierdziła występowanie u znacznego odsetka szczepów genów warunkujących zwiększoną patogenność (LIPI-1) oraz markerów uczestniczących w tworzeniu biofilmu (*inlA*) i *cadA1*, SSI-1 i SSI-2 warunkujących zwiększoną przeżywalność w zmienionych na niekorzyść warunkach środowiska. Wszystkie wyniki zostały przedstawione w postaci rycin i tabel m.in. w publikacji B.1 oraz omówione w części opisowej pracy doktorskiej. W końcowej części rozdziału Autorka przedstawiła omówienie wyników w zakresie

występowania genów wirulencji na podstawie analizy sekwencji profagowych i plazmidowych, określenia wzajemnego pokrewieństwa molekularnego badanych szczepów m.in. z wykorzystaniem drzewa filogenetycznego typu MST. Korzystnym elementem tej części pracy była również analiza wrażliwości szczepów na wybrane czynniki antybakteryjne, która potwierdziła występowanie wysokiego odsetka szczepów opornych na ceftriakson >60-80%, oksacylinę >40-60% oraz klindamycynę 8-25% w zależności od serotypu odpowiednio IIa i IVb. Szczegółowe rezultaty uzyskane w ocenie profilów lekooporności szczepów *L. monocytogenes* zostały przedstawione w postaci rycin i odpowiadających im tabel, chociaż w mojej ocenie tabelę 2 i 3 można było połączyć w jedną, co ułatwiłoby analizę porównawczą uzyskanych profilów dla szczepów serogrupy IIa i IVb.

Zastosowanie przez Doktorantkę tak wielu molekularnych metod analitycznych opartych o sekwencjonowanie i analizę bioinformatyczną, umożliwiło precyzyjną identyfikację oraz charakterystykę izolatów *L. monocytogenes* i jest niewątpliwie potwierdzeniem Jej ogromnej wiedzy merytorycznej, jak też doświadczenia zdobytego podczas realizacji badań, co oceniam bardzo pozytywnie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka powiązała opis wyników częściowo z ich omówieniem, co podkreśla dojrzałość edytorską Pani mgr Beaty Lachtary i jest dobrym wskaźnikiem dla Jej dalszego rozwoju naukowego.

Przedstawiony skrócony opis badań jak też rozdziały dyskusja zawarte w pracach eksperymentalnych B.1 i B.2 stanowią poprawną analizę wyników, w konfrontacji z danymi piśmiennictwa. Autorka, ustosunkowuje się do analizowanych wyników i w sposób czytelny komentuje własne osiągnięcia, przeprowadzając podsumowania i sugestie dotyczące znaczenia uzyskanych wyników badań, co potwierdza dobrą znajomość badanych zagadnień będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Uzyskane w dysertacji wyniki pozwoliły na sformułowanie 8 wniosków zawierających całość zagadnień ujętych w przedstawionej do recenzji pracy. We wnioskach, Doktorantka wskazuje na istotne zróżnicowanie genotypowe w obrębie badanych izolatów *L. monocytogenes*, szczególnie w serogrupie IIa. Autorka potwierdziła również brak wysp patogenności LIPI-2, LIPI-3 oraz LIPI-4 wśród izolatów należących do serogrupy IIa, a także w niektórych przypadkach mutację w genie *inlA* odpowiedzialnego za potencjał wirulencji bakterii.

We wniosku trzecim Doktorantka poprzez wykazanie pełnej sekwencji genu *inlA* oraz obecności wysp patogenności LIPI-3 wśród szczepów należących do serogrupy IVb, wskazuje na ich wysoki potencjał wywoływania zakażeń u ludzi. Potwierdziła także zdecydowanie wyższy poziom przystosowania do przetrwania w zmienionych na niekorzyść warunków zewnętrznych wśród szczepów należących do serogrupy IIa. Natomiast wniosek nr 5 zawiera informacje o genetycznym przystosowaniu badanych szczepów do wymiany genów m.in. oporności na podstawie obecności tzw. ruchomych elementów genetycznych profagów i plazmidów. W szóstym wniosku Autorka wskazuje, na bardzo bliskie pokrewieństwo molekularne badanych izolatów pozyskiwanych przez ostatnie kilka lat, co jak sugeruje może być efektem zdolności długotrwałego

ich utrzymywania w środowiskach. W kolejnym wniosku Doktorantka odnosząc się do analizy porównawczej badanych szczepów należących do serogrupy IVb wskazuje jednocześnie, że zwiększona żywotność tych szczepów może przyczyniać się do zwiększonej zakaźności u ludzi. W mojej ocenie w/w wnioski nie wnoszą nowych informacji, które Doktorantka zawarła we wniosku nr 3 i 6 i można z powodzeniem go usunąć. W ostatnim wniosku Autorka konkluduje występowanie wrażliwości badanych szczepów na większość stosowanych w leczeniu chemioterapeutyków, wskazując jednocześnie na obecność znacznego odsetka szczepów opornych na ceftriakson, oksacylinę oraz klindamycynę, u których potwierdzono również obecność genów warunkujących lekooporność.

Rozdział „Piśmiennictwo” został zaprezentowany na 10 stronach wydruku komputerowego i zawiera 141 pozycji w większości aktualnego piśmiennictwa, które zostało włączone do publikacji wchodzących w skład dysertacji doktorskiej.

Pod względem merytorycznym badania zostały ocenione przez niezależnych Recenzentów, czego efektem jest ich opublikowanie w czasopiśmie międzynarodowym wyszczególnionych w JCR o znacznym IF. Z obowiązku Recenzenta, w przedstawionej recenzji dodałam niewielkie komentarze, które przyczynią się do podniesienia wartości szczególnie części opisowej dysertacji.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do recenzji dysertacja doktorska Pani mgr Beaty Lachtary odpowiada warunkom określonym w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.), w związku z art.179 ust.3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r z późn. zm., co upoważnia mnie do przedłożenia wniosku Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Beaty Lachtary do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną prowadzonych badań, jak również niekwestionowany aspekt naukowy i aplikacyjny wnioskuję o wyróżnienie Pani mgr Beaty Lachtary stosowną nagrodą na wyróżniającą się rozprawę doktorską.

