

Olsztyn, 14.10 2022r

Prof. dr hab. Joanna Szteyn

10-769 OLSZTYN

Ocena

**pracy doktorskiej mgr Beaty Lachtary wykonanej w Zakładzie Higieny Żywności
Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego
Instytutu Badawczego w Puławach**

**Tytuł pracy „Charakterystyka genomu *Listeria monocytogenes* serogrup IIa i IVb
pochodzących z żywności oraz środowiska jej produkcji”.**

Promotor: prof. dr hab. Kinga Wieczorek

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Łopatek

Podstawa formalna

Zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętej w dniu 24.04.2019r, zostałam powołana na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej. Badania zrealizowano w ramach projektu F/116 ze środków przeznaczonych na badania własne Funduszu PIW-PIB w Puławach .

Ocena formalna

Pracę doktorską mgr Beaty Lachtary stanowi cykl trzech publikacji przeglądowych o łącznej wartości IF 9,778 i dwóch artykułów naukowych o wartości IF 4,531 i 4,926 . Sumaryczny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej to 19,235, a liczba uzyskanych punktów według roku opublikowania, zgodnie z wykazem czasopism MEiN wyniosła 355. Tematyka rozprawy doktorskiej jest ściśle związana z obszarem zainteresowań naukowych realizowanych w grupie badawczej Zakładu Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia kierowanego przez prof. dr hab. Jacka Oskę. Pani mgr Beata Łachtara miała znaczący udział w: opracowywaniu koncepcji badań, analizie i opracowaniu wyników,

przygotowaniu manuskryptów i korekcie teksów przed wysłaniem prac doświadczalnych do druku. Jej udział w opublikowaniu prac przeglądowych polegał na: zrobieniu kwerendy i zebraniu literatury, przygotowaniu manuskryptów, korekcie tekstów przed ich ostatecznym opublikowaniem jak i uczestnictwie w koncepcji artykułów.

Recenzowana praca posiada klasyczny układ , czyli wyodrębniony wstęp, cel i zakres pracy, materiał i metody, wyniki i wnioski . Wstęp poprzedzony jest wykazem publikacji składających się na rozprawę doktorską i wykazem używanych skrótów, na końcu pracy umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim

Ocena merytoryczna

Tytuł rozprawy doktorskiej mgr Beaty Lachtary jest jasno sformułowany i odzwierciedla treści w niej zawarte. We wstępie Doktorantka w bardzo obszerny i wyczerpujący sposób, w oparciu o aktualny stan wiedzy omawia kolejno zagadnienia dotyczące występowanie listeriozy i jej negatywnych skutków, łącznie z przypadkami śmiertelnymi u ludzi. Zwraca uwagę na fakt powiązania zakażeń z żywnością , szczególnie żywnością RTE. W podrozdziałach wstępu omawia następnie charakterystykę i klasyfikację *L.monocytogenes* , jej występowanie w środowisku naturalnym a także w środowisku przetwarzania żywności. W dalszych podrozdziałach szczegółowo opisuje ogniska listeriozy wywołane przez żywność, nie ograniczając się tylko do krajów Europejskich , oraz mechanizmy działania chorobotwórczego tej bakterii. Następne dwa zagadnienia omawiane przez Autorkę Desertacji to : omówienie czynników determinujących przeżywalność *L.monocytogenes* w niekorzystnych warunkach środowiskowych i wrażliwości drobnoustroju na substancje przeciwbakteryjne . Wstęp kończy opis klasycznych i molekularnych metod typowania *L.monocytogenes*.

Doktorantka za główne cele pracy uznała: charakterystykę genotypową dwóch serogrup IIa i IVb *L.monocytogenes* pochodzących z żywności i środowiska , ich porównanie z innymi szczepami pochodzącymi z podobnych źródeł oraz określenie wrażliwości badanych izolatów *L.monocytodenes* na wybrane substancje przeciwbakteryjne .Przedstawione cele miały być zrealizowane w czterech etapach:

1. określenia różnorodności genetycznej wyizolowanych szczepów,
2. oceny potencjału chorobotwórczego i zdolności przeżywania w środowisku produkcyjnym ,
3. ustalenia stopnia pokrewieństwa molekularnego pomiędzy izolatami w obrębie serogrup,

4. zbadanie wrażliwości badanych izolatów na wybrane substancje przeciwbakteryjne.

Materiał do badań stanowiły szczepy *L. monocytogenes* wyizolowane z próbek wędlin, mięsa surowego i środowiska produkcji żywności przez Zakłady Higieny Weterynaryjnej i laboratoria zatwierdzone przez Głównego Lekarza Weterynarii z 14 województw w latach 2013-2019. W sumie do badań wybrano 146 izolatów serogrupy IIa i 137 serogrupy IVb. po wcześniejszym oznaczeniu techniką multipleks PCR.

Na szczególne podkreślenie zasługuje obszerny zakres precyzyjnie zaplanowanych i wykonanych metod badań pozwalających na identyfikację typów sekwencyjnych i kompleksów klonalnych bakterii. Pozyskane DNA szczepów *L. monocytogenes* i sekwencjonowanie całego genomu metodą SANGERA dało możliwość badania sekwencji i wykrywania poszczególnych genów, identyfikacji alleli i kompleksów klonalnych. Autorka wykorzystując technikę MLST oraz cgMLST uzyskała zróżnicowane profile klonalne cgMLST, a użycie oprogramowania BioNumerus pozwoliło jej na przyporządkowanie izolatów do podlinii klonalnych i opracowanie dendrogramów. Analizę sekwencji genomowych badanych *L. monocytogenes* wykonano ponadto z użyciem dostępnych na platformach BIGSdb-LM oraz Blast narzędzi bioinformatycznych identyfikując geny odpowiedzialne za inwazję i przeżywalność w komórkach gospodarza i geny warunkujące oporność na środki dezynfekcyjne. Wszystkie wykorzystane w badaniach metody zostały szczegółowo opisane z uwzględnieniem danych piśmiennictwa.

Wyniki przeprowadzonych badań mgr Beata Lachara opisała na 17 stronach maszynopisu na których zamieściła dodatkowo dziewięć rycin oraz 2 tabele. Rozdział wyniki podzieliła Autorka na dwa podrozdziały, pierwszy dotyczący charakterystyki molekularnej *L. monocytogenes* i drugi wrażliwości badanych izolatów na czynniki przeciwbakteryjne. Dokonując charakterystyki molekularnej serogrupy IIa opartej na technice MLST 146 szczepów zakwalifikowała Doktorantka do 18 kompleksów klonalnych, z czego 93 należało do jednego z trzech CC: CC155 (n= 33), CC121(n=32), CC8 (n=28). Pozostałe, zaliczono do piętnastu CC. Szczegółowo omawia źródła pochodzenia izolatów z tej grupy (mięso surowe, wędliny, środowisko produkcji żywności) i ich przynależność do kompleksów klonalnych. Biorąc pod uwagę typy sekwencyjne, dla grupy IIa wyróżniła ich 21. Dla izolatów trzech kompleksów klonalnych CC 121, 14 i 7 zidentyfikowała po dwa różne typy sekwencyjne. Podobny układ przedstawiania wyników zastosowała Doktorantka w opisie serogrupy IVb. Dokonując charakterystyki molekularnej grupy opartej na technice MLST, przynależność 137 zaliczyła jedynie do 3 kompleksów klonalnych. Większość bo aż 90 szczepów należała do

CC2, pozostałe zaś do CC6 i CC1. We wszystkich trzech grupach CC stwierdziła obecność izolatów pochodzących z trzech źródeł. Podobnie, we wszystkich trzech grupach wyodrębniła dwa typy sekwencyjne. Analizę sekwencji całego genomu Doktorantka przeprowadziła na 100 izolatach należących do serogrupy IIa i 91 izolatach należących do serogrupy IVb dokonując wcześniej selekcji na podstawie występowania kompleksów klonalnych, tak aby zapewnić reprezentatywność grupy i możliwość porównania ze szczepami innego pochodzenia. Wszystkie badane izolaty posiadały geny wyspy patogenności LIPI-1, która zawiera sześć genów wirulencji. Wykazano różnice w występowaniu pozostałych wysp : LIPI-2, LIPI-3 i LIPI-4, ponieważ żaden z izolatów serogrupy IIa ich nie wykazywał. Gen *inlA* odpowiedzialny m.in. za tworzenie biofilmu przez *L.monocytogenes* wykryty został w 98 ze 100 izolatów należących do grupy IIa z czego u 31 stwierdzono mutację PMSC wzmagającą jego tworzenia. Co ciekawe, żaden z izolatów zaklasyfikowanych do CC155 oraz CC8 nie wykazywał tej mutacji, podobnie jak 91 izolatów *L.monocytogenes* należących do serogrupy IVb. W dalszym ciągu rozdziału Doktorantka szczegółowo omawia wyniki analizy obecności genów odpowiedzialnych za oporność względem: czwartorzędowych związków amonowych (QAC) , kadmu, arsenu , przeżywalności w warunkach subletalnych , w środowisku alkalicznym i warunkach stresu oksydacyjnego. Kolejne wyniki oznaczeń dotyczą identyfikacji profagów i plazmidów. Spośród 100 izolatów należących do serogrupy IIa w 64 zidentyfikowanych zostało 11 różnych kompletnych sekwencji i profagowych, a najczęściej izolowanym plazmidem był plazmid pLM5578 który zidentyfikowano także u 12 izolatów serogrupy IVb należących do CC2. W oparciu o profile cgMLST Autorka wygenerowała drzewa filogenetyczne dla obu serogrup i poszczególnych kompleksów *L.monocytogenes* . Rozdział wyniki w zamieszczonej tabeli 1 przedstawia zestawienie występowania oporności izolatów *L.monocytogenes* na dwa antybiotyki β laktamowe i jeden z grupy linkomycyn. Najwięcej izolatów z serogrupy IIa wykazało oporność na Ceftriakson, 95 z 146 podobnie jak z serogrupy IVb 126 z 137. W obrębie serogrupy IIa i IVb zdefiniowano odpowiednio 15 i 10 profili wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe zamieszczając wyniki w tabeli 2 i 3. Opis wyników nie budzi zastrzeżeń, jest bardzo szczegółowy, a zamieszczone ryciny i tabele znacznie ułatwiają ich podsumowanie.

Autorka sformułowała osiem obszernych wniosków (choć bardziej można je nazwać podsumowaniem), które znajdują pełne potwierdzenie w uzyskanych wynikach analiz .

Rozprawę doktorską kończy spis j literatury, przygotowany bardzo starannie. Wszystkie pozycje cytowane w pracy są odnotowane w piśmiennictwie. Również streszczenie w języku polskim i angielskim są przygotowane bardzo starannie i nie budzą zastrzeżeń.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę Doktorantki na pewne usterki i sugestie:

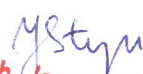
1. W rozdziale materiały i metody, podrozdział pkt. 3.4. Oznaczanie wrażliwości *L. monocytogenes* na substancje przeciwbakteryjne, wymienia Pani metodę mikrorościeńczeń pozwalającą na określenie MIC. W rozdziale wyniki brak jest wyników z tych oznaczeń i chociaż są zamieszczone w aneksie w tabeli nr 2, to jednak brakuje informacji jak kształtuje się to w poszczególnych serogrupach .
2. Szczepy *L. monocytogenes* izolowane były z trzech źródeł wędlin, mięsa i środowiska produkcji żywności . Ważne dla analizy zagrożeń (wówczas możliwość praktycznego wykorzystania) byłyby dane dotyczące typu wędliny czy były to wędzonki, kielbasy, wędliny podrobowe , czy były to wędliny trwałe, półtrwałe czy surowe wędzone ?
3. Określenie użyte w desertacji „środowisko wytwarzania żywności” jest bardzo szerokie, czy były to elementy bezpośredniego kontaktu z produkowaną żywnością czy inne ?
4. Wykaz używanych skrótów znacząco ułatwia czytelnikowi przyswojenie tekstu , dobrze by było go uzupełnić o skróty CT i MIC a ponieważ większość skrótów to pierwsze litery nazw angielskich noże warto by było oddzielić dwa które są w języku polskim

Ocena końcowa

Wskazane przeze mnie pewne usterki nie pomniejszają wartości poznawczych i aplikacyjnych pracy mgr Beaty Łachtary. Bardzo dobra znajomość literatury dotycząca wybranej bakterii, obszerna wiedza w zakresie omawianych zagadnień, prawidłowe zaplanowanie i przeprowadzenie skomplikowanych odnaczeń z użyciem dostępnych na platformach BIGSdb-LM oraz Blast narzędzi bioinformatycznych oraz poprawne wnioskowanie świadczą o dobrym naukowym przygotowaniu Doktorantki. Pani mgr Beata Łachtara zrealizowała postawione cele badawcze oraz wniosła nowe treści poznawcze i utylitarne do stanu wiedzy o *L.momocytogenes* . W świetle powyższej oceny formalnej i merytorycznej oraz treści pracy doktorskiej mgr Beaty Łachtary stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018r w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora

(Dz. U. 2018 poz. 261.) W związku z powyższym stawiam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Beaty Łachtary oraz dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy mojej oceny uważam że, recenzowana praca zasługuje na wyróżnienie Dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego -Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach bowiem wnosi istotny wkład w poznanie budowy genomu dwóch serogrup *Listerii monocytogenes* oraz oporności na substancje przeciwbakteryjne i niekorzystne warunki środowiska.


prof. dr hab. Joanna Sztajn