

Prof. dr hab. Jarosław Bystron
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

OCENA

pracy doktorskiej mgr Moniki Kurpas

**pt. „Zróżnicowanie molekularne oraz oporność na substancje
przeciwbakteryjne szczepów *Listeria monocytogenes* pochodzących
z żywności oraz obszarów produkcji żywności”**

wykonanej w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego
w Puławach
pod kierunkiem promotora dr hab. Kingi Wieczorek. prof. instytutu

Podstawę prawną wykonania recenzji rozprawy doktorskiej stanowi uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 26.10.2018 r.

Listeria monocytogenes należy do grupy patogenów przenoszonych drogą pokarmową i stanowi wciąż istotne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi na całym świecie. Powszechne występowanie *L. monocytogenes* w środowisku powoduje, że stosunkowo często jest ona izolowana z żywności oraz ze środowiska produkcji żywności. Posiadane przez te drobnoustroje mechanizmy przystosowawcze do niekorzystnych dla nich warunków spotykanych w trakcie produkcji żywności, takich jak: chłodzenie, solenie, wędzenie czy kiszenie sprzyjają ich przetrwaniu i namnażaniu w produktach. Ponadto intensywnie postępująca globalizacja sektora spożywczego ułatwia rozprzestrzenianie się *L. monocytogenes* w łańcuchu żywnościowym. W ostatnich latach w krajach Unii Europejskiej obserwuje się stały wzrost liczby przypadków zachorowań ludzi wywołanych przez *L. monocytogenes*. Przykładowo w 2008 r. zanotowano 1425, a w 2016 r. już 2536 przypadków listeriozy. Większość chorych wymaga hospitalizacji, a śmiertelność wynosi ok. 16 % i jest jedną z największych wśród bakteryjnych zatruc pokarmowych ludzi w UE. Wszystko to powoduje, że *L. monocytogenes* stanowi niezmiernie istotny problem zarówno dla organów odpowiedzialnych za ochronę zdrowia publicznego jak i dla producentów żywności. Konieczne jest zatem stałe monitorowanie nie tylko występowania izolatów *L.*

monocytogenes w żywności, ale także dróg szerzenia się tych patogenów w łańcuchu żywnościowym. Obecnie jedynie analiza genotypowa daje możliwość precyzyjnego określenia źródła kontaminacji i dróg rozprzestrzeniania się *L. monocytogenes*. Pomocna w dochodzeniu epidemiologicznym jest również detekcja markerów warunkujących chorobotwórczość i oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe, a także czynników determinujących przetrwanie *L. monocytogenes* w żywności i środowisku produkcji żywności.

Badania dotyczące występowania *L. monocytogenes* w żywności oraz oceny ich różnicowania genetycznego były wcześniej prowadzone w Polsce, ale często miały charakter ograniczony do wąskiej grupy produktów spożywczych lub populacji bakterii, a jeśli podejmowano próbę identyfikacji genotypowej izolatów *L. monocytogenes* to zazwyczaj przy zastosowaniu tylko jednej techniki genetycznej. Wciąż brak badań wielopłaszczyznowo obejmujących analizę genotypową izolatów *L. monocytogenes* pochodzących z szerokiej gamy produktów żywnościowych i środowiska jej wytwarzania. Jedynie tego typu analiza pozwala precyzyjnie określić źródła i drogi rozprzestrzenienia się tych patogenów w żywności, a tym samym poprawić bezpieczeństwo konsumentów, czym zajęła się Autorka pracy doktorskiej.

Tematyka pracy doktorskiej mgr Moniki Kurpas obejmuje zatem aktualne i istotne zagadnienia w obszarze ochrony zdrowia publicznego związane z oceną zagrożenia dla zdrowia konsumentów powodowanego występowaniem bakterii *L. monocytogenes* w gotowej do spożycia żywności pochodzenia zwierzęcego oraz w środowisku wytwarzania żywności.

We wstępie pracy Doktorantka przedstawiła aktualną systematykę bakterii z rodzaju *Listeria* oraz szczegółowo opisała występowanie *L. monocytogenes* w środowisku, u zwierząt dzikich, gospodarskich oraz w żywności, ze szczególnym uwzględnieniem produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do bezpośredniego spożycia. Następnie omówiła patogenезę listeriozy u ludzi, a także metody identyfikacji i typowania serologicznego *L. monocytogenes*. W dalszej części Autorka opisała współczesne techniki stosowane do typowania i różnicowania genetycznego izolatów *L. monocytogenes*, trafnie podkreślając wady i zalety poszczególnych technik. Należy podkreślić, że informacje zawarte w każdym podrozdziale wstępu są aktualne i zaprezentowane w przejrzysty sposób. Niewątpliwą zaletą tej części pracy są zamieszczone w niej ryciny syntetycznie obrazujące omawiane zagadnienia.

W rozdziale „Cel badań” Autorka przedstawiła główny cel pracy doktorskiej, którym jest charakterystyka izolatów *L. monocytogenes* pochodzących z żywności pochodzenia zwierzęcego i środowiska jej produkcji w Polsce. Następnie w pięciu punktach wymieniła szczegółowe zadania badawcze służące do realizacji głównego celu, którymi są: (1) określenie zróżnicowania izolatów *L. monocytogenes* pochodzących z mięsnych produktów surowych gotowych do spożycia, wędlin poddanych obróbce termicznej oraz z obszarów produkcji żywności, (2) ocena wrażliwości izolatów na substancje przeciwdrobnoustrojowe, (3) określenie ich potencjału chorobotwórczego, (4) ocena pokrewieństwa filogenetycznego badanych *L. monocytogenes* z izolatami pochodzącymi z przypadków klinicznych listeriozy oraz (5) określenie potencjału różnicującego metod genotypowych użytych do typowania molekularnego *L. monocytogenes*.

Rozdział „Materiał i metody”, składający się z dziewięciu podrozdziałów, Doktorantka poświęciła na opis:

- sposobu pozyskiwania i doboru izolatów *L. monocytogenes* do badań,
- serotypowania molekularnego izolatów przy zastosowaniu techniki PCR,
- oznaczania oporności izolatów *L. monocytogenes* na substancje przeciwdrobnoustrojowe,
- wykrywania obecności genów wirulencji należących do internalin oraz zawartych w wyspie patogenności LIPI-1 przy zastosowaniu technik multipleks PCR,
- genotypowania izolatów przy zastosowaniu technik: - PFGE, MLST i MVLST,
- przeprowadzenia sekwencjonowania genomu izolatów techniką NGS oraz wykorzystania uzyskanych sekwencji do analizy filogenetycznej *L. monocytogenes* metodą cgMLST, a także określenia obecności genów wirulencji oraz oporności na czynniki środowiskowe i przeciwbakteryjne,
- metod zastosowanych do analizy statystycznej otrzymanych danych.

Metodyka została dobrze opisana i zaplanowana adekwatnie do założonego planu badań. Zastosowano wiele nowoczesnych technik biologii molekularnej, co obrazuje bardzo wysoki poziom badań zrealizowanych przez Doktorantkę. Drobnym niedociągnięciem jest brak danych na temat użytych pozytywnych kontroli w opisie techniki PCR zastosowanej do serotypowania molekularnego izolatów *L. monocytogenes* (podrozdział 3.2.2). Ponadto uważam, iż dla większej przejrzystości pracy informacja umieszczona w podrozdziale pt. „Analiza filogenetyczna *L. monocytogenes* z wykorzystaniem cgMLST” o wykorzystaniu przez Doktorantkę 63 genomów *L. monocytogenes* od pacjentów z listeriozą powinna być podana także na początku rozdziału „Materiały”.

W części eksperymentalnej pracy mgr Monika Kurpas wykazała, że spośród 150 badanych izolatów *L. monocytogenes* najwięcej należało do serogrup molekularnych IIa (48%) i IIc (25% izolatów). Szczepy należące do tych serogrup najczęściej notowane były w produktach surowych. Z kolei izolaty zaklasyfikowane do serogrup IIb i IVb najliczniej występowały, odpowiednio, w środowisku produkcji żywności oraz w produktach poddanych obróbce termicznej.

Oceniając lekooporność szczepów *L. monocytogenes* stwierdziła, że były one odporne na 3 substancje przeciwdrobnoustrojowe tj. daptomycynę (93% izolatów), oksacylinę (53%) i ceftriakson (35% izolatów). Jednocześnie oporność na wszystkie trzy wymienione substancje przeciwdrobnoustrojowe Doktorantka wykazała u 28% izolatów. Kolejne 28% izolatów było opornych na dwie substancje, najczęściej na daptomycynę i oksacylinę,

Mgr Monika Kurpas badając dystrybucję genów wirulencji wykazała, że analizowana przez nią populacja bakterii *L. monocytogenes* posiada duży potencjał chorobotwórczy, gdyż obecność genów internalin (*inlA*, *inlB*, *inlC* i *inlJ*) stwierdziła u wszystkich badanych izolatów. Większość izolatów (96%) posiadało także geny wirulencji należące do wyspy patogenności LIP-I (*prfA*, *plcA*, *plcB*, *hly*, *mpl* oraz *actA*).

Analizując różnicowanie genetyczne przy zastosowaniu techniki PFGE, z użyciem dwóch enzymów restrykcyjnych, Autorka zaklasyfikowała badane izolaty *L. monocytogenes* do 29 pulsotypów. Największy poziom różnicowania wykazała wśród izolatów należących do serogrupy IIa (17 pulsotypów), a najmniejszy w puli izolatów z serogrupy IIc (2 pulsotypy). Ponadto przeprowadzana przez Autorkę analiza statystyczna wykazała, że największym podobieństwem genetycznym cechowały się izolaty pochodzące z produktów surowych i ze środowiska produkcji żywności. Zastosowana przez Doktorantkę technika MLST wykazała także duże różnicowanie genetyczne populacji *L. monocytogenes*. Badane 150 izolatów zaklasyfikowała do 24 typów sekwencyjnych, wśród których dominowały ST9, ST121 oraz ST8. Do tych typów sekwencyjnych należały izolaty zarówno pozyskane z żywności jak i ze środowiska jej produkcji. Podobnie jak w przypadku różnicowania techniką PFGE wykonana analiza statystyczna wykazała, że największe podobieństwo genetyczne wystąpiło między izolatami pochodzącymi z produktów surowych i ze środowiska produkcji żywności. Kolejna zastosowana przez Autorkę technika różnicowania genetycznego MVLST wykazała obecność 21 typów wirulencji (VT) wśród których przeważały VT11, VT94 i VT21. Podobnie jak w przypadku wyników uzyskanych w metodach PFGE i MLST izolaty zaklasyfikowane do najbardziej licznych typów VT pochodziły ze wszystkich badanych grup

próbek, a największym podobieństwem genetycznym charakteryzowały się izolaty pochodzące z produktów surowych i ze środowiska wytwarzania żywności. Porównując potencjał różnicujący zastosowanych technik genetycznych Autorka wykazała, na podstawie współczynnika różnicowania Simpsona (SID), że metody PFGE oraz MLST posiadają porównywalny potencjał różnicujący i jest on statystycznie wyższy niż techniki MVLST.

W kolejnym etapie badań mgr Monika Kurpas przeprowadziła sekwencjonowanie genomu 40 wybranych izolatów *L. monocytogenes* (16 z serogrupy IIb i 24 z IVb) i oceniła ich zróżnicowanie genetyczne metodą cgMLST. W badanej grupie zidentyfikowała 21 typów cgMLST (CT). W puli izolatów z serogrupy IIb najwięcej z nich należało do typu CT2323, a wśród izolatów z serogrupy IVb do typu CT375. Bardzo interesującą częścią pracy Doktorantki było oznaczenie podobieństwa genetycznego, metodą cgMLST, powyższych 40 izolatów *L. monocytogenes* ze szczepami wyizolowanymi od osób chorujących na listeriozę w Polsce. W badaniach tych Doktorantka wykazała obecność izolatów pochodzących z żywności i środowiska jej wytwarzania bardzo blisko genetycznie spokrewnionych ze szczepami *L. monocytogenes* wyizolowanymi od chorych, co jednoznacznie dowodzi, że żywność może być źródłem zakażenia ludzi.

Uzyskane sekwencje genomów 40 izolatów *L. monocytogenes* Autorka analizowała także w kierunku obecności genów wirulencji i genów warunkujących odporność na stres. Większość z izolatów posiadała wszystkie badane przez Doktorantkę geny wirulencji, co wskazuje na ich wysoki potencjał patogenny. Niektóre z izolatów posiadały także geny determinujące tolerancję na chlorki benzalkoniowe, niskie pH i wysokie stężenie soli, co umożliwia drobnoustrojom efektywniejsze przetrwanie w żywności i środowisku jej produkcji.

Mgr Monika Kurpas analizując sekwencje genomów izolatów *L. monocytogenes* w części z nich stwierdziła mutację w genie *inlB* spowodowaną delecją 141 nukleotydów. Wpływ tej mutacji na funkcjonowanie białka InlB dotychczas nie jest znany. Ponadto w niektórych izolatach Autorka zidentyfikowała mutację w genie *inlA*, powodującą powstanie przedwczesnego kodonu STOP. Izolaty z tego typu mutacją były wcześniej identyfikowane i uważane są za mniej zjadliwe dla ludzi, ponieważ efektem mutacji jest powstanie skróconej formy białka InlA.

Podsumowując rozdział „Wyniki” należy podkreślić, że wszystkie wyniki badań, mimo ich mnogości i często skomplikowanego charakteru zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny i uporządkowany. Ponadto zostały zilustrowane licznymi przejrzystymi tabelami i wysokiej jakości rycinami.

W rozdziale „Omówienie wyników” Doktorantka w sposób rzeczowy i dojrzały konfrontuje uzyskane wyniki badań własnych z dostępną literaturą. Obszerna polemika zawiera wiele trafnych stwierdzeń i komentarzy. Autorka wyczerpująco omawia wyniki pracy odwołując się do aktualnej literatury przedmiotu. Piśmiennictwo zawiera 150 anglojęzycznych pozycji literaturowych, w zdecydowanej większości opublikowanych po 2010 roku.

Wyniki badań własnych Autorka zebrała w postaci ośmiu precyzyjnych i zwięzłe sformułowanych wniosków odpowiadających celom pracy. Na uwagę zasługuje ogrom pracy Autorki poświęconej na realizację i opisanie ocenianej dysertacji.

Najważniejszym osiągnięciem recenzowanej pracy jest wykazanie dużego poziomu zróżnicowania genetycznego bakterii *L. monocytogenes* pochodzących z żywności i środowiska jej produkcji oraz wskazanie na zależność pomiędzy przynależnością do określonej serogrupy a źródłem pochodzenia izolatu. Ważnym osiągnięciem jest także identyfikacja izolatów o tych samych genotypach w próbkach pobieranych na przestrzeni kilku lat, co wskazuje na rozprzestrzenienie i trwałość niektórych klonów *L. monocytogenes* w łańcuchu wytwarzania żywności. Ponadto Autorka wykazała, że spośród zastosowanych przez nią technik typowania genetycznego, metody PFGE i MLST posiadają większy potencjał różnicujący w porównaniu do techniki MVLST.

Istotnym osiągnięciem pracy jest również wykazanie wysokiego podobieństwa genetycznego pomiędzy izolatami *L. monocytogenes* wyosobnionymi z żywności i ze środowiska jej produkcji a szczepami pochodzącymi od pacjentów z listeriozą w Polsce, co jednoznacznie dowodzi, że żywność może być źródłem zatrucia ludzi bakteriami *L. monocytogenes*.

Wcześniejsze drobne krytyczne uwagi zawarte w recenzji w żadnym stopniu nie umniejszają bardzo wysokiej merytorycznej wartości wyników uzyskanych przez mgr Monikę Kurpas, a jedynie mają charakter porządkowy.

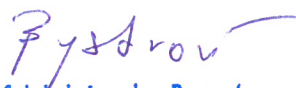
Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Kurpas pt. „Zróżnicowanie molekularne oraz oporność na substancje przeciwbakteryjne szczepów *Listeria monocytogenes* pochodzących z żywności oraz obszarów produkcji żywności” odpowiada

warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

W oparciu o przedstawioną wyżej pozytywną ocenę przedkładałam wniosek Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie mgr Moniki Kurpas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową pracy, a szczególnie za unikalną w skali kraju kompleksową analizę zróżnicowania genetycznego bakterii *L. monocytogenes* występujących w łańcuchu żywnościowym przedkładałam wniosek Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Moniki Kurpas.

Wrocław, 26.03.2020 r.


prof. dr hab. Jarosław Bystron