

AUTOREFERAT

Dr n. wet. Ewa Wałęcka-Zacharska

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Wrocław, 2019

1. Imię i nazwisko

Ewa Wałęcka-Zacharska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2012 doktor nauk weterynaryjnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotor: prof. dr hab. Jacek Bania

Tytuł rozprawy doktorskiej: Badanie wpływu stresu środowiskowego na wirulencję *Listeria monocytogenes*.

2008 magister biotechnologii

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotor: Dr hab. Anna Dąbrowska

Tytuł pracy magisterskiej: Charakterystyka genotypowa *Enterococcus faecalis*.

2006 inżynier biotechnologii

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2014 – obecnie: adiunkt, Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

2011 – 2013: asystent, Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

2008 – 2011: studia doktoranckie, Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Badania molekularnych podstaw inwazyjności *L. monocytogenes* i jej zmian indukowanych stresem środowiskowym.

4.2 Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Rozprawę habilitacyjną stanowi monotematyczny cykl 4 prac oryginalnych. Łączna wartość współczynnika *Impact factor* w roku opublikowania prac wynosi 8,705.

P1) Wałęcka-Zacharska E, Kosek-Paszkowska K, Bania J, Karpíšková R, Stefaniak T. Salt stress-induced invasiveness of major *Listeria monocytogenes* serotypes. *Lett Appl Microbiol* 2013, 56, 216-221 (MNiSW 20, IF 1,622).

Udział własny: opracowanie koncepcji badań oraz metodyki, przeprowadzenie badań inwazyjności *L. monocytogenes*, wytworzenie białka rekombinowanego, oznaczenie pokrewieństwa genetycznego szczepów, oznaczenie poziomu białek metodą Western blotting, analiza i interpretacja wyników oraz przygotowanie manuskryptu.

P2) Wałęcka-Zacharska E, Kosek-Paszkowska K, Bania J, Staroniewicz Z, Bednarski M, Wieliczko A. Invasiveness of *L. monocytogenes* strains isolated from animals in Poland. *Pol J Vet Sci* 2015, 18, 697-702 (MNiSW 20, IF 0,719).

Udział własny: opracowanie koncepcji badań oraz metodyki, przeprowadzenie badań inwazyjności *L. monocytogenes*, oznaczenie pokrewieństwa genetycznego szczepów, sekwencjonowanie genów *inlAB*, analiza i interpretacja wyników oraz przygotowanie manuskryptu.

P3) Wałęcka-Zacharska E, Gmyrek R, Skowron K, Kosek-Paszkowska K, Bania J. Duration of heat stress effect on invasiveness of *L. monocytogenes* strains. *BioMed Res Int* 2018, 1457480 (MNiSW 25, IF 2,197).

Udział własny: opracowanie koncepcji badań oraz metodyki, przeprowadzenie części badań inwazyjności *L. monocytogenes* oraz badań ekspresji genów wirulencji i odpowiedzi na stres, analiza i interpretacja uzyskanych wyników oraz przygotowanie manuskryptu.

P4) Wałęcka-Zacharska E, Korkus J, Skowron K, Wietlicka-Piszcz M, Kosek-Paszkowska K, Bania J. Effect of temperatures used in food storage on duration of heat stress induced invasiveness of *L. monocytogenes*. *Microorganisms* 2019, 7, 467 (MNiSW 20, IF 4,167).

Udział własny: opracowanie koncepcji badań oraz metodyki, przeprowadzenie części badań inwazyjności *L. monocytogenes*, analiza i interpretacja uzyskanych wyników oraz przygotowanie manuskryptu.

4.3 Omówienie celu naukowego osiągnięcia

4.3.1. Wprowadzenie

Żywność stanowi nie tylko źródło składników odżywczych niezbędnych do prawidłowego rozwoju człowieka, ale także doskonałe środowisko rozwoju drobnoustrojów, w tym mikroorganizmów patogennych. Zanieczyszczona patogenami żywność jest potencjalnym źródłem ich transmisji do przewodu pokarmowego ludzi. Spożycie zanieczyszczonej patogenami żywności przez ludzi może prowadzić do rozwoju zachorowań, które w skrajnych przypadkach mogą mieć również skutek śmiertelny. Mimo zwiększonego nadzoru nad produkcją żywności drobnoustroje chorobotwórcze w dalszym ciągu stanowią zagrożenie zdrowia publicznego. Dominującymi mikroorganizmami patogennymi przenoszonymi przez żywność są *Salmonella*, *Campylobacter* oraz enterokrwotoczne serotypy *Escherichia coli*. Światowa Organizacja Zdrowia rocznie notuje ok. 600 milionów infekcji pokarmowych, w tym 420 000 zgonów (WHO, 2019). Następstwem rozwoju chorób przenoszonych przez żywność są także wysokie straty ekonomiczne związane głównie z kosztami hospitalizacji i rehabilitacji ludzi. W Stanach Zjednoczonych straty te szacuje się rocznie na 36 miliardów dolarów (Minor i wsp., 2015).

Z punktu widzenia zdrowia publicznego *Listeria monocytogenes* jest jednym z najważniejszych patogenów przenoszonych przez żywność. Ta Gram-dodatnia pałeczka, nie wytwarza przetrwalników i jest szeroko rozpowszechniona w środowisku. Występuje ona m.in. w glebie, wodzie, ściekach oraz gnijącej roślinności. Bakteria ta wykazuje znaczną odporność na działanie czynników środowiska i potrafi przetrwać w szerokim zakresie temperatur (0,1-45°C) oraz pH (5,5-9,5). Znosi także wysokie stężenia soli w środowisku (Radoshevich i Cossart, 2018). U ludzi zdrowych zakażenia wywołane przez *L. monocytogenes* mogą przebiegać bezobjawowo lub przybierają łagodną formę, wyrażając się najczęściej w postaci zapalenia żołądka i jelit. U osób z obniżoną odpornością, w tym osób starszych, kobiet ciężarnych, noworodków oraz nosicieli wirusa HIV konsekwencją zakażenia *L. monocytogenes* może być sepsa, a także zapalenie opon mózgowych. W przypadku kobiet ciężarnych skutkiem zakażenia *L. monocytogenes* może być obumarcie płodu lub poronienie. Przebieg zakażeń *L. monocytogenes* o ciężkim przebiegu związany jest ze zdolnością patogenu do wnikania do komórek naturalnie niefagocytyujących oraz z przystosowaniami do przemieszczania się w cytoplazmie komórek eukariotycznych i rozprzestrzeniania się wśród komórek sąsiadujących. Posiadając takie właściwości *L. monocytogenes* może pokonywać naturalne bariery obronne organizmu jak barierę jelitową, krew-mózg oraz łożyskową. Częstotliwość występowania listeriozy waha się od 0,1 do 11,3 przypadków na milion ludzi, jednak współczynnik śmiertelności w przypadku rozwoju listeriozy inwazyjnej wynosi od 10% do 30%. W krajach rozwijających się jak Republika Południowej Afryki współczynnik śmiertelności listeriozy osiąga nawet 50% (Swaminathan i Gerner-Smidt, 2007). Według danych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority, EFSA) odsetek śmiertelności związany z rozwojem listeriozy u ludzi jest najwyższy spośród wszystkich chorób przenoszonych drogą pokarmową (EFSA, 2018). Pierwszy przypadek masowej listeriozy opisano w Kanadzie w roku 1981. Objął on 7 osób dorosłych oraz 34 dzieci nienarodzonych, a jego konsekwencją było 9 przypadków poronień i 9 zgonów. Jako źródło patogenów wytypowano surówkę z kapusty spożytą przez ludzi, których dotknęła listerioza. Od tego czasu na świecie zanotowano wiele zbiorowych

przypadków listeriozy związanych z konsumpcją żywności zanieczyszczonej pałeczkami *L. monocytogenes*. Jak dotąd największe ognisko listeriozy opisano w północnych Włoszech. Stwierdzono je w roku 1997, a związane było ze spożyciem sałatki z kukurydzy i tuńczyka zanieczyszczonej *L. monocytogenes*. Dotknęło ono 1566 osób, jednak nie odnotowano przypadków śmiertelnych. Największą liczbę śmiertelnych ofiar zbiorowej listeriozy zanotowano w Republice Południowej Afryki. W okresie od stycznia 2017 do lipca 2018 stwierdzono tam 1060 przypadków listeriozy, w tym 216 ze skutkiem śmiertelnym. Zidentyfikowanym źródłem patogenów były przetworzone produkty mięsne.

Według danych EFSA liczba przypadków listeriozy w krajach Unii Europejskiej znacząco wzrosła w latach 2008-2015. W roku 2017 odnotowano 2480 przypadków listeriozy, w tym 227 przypadków ze skutkiem śmiertelnym (EFSA, 2018). W Polsce, zgodnie z danymi Państwowego Zakładu Higieny, w latach 2004-2018 zanotowano systematyczny wzrost liczby przypadków listeriozy. W latach 2004-2008 stwierdzono 28 przypadków zachorowań, w 2013 roku 54, a w roku 2016 99 przypadków listeriozy. W 2018 roku na listeriozę zachorowały 124 osoby, co stanowi wzrost o 8 przypadków w stosunku do roku 2017.

Ponad 90% przypadków listeriozy ludzi związanych jest z konsumpcją zanieczyszczonej pałeczkami *L. monocytogenes* żywności nie wymagającej obróbki termicznej. Częstym źródłem zakażenia ludzi są ryby i produkty rybne, produkty mięsne, sery i produkty mleczne (Allen i wsp., 2016).

W procesie produkcji żywności *L. monocytogenes* narażona jest na wiele niekorzystnych czynników środowiska, takich jak wysokie zasolenie, niskie pH, niskie lub wysokie temperatury. Bakterie poddane stresowi środowiskowemu zmieniają swój metabolizm, co ułatwia im przetrwanie w niekorzystnych warunkach. Zmiana metabolizmu możliwa jest dzięki uruchomieniu przez bakterie mechanizmów odpowiedzi na stres, co związane jest min. z aktywacją alternatywnych czynników sigma. Alternatywne czynniki sigma to czynniki transkrypcyjne, kontrolujące ekspresję określonego zestawu genów. Czynniki alternatywne nie są aktywne w warunkach optymalnych dla rozwoju bakterii, zaś w warunkach stresu ulegają aktywacji i odpowiadają za inicjację transkrypcji specyficznego zestawu genów. W efekcie bakteria może wytworzyć białka o rozmaitych aktywnościach łagodzące skutki działania stresu, które nie są obecne w komórkach bakterii w warunkach normalnych. Jednym z najlepiej poznanych alternatywnych czynników sigma u *L. monocytogenes* jest σ^B . Czynnikiem ten w optymalnych warunkach wzrostu bakterii utrzymywany jest w formie nieaktywnej za pośrednictwem białka RsbW, a do jego aktywacji dochodzi w warunkach stresu środowiskowego oraz niedoboru składników odżywczych (Kazmierczak i wsp., 2005). Czynnikiem ten kontroluje u *L. monocytogenes* ekspresję ponad 140 genów związanych z odpowiedzią na stres osmotyczny, oksydacyjny, wysokie ciśnienia hydrostatyczne, a także stres związany z niskim pH oraz niskimi temperaturami (Melo i wsp., 2015). Stwierdzono, że σ^B wpływa również na wirulencję *L. monocytogenes*. Czynnikiem ten reguluje transkrypcję genu hydrolazy żółciowej (*bsh*), umożliwiającej przeżycie w środowisku soli żółciowych i kolonizację jelita. Co warto podkreślić σ^B reguluje także transkrypcję genów *inlAB* kodujących internaliny, kluczowe białka w procesie inwazji różnego rodzaju komórek nefagocytujących (Kazmierczak i wsp., 2003). Pod kontrolą σ^B znajduje się także gen *prfA*. Białko PrfA jest kluczowym regulatorem genów wirulencji. Jest

ono aktywowane w temperaturze 37°C, zaś w niższych temperaturach pozostaje nieaktywne. Uważa się, że aktywacja PrfA w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała zwierząt i ludzi umożliwia patogenowi kolonizację komórek eukariotycznych. PfrA kontroluje ekspresję genów niezbędnych do rozprzestrzeniania się *L. monocytogenes* wewnątrz komórek eukariotycznych, w tym genów odpowiedzialnych za ucieczkę z fagosomu do cytozolu komórki (*hly*, *plcA*, *plcB*) oraz genu kodującego białko ActA zapewniające ruch patogenu w cytozolu i przenikanie do sąsiednich komórek. Stwierdzono, że regulacja transkrypcji locus *inlAB* może odbywać się bezpośrednio przy udziale σ^B lub za pośrednictwem *prfA* (Kazmierczak i wsp. 2005).

Stwierdzenie możliwości zmian wirulencji w reakcji na niekorzystne czynniki środowiska, którym *L. monocytogenes* musi się przeciwstawić np. w trakcie przechodzenia przez przewód pokarmowy ludzi stworzyło nowy obszar badawczy. Od wielu lat poszukiwane są cechy odróżniające szczepy *L. monocytogenes* o wysokiej i niskiej wirulencji. Posiadanie przystosowań wyrażających się wzrostem wirulencji w odpowiedzi na stres może być jedną z poszukiwanych cech odpowiedzialnych za wysoką zjadliwość niektórych szczepów *L. monocytogenes*.

W ciągu ostatnich lat opracowano wiele metod pozwalających na badania wirulencji naturalnych szczepów *L. monocytogenes*, w tym testy *in vivo* z użyciem zwierząt laboratoryjnych (mysz, kawia domowa, małpa), bezkręgowców (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Galleria mellonella*) oraz testy *in vitro* (linia ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy Caco-2, linia ludzkiego raka okrężnicy HT-29, linia ludzkiej hepatomy Hep-G2, linia mysich makrofagów J774) (Rakic i wsp. 2017). Modele zwierzęce uznawane są za rozwiązanie optymalne w ocenie wirulencji patogenów, jednak z ich wykorzystaniem wiążą się znaczne koszty i aspekty etyczne. Bezkręgowce stanowią łatwy do manipulowania i niedrogi model, ale nie wszystkie rozwijają się optymalnie w temperaturze ludzkiego organizmu, w której z kolei należy prowadzić badania nad wirulencją *L. monocytogenes* i mogą generować trudności w precyzyjnym podawaniu inokulum.

Głównymi zaletami testów *in vitro* jest łatwość wykonania, niskie koszty, względna szybkość wykonania pomiarów. Wiele z tego typu modeli nie odzwierciedla jednak w pełni warunków jakie zapewniają modele zwierzęce. W testach *in vitro* oddziaływanie bakterii ogranicza się do jednego typu komórek. Ograniczona jest też możliwość oceny odpowiedzi organizmu gospodarza. Testy *in vitro* nie dają także możliwości oceny wpływu przejścia bakterii przez przewód pokarmowy na metabolizm badanego mikroorganizmu. Wiadomo bowiem, że warunki panujące w przewodzie pokarmowym mogą w znacznym stopniu wpływać na wzrost i metabolizm bakterii (Law i wsp. 2013). Badania przeprowadzone przez Roche i wsp. (2001) wykazały jednak, że tzw. test tworzenia łysinek (ang. Plaque Forming Assay, PFA), w którym ocenia się inwazyjność oraz zdolność rozprzestrzeniania się *L. monocytogenes* w monowarstwie komórek niektórych ludzkich linii pozwala na rozróżnienie szczepów wirulentnych, słabo wirulentnych i szczepów o znikomej wirulencji. Stwierdzono także, iż wyniki oceny wirulencji *L. monocytogenes* testem PFA w wysokim stopniu zgadzają się z wynikami testów na zwierzętach. Test PFA uznaje się zatem za dobrą alternatywę dla testów *in vivo* do oceny wirulencji *L. monocytogenes* (Roche i wsp. 2001).

4.3.2. Cel naukowy osiągnięcia

L. monocytogenes jest jedną z niewielu bakterii doskonale przystosowanych do życia i rozmnażania się w cytoplazmie komórek eukariotycznych i stanowi model w badaniach efektu stresu na przeżywalność, a przede wszystkim wirulencję patogenów wewnątrzkomórkowych. Wiadomo, iż wirulencja *L. monocytogenes* jest zróżnicowana, jednak mało jest danych na temat molekularnych podstaw tego zjawiska. Wiadomo, że stres środowiskowy może modyfikować wirulencję bakterii. Dotychczas ukazało się kilkadziesiąt prac demonstrujących wpływ różnych czynników środowiskowych, w tym niskiego pH, stresu oksydacyjnego, stresu osmotycznego, wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, niskiej oraz wysokiej temperatury na zdolność do inwazji szczepów *L. monocytogenes*. Jednak zakres zmian inwazyjności w odpowiedzi na stres w populacji *L. monocytogenes* był nieznany. Mało wiadomo było również na temat powiązania ekspresji czynników wirulencji *L. monocytogenes* i zmian wirulencji w odpowiedzi na stres. Praktycznie niedostępne były dane na temat czasu utrzymywania się wywołanych stresem zmian wirulencji *L. monocytogenes*. Z tego względu ocena realnego znaczenia zmian inwazyjności pod wpływem stresu nie była dotąd możliwa.

Wymienione przesłanki skłoniły mnie do podjęcia badań mających na celu:

- określenie zakresu zmian inwazyjności w odpowiedzi na stres w grupie szczepów reprezentujących zasadnicze grupy genetyczne oraz najważniejsze serotypy *L. monocytogenes*,
- zbadanie ekspresji najważniejszych internalin w odpowiedzi na wybrane rodzaje stresu w szczepach *L. monocytogenes*,
- analizę polimorfizmu sekwencji białek InlA i InlB w szczepach *L. monocytogenes* różniących się zdolnością do wnikania do ludzkich komórek raka okrężnicy
- określenie czasu utrzymywania się zmian inwazyjności wywołanych stresem w warunkach optymalnych dla wzrostu *L. monocytogenes* i w warunkach spotykanych w trakcie przechowywania żywności.

4.3.3 Omówienie wyników osiągnięcia naukowego

P1) Wałęcka-Zacharska E, Kosek-Paszkowska K, Bania J, Karpíšková R, Stefaniak T. Salt stress-induced invasiveness of major *Listeria monocytogenes* serotypes. *Lett Appl Microbiol* 2013, 56, 216-221.

P2) Wałęcka-Zacharska E, Kosek-Paszkowska K, Bania J, Staroniewicz Z, Bednarski M, Wieliczko A. Invasiveness of *L. monocytogenes* strains isolated from animals in Poland. *Pol J Vet Sci* 2015, 18, 697-702.

L. monocytogenes jest najważniejszym, z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności, gatunkiem z rodzaju *Listeria*. Za pomocą metod genetycznych oraz fenotypowych szczepy *L. monocytogenes* podzielono na grupy genetyczne. Wyróżnia się obecnie przynajmniej 4 ewolucyjne grupy genetyczne szczepów *L. monocytogenes*, a w ich obrębie co najmniej 13 serotypów. Stwierdzono, że szczepy *L. monocytogenes* w obrębie niektórych z tych grup mogą

zasiedlać różne nisze ekologiczne, mogą też różnić się potencjałem infekcyjnym. Większość scharakteryzowanych dotąd szczepów *L. monocytogenes* zaliczono do grupy I (serotyp 1/2b, 3b, 3c, 4b) oraz II (serotyp 1/2a, 1/2c, 3a) (Orsi i wsp. 2008). Wykazano, że szczepy należące do I grupy genetycznej bardziej efektywnie wnikają i rozprzestrzeniają się w komórkach nabłonka niż szczepy klasyfikowane do grupy II (Zhou i wsp., 2005). Spośród 13 serotypów *L. monocytogenes* 95% wszystkich infekcji wywołanych jest przez serotypy 1/2a, 1/2b oraz 4b, z których 4b odpowiedzialny jest za większość zakażeń.

Analiza porównawcza genomów szczepów *L. monocytogenes* serotypu 1/2a i 4b wykazała różnice w sekwencji wielu genów, co może wpływać na przeżywalność, wzrost i patogenność szczepów reprezentujących te serotypy (Nelson i wsp., 2004). Wykazano, że szczepy 4b lepiej przeżywają wstrząs termiczny po uprzednim przechowywaniu w warunkach chłodniczych i wykazują wyższą tolerancję na wysokie stężenia chlorku sodu w środowisku oraz niskie pH w temperaturze 30°C (Buncic i wsp., 2001; van der Veen i wsp., 2008). Stres osmotyczny jest jednym z niekorzystnych czynników najczęściej spotykanych przez *L. monocytogenes* zarówno w procesie produkcji żywności oraz w organizmie gospodarza. Wcześniejsze badania, w tym badania własne, wykazały że stres osmotyczny może modyfikować inwazyjność patogenu (Wałęcka i wsp. 2011 - **P12**, Olesen i wsp., 2009). Wydaje się, że lepsze zdolności przystosowawcze niektórych szczepów do niekorzystnych warunków mogą stanowić element ich zwiększonej wirulencji.

W publikacji **P1** podjęłam próbę określenia zakresu zmian inwazyjności w odpowiedzi na stres osmotyczny wśród szczepów *L. monocytogenes*. Populacja obejmująca 41 szczepów *L. monocytogenes*, reprezentujących główne grupy genetyczne I i II, zawierające szczepy należące do trzech serotypów: 1/2a, 1/2b i 4b, została poddana działaniu 0.3M chlorku sodu przez 10 minut w 37°C. Następnie bakterie poddane działaniu soli wraz z bakteriami nie traktowanymi chlorkiem sodu, użyto do zakażenia linii ludzkiego raka okrężnicy HT-29. Wirulencję bakterii określano za pomocą testu tworzenia łąsinek. Wykazano, iż zdolność do inwazji, określana liczbą łąsinek oraz zdolność do rozprzestrzeniania się w monowarstwie komórek, wyrażona średnicą łąsinki, były znacząco wyższe w szczepach należących do grupy genetycznej I niż grupy II. Potwierdziło to wcześniejsze wyniki Zhou i wsp. (2005). Ponadto dowiedziono, iż szczepy *L. monocytogenes* należące do serotypu 4b bardziej efektywnie wnikają i rozprzestrzeniają się w komórkach HT-29 niż szczepy serotypu 1/2a. Badanie wpływu stresu osmotycznego na wirulencję *L. monocytogenes* wykazało, że stres osmotyczny wpływał na zdolność do inwazji, ale nie na zdolność do rozprzestrzeniania się bakterii. Nie zaobserwowano różnic w inwazyjności w warunkach zwiększonego stężenia chlorku sodu pomiędzy szczepami grupy I i II oraz między szczepami klinicznymi i pochodzącymi z żywności. Stwierdzono jednak istotnie wyższą inwazyjność szczepów o serotypie 4b w porównaniu z 1/2a. Szczepy 4b są zatem nie tylko najbardziej wirulentne spośród najważniejszych serotypów *L. monocytogenes*, ale także w najwyższym stopniu zwiększają inwazyjność w odpowiedzi na stres osmotyczny.

Kluczowymi czynnikami umożliwiającymi bakterii wniknięcie do komórek niefagocytujących są internaliny InlA oraz InlB. W obrębie locus *inlAB* znajduje się 6 promotorów, z których jeden (P3inlA) zależny jest od PrfA, a dwa (P4inlA, P2inlB) pozostają pod kontrolą σ^B (Kazmierczak i wsp., 2003). Ponieważ σ^B aktywowany jest w

niekorzystnych warunkach, w tym w warunkach podwyższonego ciśnienia osmotycznego, stres powinien wpływać także na ekspresję białek internalin. Podaje się, że udział białka InIA w inwazji komórek nabłonka jest bardziej znaczący niż InIB (Kim i wsp., 2004; Kim i wsp., 2005), dlatego też zbadałam poziom tego białka metodą Western blot w czterech szczepach wyróżniających się najwyższą i w czterech szczepach najniższą inwazyjnością po indukcji stresem osmotycznym. Aby wyprodukować przeciwciała anty-InIA, wprowadziłam fragment genu *inIA* do plazmidowego wektora pGEX-4T-2 poprzez klonowanie, a uzyskany konstrukt wprowadziłam na drodze transformacji do kompetentnych komórek laboratoryjnego szczepu *E. coli*. Rekombinowane białko InIA oczyszczono i użyto do immunizacji królika. Otrzymaną surowicę oczyszczono metodą chromatografii powinowactwa na złożu z rekombinowanym białkiem InIA. Analiza metodą Western blot ujawniła, że we wszystkich czterech szczepach wyróżniających się najwyższą inwazyjnością w odpowiedzi na stres osmotyczny stwierdzono wyższy poziom białka InIA niż w szczepach nie poddanych działaniu stresu. Stwierdziłam, że wzrostowi inwazyjności bakterii towarzyszy wzrost poziomu InIA, wskazując że zmiany inwazyjności w odpowiedzi na stres osmotyczny mogą być związane ze zmianami ekspresji białka InIA. W przypadku szczepów, w których zarejestrowano spadek inwazyjności w odpowiedzi na stres nie zaobserwowano różnic w poziomie białka w porównaniu ze szczepami kontrolnymi, co może wskazywać na udział innych czynników w tym procesie.

Uzyskane przeze mnie wyniki mogą w części wyjaśniać wysoki potencjał infekcyjny szczepów 4b *L. monocytogenes*.

Według szacunków nawet do 21% populacji *L. monocytogenes* stanowią szczepy o znikomej wirulencji oraz szczepy praktycznie niewirulentne (Roche i wsp., 2005). Niewiele wiadomo jednak na temat molekularnych podstaw tego zjawiska. Ważnym rezerwuarem pałeczek *L. monocytogenes* są zwierzęta gospodarskie. Szacuje się że nawet 50% zwierząt gospodarskich może być bezobjawowymi nosicielami tych pałeczek. *L. monocytogenes*, po raz pierwszy opisana jako przyczyna monocytozy u gryzoni, może wywoływać zapalenie mózgu i opon mózgowych oraz ronięcia i obumieranie płodu u przeżuwaczy. Za główną przyczynę listeriozy zwierząt podaje się niskiej jakości kiszonkę (Nightingale i wsp. 2004). Mało jest jednak doniesień na temat inwazyjności i zdolności do rozprzestrzeniania się w liniach komórek nabłonka zwierzęcych szczepów *L. monocytogenes*. Dlatego też celem publikacji P2 była charakterystyka szczepów wyisobnionych od zwierząt oraz próba wyjaśnienia molekularnego podłoża różnic w inwazyjności szczepów *L. monocytogenes*. Badania przeprowadzono na 18 szczepach *L. monocytogenes*, należących do dwóch grup genetycznych oraz trzech serogrup. W swoich badaniach wykazałam bardzo duże zróżnicowanie szczepów *L. monocytogenes* pod względem zdolności do wnikania do komórek linii ludzkiego nabłonka. Prawie 40% szczepów charakteryzowało się znikomą zdolnością do inwazji komórek HT-29. W obu badanych grupach genetycznych stwierdziłam znaczące różnice w zdolności do inwazji nabłonków. Najwyższą inwazyjność wykazywały szczepy należące do serogrupy 4b(d,e), podczas gdy inwazyjność (obliczana, wyrażonym w procentach, stosunkiem liczby zaobserwowanych łysinek w monowarstwie komórek linii HT-29 do liczby komórek *L. monocytogenes* użytych w teście) w serogrupie 1/2b (3b) wynosiła poniżej 0,0001%, będąc nawet do 7,6 rzędów wielkości niższa w porównaniu z inwazyjnością szczepów serogrupy 4b(d,e). Aby wyjaśnić zaobserwowane różnice w inwazyjności badanych

szczepów *L. monocytogenes* analizowałam sekwencje białek InlA i InlB. Dotychczasowe badania wykazały, że mutacje w genie *inlA* skutkujące wytworzeniem skróconej formy tego białka mogą wiązać się z obniżoną wirulencją szczepów *L. monocytogenes* (Nightingale i wsp. 2005). Inne badania dowiodły jednak, że szczepy *L. monocytogenes* wytwarzające kompletne białko InlA także mogą wykazywać niską wirulencję (Roche i wsp. 2012). Analizując sekwencję białka InlA w 18 szczepach *L. monocytogenes* nie stwierdziłam obecności form posiadających przedwczesne kodony STOP, co mogłoby prowadzić do ekspresji skróconej formy białka. Stwierdziłam jednak liczne mutacje punktowe zarówno w białku InlA jak i InlB. W sekwencji białka InlA zlokalizowałam 29 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w stosunku do szczepu wzorcowego *L. monocytogenes* EGDe (ATCC BAA-679). Pięć z tych polimorfizmów zostało opisanych wcześniej przez Ragon i wsp. (2008). Nisko inwazyjne szczepy z grupy genetycznej I posiadały mutację Asn32Ser w peptydzie sygnałnym białka InlA, a szczepy z grupy II charakteryzowały się polimorfizmem w regionie LRR (ang. leucine rich repeat) (Ile157Leu) i trzema polimorfizmami w domenie B InlA (Asn546Asp, Val644Ile, Ala652Thr). Badania Temoin i wsp. (2008) oraz Roche i wsp. (2012) opisały 2 mutacje (Ala117Thr i Val132Ile) w regionie LRR InlB odpowiedzialnym za oddziaływanie z receptorem Met, co jest kluczowym etapem inicjacji wymuszonej endocytozy *L. monocytogenes* przez komórki nabłonkowe. Ponieważ substytucja alaniny na treoninę (Ala117Thr) zmienia hydrofobowość białka, sugerowano wpływ tej mutacji na redukcję aktywności InlB (Temoin i wsp. 2008, Roche i wsp. 2012). W moich badaniach zidentyfikowałam 44 polimorfizmy sekwencji białka InlB. Wspomniana mutacja (Ala117Thr) występowała zarówno w szczepach inwazyjnych oraz nisko inwazyjnych, lecz nie stwierdzono jej w szczepach o najniższej inwazyjności. Ponadto, w szczepach o znikomej zdolności do wnikania do komórek ludzkiego nabłonka stwierdziłam trzy unikalne, nieopisane wcześniej polimorfizmy InlB. Jeden z nich zlokalizowałam w domenie LRR (Asn76Asp), a dwa w C-końcowej części białka (Asn371Asp; Ala390Val). Stwierdziłam, że polimorfizmy te mogą mieć potencjalny związek z niskim potencjałem inwazyjnym szczepów *L. monocytogenes*, jednak potwierdzenie ich roli wymaga dalszych badań z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenezy.

Na podstawie porównania wyników publikacji P2 z wynikami publikacji P1 można wnioskować, iż szczepy o znikomym potencjale inwazyjnym występują częściej u zwierząt, niż w środowisku klinicznym oraz w żywności.

P3) Wałęcka-Zacharska E, Gmyrek R, Skowron K, Kosek-Paszkowska K, Bania J. Duration of heat stress effect on invasiveness of *L. monocytogenes* strains. *BioMed Res Int* 2018, 1457480.

P4) Wałęcka-Zacharska E, Korkus J, Skowron K, Wietlicka-Piszcz M, Kosek-Paszkowska K, Bania J. Effect of temperatures used in food storage on duration of heat stress induced invasiveness of *L. monocytogenes*. *Microorganisms* 2019, 7, 467.

Do tej pory wykazano, iż wysokie stężenia soli, niskie pH, odbiegające od optymalnej temperatury środowiska, czy obecność dezynfektantów indukują ekspresję genów wirulencji

L. monocytogenes, modyfikując zdolność inwazji nabłonków przez patogen (Pricope i wsp., 2013; Olesen i wsp., 2009). Badania, w tym badania własne, wykazały, że niska temperatura zwiększa inwazyjność bakterii, podczas gdy podwyższona temperatura obniża zdolność *L. monocytogenes* do inwazji nabłonków (Pricope-Ciolacu i wsp., 2013; Wałęcka i wsp., 2011). Nie było jednak wiadomo jak długo utrzymuje się w bakteriach indukowana stresem zmiana inwazyjności, co za tym idzie niemożliwa była ocena znaczenia tych badań dla zdrowia ludzi.

Do zagadnień tych odniosłam się w badaniach opublikowanych w pracach **P3** i **P4**. Jako czynnik stresowy wybrałam podwyższoną temperaturę z uwagi na to, że obróbka termiczna jest najskuteczniejszą i najpowszechniej stosowaną metodą redukcji liczby drobnoustrojów w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Moje wcześniejsze badania wykazały, że ogrzewanie zawiesiny bakterii przez 20 minut w 54°C znacząco redukuje liczbę bakterii, ale w dalszym ciągu jest ona wystarczająco wysoka by możliwe było oznaczenie zmian inwazyjności *L. monocytogenes* poddanych wstrząsowi cieplnemu (Wałęcka i wsp., 2011b). Podaje się, że temperaturę 54°C stwierdza się w produktach spożywczych w trakcie ich ogrzewania w kuchenkach mikrofalowych oraz w żywności poddanej niewystarczająco długiej obróbce termicznej. Patogenne mikroorganizmy zanieczyszczające żywność mogą być zatem poddawane działaniu temperatur w takim zakresie (Skandamis i wsp., 2008).

W publikacji **P3** określono długość utrzymywania się efektu stresu cieplnego na inwazyjność szczepów *L. monocytogenes* utrzymywanych po zadziałaniu stresu w temperaturze 37°C. Jest to temperatura optymalna dla wzrostu *L. monocytogenes* i jednocześnie odzwierciedla temperaturę panującą w przewodzie pokarmowym człowieka. Może być zatem odzwierciedleniem sytuacji, w której produkt zanieczyszczony *L. monocytogenes* poddaje się obróbce termicznej niezapewniającej wystarczającej redukcji patogenu i spożywa się go w krótkim czasie po obróbce.

Badania przeprowadzono na 3 szczepach *L. monocytogenes* od ludzi z klinicznymi przypadkami listeriozy oraz 7 szczepach izolowanych z żywności. Wśród szczepów znalazły się bakterie należące do 3 grup genetycznych *L. monocytogenes* oraz 5 serotypów. Bakterie ogrzane przez 20 minut w 54°C wraz z niepoddanymi działaniu podwyższonej temperatury bakteriami kontrolnymi inkubowano do 72 godzin w 37°C, a następnie oceniano ich zdolność do inwazji komórek ludzkiego raka okrężnicy HT-29. Znaczącą redukcję liczby bakterii zanotowano w 1 szczepie bezpośrednio po ekspozycji na stres cieplny oraz w 5 szczepach po 24 godzinach i w 7 szczepach po 48 godzinach od działania podwyższonej temperatury. Różnice te mogą sugerować, że redukcja liczby bakterii na skutek ogrzewania może ujawniać się dopiero w późniejszym czasie, nawet po 48 godzinach. U 60% szczepów nie poddanych działaniu stresu cieplnego zaobserwowano spadek inwazyjności w trakcie inkubacji w 37 °C. W przypadku pozostałych szczepów nie zanotowano spadku inwazyjności. Spadek inwazyjności w przypadku bakterii kontrolnych może być wynikiem wyczerpania się składników odżywczych oraz tlenu w pożywce, co również jest dla bakterii bodźcem stresowym.

Wstrząs cieplny znacząco obniżył inwazyjność wszystkich bakterii, co jest zgodne z wynikami moich poprzednich badań (Wałęcka i wsp., 2011 - **P13**). Inkubując uprzednio poddane działaniu stresu bakterie w 37°C stwierdziłam, że efekt stresu w postaci obniżenia

inwazyjności utrzymywał się od kilkunastu do 72 godzin w zależności od szczepu. W 3 szczepach poddanych działaniu stresu cieplnego w 72 godzinie inkubacji w 37°C, zdolność do inwazji komórek HT-29 była znacząco wyższa niż w bakteriach kontrolnych. Stwierdzono, że przynależność do grupy genetycznej, serotyp i źródło pochodzenia szczepów nie mają związku z długością trwania efektu stresu.

Aby wyjaśnić molekularne podłoże obserwowanych zmian inwazyjności szczepów zbadano ekspresję genów wirulencji *inlAB*, *prfA* oraz genu odpowiedzi na stres *sigB* w dwóch wybranych szczepach *L. monocytogenes*, tj. w szczepie, w którym inwazyjność w odpowiedzi na stres wzrastała najszybciej w czasie inkubacji w 37 °C oraz w szczepie, w którym inwazyjność nie ulegała zmianie. W preparatach RNA kontrolowano zanieczyszczenie genomowym DNA i określono wydajność każdej z reakcji. Dowiedziono, że wzrost inwazyjności korelował ze wzrostem poziomu transkryptów *inlAB*. Nie stwierdzono jednak związku między spadkiem inwazyjności i poziomem tych transkryptów oraz między poziomem ekspresji *prfA* i *sigB*, a inwazyjnością. Dotychczasowe badania własne oraz literatura wskazują, że ekspresja internalin nie zawsze koreluje z inwazyjnością, co może sugerować udział innych, nie branych dotąd pod uwagę czynników.

Ważnym aspektem gwarantującym bezpieczeństwo żywności jest zapewnienie odpowiednich warunków przechowywania produktów żywnościowych. Żywność wysokiego ryzyka tj., żywność łatwo psująca się, czy żywność nie spożywana od razu po obróbce termicznej, wymaga natychmiastowego schłodzenia i powinna być przechowywana w temperaturze nieprzekraczającej 5°C. Produkty takie jak chleb, żywność suszona, czy konserwy powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej (19-20°C) (McWilliams i wsp. 2004). W publikacji **P4** skupiono się na badaniach wpływu temperatury przechowywania żywności na długość utrzymywania się zmian inwazyjności *L. monocytogenes* poddanej ekspozycji na 54°C. Może to odzwierciedlać sytuację, w której produkt zanieczyszczony *L. monocytogenes* został poddany niewystarczającej obróbce termicznej, a przed spożyciem był utrzymywany w temperaturach 5°C oraz 20°C najczęściej stosowanych w przechowywaniu żywności. Długość utrzymywania się efektu ogrzewania w temperaturze 54 °C na inwazyjność zbadano w grupie 8 szczepów *L. monocytogenes* pochodzenia klinicznego i izolowanych z żywności. Bakterie poddawano 20 minutowemu ogrzewaniu w 54°C, po czym inkubowano je od 3 do 14 dni w 5°C lub w 20°C. Stwierdzono, że ogrzewanie znacząco obniżyło liczbę bakterii. Redukcja ta była istotnie wyższa jeśli bakterie były utrzymywane po zadziałaniu stresu w temperaturze 5°C niż w 20°C.

Stwierdziłam, że zdolność inwazji, nie poddanych działaniu podwyższonej temperatury szczepów kontrolnych znacząco obniżyła się w trakcie inkubacji w 20°C, podczas gdy w 5°C utrzymywała się na podobnym poziomie. Inwazyjność szczepów kontrolnych w trakcie inkubacji w 5°C była istotnie wyższa niż szczepów inkubowanych w 20°C. Powyższe obserwacje mogłyby być znalezione swoje wyjaśnienie w fakcie, iż obniżenie temperatury może stanowić dla bakterii czynnik stresowy, który również może zmieniać ich inwazyjność. W niskich temperaturach zwolnieniu ulega tempo metaboliczne bakterii, wolniej także dochodzi do wyczerpywania się składników odżywczych, co może tłumaczyć różnice w efekcie działania temperatur 5°C i 20°C na inwazyjność bakterii.

Moje badania wykazały, że 20 minutowe ogrzewanie w temperaturze 54°C znacząco obniżyło inwazyjność bakterii w porównaniu z bakteriami kontrolnymi. Spadek inwazyjności utrzymywał się średnio trzy dni u bakterii inkubowanych po zadziałaniu stresu w temperaturze 5°C, a 7 dni w temperaturze 20°C. Niezależnie od temperatury, w której utrzymywano bakterie po działaniu stresu po 7 dniach inwazyjność bakterii rosła, osiągając wartość inwazyjności bakterii kontrolnych. Co więcej, po dwóch tygodniach inkubacji zarówno w 5°C jak i w 20°C inwazyjność bakterii ogrzewanych była istotnie wyższa od inwazyjności bakterii kontrolnych. Porównując uzyskane wyniki z wynikami z publikacji **P3** można stwierdzić, że efekt stresu na inwazyjność *L. monocytogenes* utrzymuje się dłużej jeśli bakterie pozostają w temperaturze 20°C, niż jeśli inkubowane są w temperaturze ciała człowieka. Obniżenie temperatury do temperatur chłodniczych nie wpływa na dalsze wydłużenie czasu trwania badanego efektu.

4.3.4 Podsumowanie osiągnięcia naukowego.

1. Wyniki moich badań dowiodły, że szczepy *L. monocytogenes* należące do serotypu 4b cechują się najwyższą inwazyjnością spośród wszystkich badanych przeze mnie serotypów, a ich inwazyjność w największym zakresie zwiększa się w wyniku ekspozycji na stres osmotyczny. Może to oznaczać, że szczepy należące do serotypu 4b posiadają wysoce efektywne mechanizmy odpowiedzi na stres, które mogą jednocześnie stanowić element ich wysokiego potencjału infekcyjnego.
2. Wykazałam, że wzrost inwazyjności *L. monocytogenes* w wyniku działania stresu cieplnego może być związany ze zwiększoną ekspresją białek InlA oraz InlB. Uzyskane wyniki wskazują jednak, że mechanizm zmian inwazyjności w odpowiedzi na stres cieplny może być bardziej złożony i w proces ten są przypuszczalnie zaangażowane dodatkowe czynniki.
3. Szczepy *L. monocytogenes* o bardzo niskiej inwazyjności są częściej spotykane u zwierząt niż w środowisku klinicznym i w żywności. Mogłoby to wskazywać, iż poważniejszym źródłem wysoce inwazyjnych szczepów *L. monocytogenes* spotykanych w żywności są ludzie uczestniczący w procesie produkcji, a nie transmisja od zwierząt.
4. Wskazałam na związek unikalnych polimorfizmów sekwencji białek InlA i InlB z niską inwazyjnością szczepów *L. monocytogenes* pochodzących od zwierząt. Obserwacja ta otwiera nowe możliwości badań wykorzystujących ukierunkowaną mutagenезę, które mogłyby doprowadzić do wyłonienia markerów charakteryzujących niskoinwazyjne szczepy *L. monocytogenes*.
5. Wykazałam, że inwazyjność szczepów *L. monocytogenes* uprzednio nie poddanych działaniu podwyższonych temperatur maleje wraz z upływem czasu jeśli bakterie są utrzymywane w temperaturach 20°C oraz 37°C, podczas gdy w temperaturze 5°C inwazyjność utrzymuje się na podobnym poziomie. Może to oznaczać, że przechowywanie produktów zanieczyszczonych *L. monocytogenes* w warunkach chłodniczych sprzyja zachowaniu inwazyjności bakterii, pomimo korzyści w postaci redukcji tempa ich proliferacji.

6. Wykazałam, że ekspozycja *L. monocytogenes* na temperatury spotykane w żywności poddanej niewystarczającej obróbce termicznej zmniejsza inwazyjność szczepów *L. monocytogenes*, jednak długość utrzymywania się zmian inwazyjności *L. monocytogenes* indukowanych stresem cieplnym zależna jest od temperatury dalszego przechowywania bakterii po ekspozycji na podwyższoną temperaturę.
7. Indukowane stresem cieplnym zmiany inwazyjności *L. monocytogenes* utrzymują się w komórkach badanych szczepów od 7 do 14 dni, jeśli bakterie utrzymywane są w temperaturze 5°C oraz 20°C, natomiast od 24 do 72 godzin jeśli bakterie utrzymywane są w temperaturze 37°C. Można sądzić, że opisane modyfikacje inwazyjności *L. monocytogenes* utrzymują się przez wystarczająco długi czas, żeby realnie wpływać na zmianę właściwości patogennych szczepów po spożyciu zanieczyszczonego tym patogenem produktu poddanego niewystarczającej obróbce termicznej.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

STAŻE NAUKOWE

12.02. – 17.03.2018 Augusta University, Georgia, USA

W czasie realizacji stażu w laboratorium prof. Stuarta Thompsona w Augusta University, Georgia, USA oznaczyłam zdolność do tworzenia biofilmu przez 200 mutantów *Campylobacter jejuni*. Wykazałam, że 10 z nich cechowało się znacznie obniżoną zdolnością do tworzenia biofilmu. Udało mi się zidentyfikować cztery nowe geny potencjalnie zaangażowane w proces tworzenia biofilmu u *C. jejuni*. Wyniki uzyskane w trakcie staży w laboratorium prof. Thompsona zostały zaprezentowane na konferencji ASM Microbe w Atlancie. Kontynuacją tej współpracy było złożenie wniosku o finansowanie projektu badawczego do NCN. Projekt nie został zakwalifikowany do finansowania, jednak zmodyfikowana wersja projektu została ponownie złożona w bieżącym konkursie NCN SONATA15.

Wałęcka-Zacharska E, Fulmer C, Bania J, Thomson S. Identification of genes affecting biofilm formation by *Campylobacter jejuni*. Atlanta, GA, Czerwiec 7-11 2018. ASM Microbe.

22.04.2016 – 05.01.2017 Augusta University, Georgia, USA

W trakcie stażu w laboratorium prof. Stuarta Thompsona skonstruowałam mutantka *Campylobacter jejuni* pozbawionego regionu *cjj1417-1419*, kodującego białka o przypuszczalnej aktywności metylotransferazy i określiłam jego znaczenie w procesie tworzenia biofilmu przez te bakterie. Wykazałam, iż region ten nie wpływa na zdolność tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*. Ponadto, wykorzystując mutagenezę transpozonową

skonstruowałam bibliotekę złożoną z 800 mutantów *C. jejuni*, z których 20 wykazywało obniżoną zdolność tworzenia biofilmu.

26.06 -28.11.2013 University of British Columbia, Vancouver, Kanada

W trakcie stażu badawczego w laboratorium Dr Kevina Allena (Food, Nutrition and Health Program, Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia, Vancouver, Kanada) pracowałam nad określeniem roli wybranych genów zlokalizowanych na wyspie genomowej LG1. Obecność tej wyspy genomowej stwierdzono w szczepach *L. monocytogenes* odpowiedzialnych za przypadek największej zbiorowej listeriozy w Kanadzie, w wyniku której śmierć poniosły 23 osoby. Jako hipotezę badawczą przyjęto przypuszczenie, że czynnikiem który może wyróżniać te szczepy jest niska wrażliwość na dezynfektanty, zaś w obrębie wyspy LG1 stwierdzono obecność genów mogących taką cechę zapewniać. Zbadałam rolę wytypowanych genów *emrE* i *lmo1851* w oporności *L. monocytogenes* na środki dezynfekcyjne i antybiotyki. Wykazałam, że delecja genu *emrE*, kodującego potencjalną pompę odpowiedzialną za usuwanie antybiotyków, obniża tolerancję *L. monocytogenes* na dezynfektanty, opóźniając jej wzrost. Skonstruowałam też mutanta delecyjnego *L. monocytogenes* pozbawionego genu *sell*, kodującego białko przypuszczalnie uczestniczące w procesie adhezji. Nieobecność genu *sell* nie wpłynęła jednak na zmianę zdolności bakterii do adhezji i inwazji komórek Caco-2 oraz HeLa.

Efektem tej współpracy jest praca eksperymentalna (Kovacevic i wsp., 2016) oraz przeglądowa (Allen i wsp., 2016).

Allen KJ, Wałecka-Zacharska E, Chen JC, Kosek-Paszowska K, Devlieghere F, Van Meervenne E, Osek J, Wiczorek K, Bania J. *Listeria monocytogenes* - An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiol* 2016, 54, 178-189.

Kovacevic J, Ziegler J, Wałecka-Zacharska E, Reimer A, Kitts D, Gilmour M. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*. *Appl Environ Microbiol* 2016, 82, 939-953.

STAŻE SZKOLENIOWE

4.12. – 8.12.2017 University of Pittsburgh, Pennsylvania, USA

Celem stażu w laboratorium prof. Charlesa Horna było przeprowadzenie oceny aktywności wymiotnej enterotoksyny wytwarzanej przez *S. aureus*, tj., SEC oraz enterotoksyny SECepi wytwarzanej przez *S. epidermidis*. Enterotoksyna SEC jest uznanym czynnikiem gronkowcowych zatruc pokarmowych, SECepi, która jest ortologiem SEC wytwarzanej przez *S. aureus*, jest stosunkowo niedawno poznanym czynnikiem, a jej aktywność wymiotna nie została dotąd określona. SECepi różni się od SEC sekwencją aminokwasową, co może wpływać na różnice aktywności tych dwóch toksyn. Badania aktywności wymiotnej przeprowadzono na modelu ryjówka domowego (*Suncus murinus*), który stanowi dogodny

model pozwalający na badanie efektu wymiotnego różnorodnych czynników, w tym enterotoksyn gronkowcowych. W czasie pobytu odbyłam także szkolenie w zakresie iniekcji dootrzewnowej oraz eutanazji.

18.09 – 23.09.2017 The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

W ramach szkolenia w The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA uczyłam się postępowania ze zwierzętami laboratoryjnymi. Szkolenie dotyczyło także informacji z zakresu anestezji i analgezji, niezbędnej do przeprowadzenia zabiegów chirurgicznych na zwierzętach laboratoryjnych. Wykonałam iniekcję dootrzewnową oraz podskórną. Przeprowadziłam sekcję myszy oraz wykonałam szereg zabiegów chirurgicznych: kastrację, wazektomię, splenektomię, adrenalektomię, nefrektomię, tymektomię, owariektomię, transplantację jajnika oraz katetyzację żyły szyjnej. Nauczyłam się także operacyjnego preparowania ran oraz odpowiedniego dla gatunku zakładania szwów chirurgicznych.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Działalność dydaktyczna

Od czasu zatrudnienia na stanowisku asystenta w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu prowadzę zajęcia z „Higieny mięsa i zwierząt rzeźnych” oraz „Bezpieczeństwa pasz” ze studentami Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Opracowałam program oraz materiały dydaktyczne zajęć „Higieny mięsa i zwierząt rzeźnych” oraz „Bezpieczeństwa pasz”. Zajęcia te prowadzę w języku polskim oraz angielskim.

Oprócz zajęć dydaktycznych ze studentami prowadzę także wykład pt. „Metody biologii molekularnej w higienie produktów żywnościowych” na specjalizacyjnym studium podyplomowym „Higiena Zwierząt Rzeźnych i Żywności Zwierzęcego Pochodzenia” na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

W roku 2018 oraz 2019 przeprowadziłam szkolenie z zakresu technik PCR dla uczestników projektu Erasmus+ AgLab z Mołdawii i Ukrainy.

W roku 2019 przeprowadziłam wykład pt. „*Listeria monocytogenes* as a model intracellular pathogen” na międzynarodowym szkoleniu finansowanym przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej, które odbyło się na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu.

Od czasu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych, tj. od 2012 r., pełniłam funkcję promotora 3 prac magisterskich oraz promotora pomocniczego 2 prac doktorskich.

Promotorstwo prac magisterskich:

- Mgr Renata Gmyrek – Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Mikrobiologia
Tytuł pracy magisterskiej: Określenie wpływu czynników stresowych na *inwazyjność* *L. monocytogenes*.
Obrona pracy: 2017.
- Mgr Agata Pabich – Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Mikrobiologia
Tytuł pracy magisterskiej: Wpływ promieniowej jonizacji katalitycznej na *inwazyjność* *L. monocytogenes*.
Obrona pracy: 2019.
- Mgr Jakub Korkus – Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Mikrobiologia
Tytuł pracy magisterskiej: Wpływ stresu cieplnego na *inwazyjność* *L. monocytogenes*.
Obrona pracy: 2019.

Promotorstwo pomocnicze prac doktorskich:

- Dr Iwona Zacharow – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Tytuł pracy doktorskiej: Charakterystyka izolatów *Arcobacter spp.* Wyosobnionych z mięsa surowego.
Nadanie stopnia doktora: 2016 r.
- Dr Katarzyna Morka – Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Mikrobiologii
Tytuł pracy doktorskiej: Identification, genotype and virulotype analysis of *Yersinia sp.* isolated from humans, domestic and free-living animals.
Nadanie stopnia doktora: 2019 r.
- Obecnie pełnię funkcję promotora pomocniczego wszczętego na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu przewodu doktorskiego lek. wet. Sylwii Banaszekiewicz

6.2 Działalność organizacyjna

W latach 2016 -2019 uczestniczyłam w pracach Komisji ds. informacji o działalności B+R Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Moje zadania polegały na okresowej analizie dorobku Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta oraz przygotowaniu danych do ewaluacji działalności naukowej Katedry.

Obecnie jestem członkiem Komisji ds. sprawozdawczości i informacji o działalności badawczej przy Radzie Dyscypliny Weterynaria w kadencji 2019-2020. Moje zadanie polega na okresowej analizie dorobku Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, przygotowaniu danych do ewaluacji działalności naukowej Katedry oraz nadzorowaniu wprowadzania danych dotyczących Dyscypliny Weterynaria do systemu POL-on i PBN.

6.3 Działalność popularyzatorska

Jestem autorem artykułu pt. „*Listeria monocytogenes* - patogen, który wie jak przetrwać” opublikowanego w czasopiśmie „Życie weterynaryjne”.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1 Omówienie osiągnięć naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora

Moje zainteresowania badawcze związane są z mikrobiologią żywności, jednak część zrealizowanych przeze mnie badań dotyczyła także takich zagadnień jak:

Badania zróżnicowania genetycznego oraz występowania czynników wirulencji w populacji *Enterococcus sp.*

Techniki biologii molekularnej pozwalają obecnie na różnicowanie mikroorganizmów w obrębie gatunków. Za ich pomocą możliwe jest śledzenie rozprzestrzeniania się określonych klonów patogennych bakterii. W trakcie realizacji pracy magisterskiej scharakteryzowałam genotypy ponad 50 szczepów *Enterococcus faecalis* pochodzących z różnych oddziałów szpitalnych. Zastosowałam metodę genotypowania MLVA polegającą na określeniu liczby powtórzonych sekwencji w 7 różnych regionach genomu *E. faecalis*. Oznaczyłam także obecność genów hemolizyny, lipazy, genu *esp* kodującego czynnik wiązany ze zdolnością do tworzenia biofilmu oraz genów oporności na wankomycynę. Badania te wskazały na istotne powiązanie występowania niektórych czynników wirulencji z genotypem MLVA *E. faecalis*. Wykazałam, iż ponad 70% szczepów izolowanych z krwi pacjentów posiada aktywność lipolityczną, po raz pierwszy wskazując na potencjalną rolę lipazy w wirulencji *E. faecalis* (P5). Późniejsze badania innych zespołów potwierdziły, iż lipaza może być czynnikiem wirulencji ułatwiającym rozprzestrzenianie enterokoków we krwi.

Dalsze badania populacji szpitalnych szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus* wykazały wysoką częstość występowania szczepów antybiotykoopornych. Wśród badanych enterokoków stwierdzono znaczną liczbę szczepów GRE (Glycopeptide Resistant Enterococci) oraz HLGR (High-Level Gentamicin-Resistant Enterococci). Znacząca część szczepów klinicznych charakteryzowała się także zdolnością do tworzenia biofilmu oraz posiadaniem determinant wirulencji (P6, P7, P8).

P5. Wałęcka E, Bania J, Dworniczek E, Ugorski M. Genotypic characterization of hospital *Enterococcus faecalis* strains using MLVA. *Lett Appl Microbiol* 2009, 49, 79-84.

P6. Kowalska-Krochmal B, Dworniczek E, Dolna I, Seniuk A, Bania J, Wałęcka E, Wrzyszczyk E. Antibiotic susceptibility levels of clinical *Enterococcus* spp. strains, including those resistant to glycopeptides and high concentrations of aminoglycosides. *Adv Clin Exp Med* 2010, 19, 155-162.

P7. Kowalska-Krochmal B, Dworniczek E, Dolna I, Bania J, Wałęcka E, Seniuk A, Gościński G. Resistance patterns and occurrence of virulence determinants among GRE strains in southwestern Poland. *Adv Med Sci* 2011, 56, 304-314.

P8. Dworniczek E, Piwowarczyk J, Bania J, Kowalska-Krochmal B, Wałęcka E, Seniuk A, Dolna I, Gościński G. Enterococcus in wound infections: Virulence and antimicrobial resistance. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2012, 59, 263-269.

Opracowanie metody ilościowego określania zawartości mleka krowiego w mleku kozim w badaniach fałszowania składu żywności

Uczestniczyłam także w pracach nad rozwojem metod identyfikacji gatunkowej w produktach żywności pochodzenia zwierzęcego. Spośród wielu znanych przypadków niedozwolonego ingerowania w skład żywności fałszowanie mleka koziego mlekiem krowim jest działaniem mogącym stanowić zagrożenie zdrowia ludzi. Mleko kozie może z powodzeniem zastępować mleko krowie u niektórych dzieci dotkniętych alergią pokarmową na białka mleka krowiego. Monitorowanie jakości mleka koziego jest zatem istotne dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Aby w szybki i wiarygodny sposób móc ilościowo oszacować wielkość zafałszowania mleka koziego mlekiem krowim, opracowałam metodę opartą o PCR w czasie rzeczywistym. Metoda została zastosowana do oceny jakości 26 próbek koziego mleka UHT dostępnego na rynku polskim w latach 2005 oraz 2009. We wszystkich 26 próbkach przebadanych w roku 2005 stwierdziłam obecność mleka krowiego, gdzie w 7 próbkach dodatek tego mleka stanowił 5-10%. Na przestrzeni 4 kolejnych lat wykazałam znaczną poprawę jakości mleka koziego. W połowie próbek stwierdzałam dodatek mleka krowiego, przy czym w ponad 80% próbek stanowił on poniżej 1%. Wykazałam tym samym znaczną poprawę jakości koziego mleka UHT pod względem stanu jego zafałszowania mlekiem krowim (**P9**).

P9. Dąbrowska A, Wałęcka E, Bania J, Żelazko M, Szoltyś M, Chrzanowska J. Quality of UHT goat's milk in Poland evaluated by real-time PCR. *Small Rumin Res* 2010, 94, 32-37.

Badania nad wpływem stresu środowiskowego na inwazyjność *L. monocytogenes*

W roku 2008 rozpoczęłam studia doktoranckie pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Bani, a tematem pracy było określenie wpływu stresu środowiskowego na inwazyjność szczepów *L. monocytogenes*. Bakteria ta jest groźnym patogenem ludzi i zwierząt. U ludzi *L. monocytogenes* może być przyczyną poważnych zachorowań, jak posocznica, zapalenie opon mózgowych oraz poronienia. *L. monocytogenes* jest patogenem przenoszonym przede wszystkim przez żywność. Metody stosowane w utrwalaniu żywności mają na celu redukcję liczby mikroorganizmów odpowiedzialnych za psucie się żywności oraz eliminację patogenów. Niekorzystne warunki inicjują w mikroorganizmach zmiany metabolizmu, osiągane poprzez ekspresję specyficznego zestawu genów, co może prowadzić do zmniejszenia wrażliwości drobnoustrojów na kolejne dawki czynnika stresowego, a także modyfikacji jego wirulencji (**P10, P11**). Moje badania skupiły się na określeniu wpływu gęstości populacji, stresu cieplnego oraz osmotycznego na inwazyjność *L. monocytogenes*. Wpływ stresu na zdolność do inwazji komórek eukariotycznych określałam w teście tworzenia łysek na linii komórek ludzkiego raka okrężnicy. Badania przeprowadziłam na 10 wybranych szczepach reprezentujących najważniejsze genotypy i serotypy *L. monocytogenes*.

Badania inwazyjności przeprowadzone na bakteriach w różnych fazach wzrostu wykazały, iż przejściu bakterii z fazy logarytmicznej do stacjonarnej towarzyszy stopniowa redukcja inwazyjności. Obserwowany efekt redukcji był heterogenny w populacji *L. monocytogenes*, jednak niezależny od genotypu. Badając efekt stresu osmotycznego wykazałam, że już 10 minutowa ekspozycja na 0.3 M NaCl wywoływała zmiany inwazyjności. Nie zanotowałam jednak znaczącej zmiany inwazyjności w różnych punktach fazy logarytmicznej. Różnice stwierdziłam we wczesnej fazie logarytmicznej oraz w zaawansowanym stadium fazy stacjonarnej. Wydłużenie czasu działania NaCl, a także dalsze zwiększanie jego stężenia nie wpływało znacząco na zmianę inwazyjności szczepów. Wykazałam w ten sposób, że krótkie czasy ekspozycji oraz niskie stężenia NaCl są wystarczające do uzyskania maksymalnych obserwowanych zmian inwazyjności *L. monocytogenes* (P12).

Badalam również efekt podwyższonej temperatury na inwazyjność *L. monocytogenes*. Badania przeprowadziłam na szczepach *L. monocytogenes* w fazie logarytmicznego wzrostu oraz w fazie stacjonarnej. Bakterie ogrzewane były przez 20 i 60 minut w 54°C. Maksymalną redukcję liczby bakterii uzyskałam w wyniku 60 minutowego ogrzewania. W większości szczepów nie stwierdziłam znaczących zmian przeżywalności porównując wartości redukcji uzyskane w fazie logarytmicznej i stacjonarnej. Wykazałam, że krótszy czas ekspozycji na 54°C wywołuje 10 - 6000 krotny spadek inwazyjności we wszystkich bakteriach w fazie logarytmicznego wzrostu oraz 4 - 70 krotny spadek inwazyjności w bakteriach w fazie stacjonarnej. Wydłużenie czasu ekspozycji do 60 minut wywołuje 10 - 2700 krotny wzrost inwazyjności bakterii. Wykazałam w ten sposób, że wydłużenie czasu ogrzewania zmniejsza w sposób istotny liczbę *L. monocytogenes*, jednakże bakterie które przetrwają stres wykazują większą inwazyjność (P13).

Uzyskane przeze mnie wyniki dowodzą, iż wzrost gęstości hodowli bakterii, związany z przejściem bakterii do fazy stacjonarnej, wywołuje spadek inwazyjności szczepów *L. monocytogenes*. Inwazyjność takich bakterii zwiększa się jednak w znaczący sposób w odpowiedzi na kolejny czynnik stresowy, jakim był w moim modelu doświadczalnym stres osmotyczny oraz wstrząs cieplny. Wzrost stężenia NaCl oraz czasu jego działania nie wpływa istotnie na dalsze zwiększanie się inwazyjności bakterii. Czynnik czasu odgrywa jednak decydującą rolę w przypadku działania stresu cieplnego.

P10. Wałęcka E, Molenda J, Bania J. The impact of environmental stress on *Listeria monocytogenes* virulence. *Pol J Vet Sci* 2009, 12, 575-579.

P11. Wałęcka E., Bania J. Stress response in *Listeria monocytogenes* s. 91-123 w książce pt.: Stress Response in Microbiology. Red. Jose M. Requena, Caister Academic Press, 2012. ISBN: 978-1-908230-04-1.

P12. Wałęcka E, Molenda J, Karpiskova R, Bania J. Effect of osmotic stress and culture density on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *Int J Food Microbiol* 2011, 144, 440-445.

P13. Wałęcka E, Molenda J, Karpiskova R, Bania J. Effect of heat exposure on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *Foodborne Pathog Dis* 2011, 8, 839-841.

7.2 Omówienie osiągnięć naukowych po uzyskaniu stopnia doktora

Badania roli alternatywnego transkryptu IL-1 β w rozwoju niewydolności serca u psów

Badania wykazują, że IL-1 β pełni ważną rolę w patogenezie przerostu i niewydolności serca (Nishikawa i wsp. 2006). Aby zbadać czy alternatywny wariant IL-1 β wpływa na indukcję IL-1 β oraz TNF- α pełniąc funkcję przeciwzapalną wywołałam nadekspresję alternatywnego wariantu IL-1 β w linii komórek psa DH82. Linia ta na skutek stymulacji liposacharydem bakteryjnym wytwarza cytokiny prozapalne. Analiza western blot wykazała, że poziom cytokin prozapalnych TNF i IL1 po stymulacji lipopolisacharydem znacząco zmniejsza się w obecności alternatywnego transkryptu IL-1 β , sugerując tym samym jego rolę w regulacji aktywności interleukiny-1 β u psów (P14).

P14. Kiczak L, Wałęcka-Zacharska E, Bania J, Sambor I, Stefaniak T, Dzięgiel P, Zacharski M, Tomaszek A, Rybińska I, Paślawska U. Anti-inflammatory properties and expression in selected organs of canine interleukin-1 β splice variant 1. *Vet Immunol Immunopathol* 2015, 167, 91-95.

Badania nad występowaniem, antybiotykoopornością, opornością na dezynfektanty oraz wirulencją *L. monocytogenes*

W trakcie stażu badawczego w Food, Nutrition and Health Program, Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia, Vancouver, Kanada w laboratorium dr Kevina Allena prowadziłam badania nad wyspą genomową LG1. Wyspa ta została opisana w roku 2010 przez Gilmour i współpracowników. Zidentyfikowana została w 2 szczepach *L. monocytogenes* serotypu 1/2a odpowiedzialnych za największe w historii Kanady zbiorowe zatrucie pokarmowe, w którego efekcie zmarły 23 osoby, które miało miejsce w roku 2008. Wyspa ta jest elementem genetycznym o wielkości 50 kb, zawierającym geny mogące odgrywać rolę w antybiotykooporności, odpowiedzi na stres oraz wirulencji *L. monocytogenes*. Zbadałam rolę wybranych genów wyspy LG1, tj. *emrE* i *lmo1851* w oporności *L. monocytogenes* na środki dezynfekcyjne i antybiotyki. Wykazałam, że delecja genu *emrE*, kodującego potencjalną pompę odpowiedzialną za usuwanie antybiotyków, obniża tolerancję *L. monocytogenes* na dezynfektanty, opóźniając jej wzrost. Skonstruowałam też mutantą delecyjnego *L. monocytogenes* pozbawionego genu *sell*, kodującego białko przypuszczalnie odpowiedzialne za proces adhezji. Nieobecność genu *sell* nie wpłynęła jednak na zmianę zdolności bakterii do adhezji i inwazji komórek Caco-2 oraz HeLa (P15).

Wraz z zespołem dr Allena opracowaliśmy pracę przeglądową, w której jestem równorzędnym pierwszym autorem, na temat wpływu warunków spotykanych w trakcie produkcji żywności na rozwój antybiotykooporności *L. monocytogenes*. Mimo, iż *L. monocytogenes* uważana była za bakterię wrażliwą na większość stosowanych antybiotyków badania ostatnich lat wskazują na występowanie szczepów antybiotykoopornych. Takie szczepy stwierdzano w żywności i w środowisku jej produkcji. Z uwagi na to, że głównym źródłem transmisji pałeczek *L. monocytogenes* jest żywność, nabywanie oporności w środowisku produkcji żywności stanowi ważne zagadnienie. W pracy przeglądowej dokonaliśmy analizy stanu współczesnej wiedzy na temat wpływu czynników genetycznych,

fizjologicznych oraz zewnętrznych czynników selekcyjnych na możliwość nabywania cech antybiotykooporności przez *L. monocytogenes* (P16).

Współpraca z zespołem dr hab. Krzysztofa Skowrona z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy zaowocowała 7 publikacjami. Przeprowadzone badania miały na celu ocenę występowania pałeczek *L. monocytogenes* w środowisku produkcji żywności, charakterystykę genotypową szczepów, określenie zdolności tworzenia biofilmu, a także ocenę lekooporności oraz wrażliwości na środki dezynfekcyjne szczepów. Badania zawarte w pierwszej pracy wskazały na wysoką częstość występowania *L. monocytogenes* w zakładach przetwórstwa rybnego i duże zróżnicowanie genetyczne szczepów. Istotnym źródłem bakterii były ryby pochodzące z farm hodowlanych. Badane szczepy charakteryzowały się wysoką opornością na erytromycynę oraz trimetoprim/sulfametoksazol (P17). W kolejnej pracy, gdzie scharakteryzowano także szczepy *L. monocytogenes* pochodzące z ryb i zakładów rybnych, wskazano z kolei na sporadyczne przypadki antybiotykooporności (P18). Wysoką lekowrażliwością odznaczały się szczepy izolowane z serów pleśniowych. Szczepy te charakteryzowały się jednak dobrą zdolnością do tworzenia biofilmu na stali nierdzewnej. Właściwość ta pozwalała bakteriom na przetrwanie w środowisku produkcji żywności od kilkunastu do ponad 100 dni, w zależności od temperatury, zwiększając tym samym ryzyko wtórnego zanieczyszczenia produktu i stanowiąc zagrożenie dla konsumenta (P19). Bardzo dobrą zdolność do tworzenia biofilmu zidentyfikowano także wśród szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z mleka. Szczepy te odznaczały się także znaczną opornością na penicylinę. W badaniach zademonstrowano ponadto, że kubki udojowe mogą przyczyniać się do transmisji pałeczek *L. monocytogenes* w stadach bydła, podkreślając tym samym istotność monitorowania biofilmów *L. monocytogenes* w zakładach przetwórstwa mlecznego (P20). W kolejnej pracy oceniono skuteczność chitozanu, ekstraktu z propolisu, pyłku pszczelego oraz ich kombinacji w redukcji pałeczek *L. monocytogenes* na powierzchni żywności. Wykazano, że dodatek ekstraktu z propolisu lub pyłku pszczelego do chitozanu zwiększał jego właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Największą redukcję liczby *L. monocytogenes* osiągnęto przy zastosowaniu 20% dodatku ekstraktu z propolisu, wskazując tym samym na możliwość jego zastosowania w materiałach do pakowania żywności (P21). W dwóch kolejnych pracach analizowano wpływ dezynfektantów na redukcję liczby *L. monocytogenes*. Badania dowiodły, że roztwory dezynfektantów na bazie wody ozonowanej skuteczniej eliminowały bakterie, niż te na bazie wody bez dodatku ozonu. Najlepsze właściwości antibakteryjne wykazywały czwartorzędowe związki amoniowe oraz związki na bazie chloru (P22). Czwartorzędowe związki amoniowe najskuteczniej eliminowały także *L. monocytogenes* z biofilmu. Wrażliwość bakterii biofilmu malała wraz z temperaturą, dostępnością składników odżywczych oraz zasoleniem i pH środowiska. Najbardziej odporne na dezynfektanty były biofilmy *L. monocytogenes* wytworzone w pH=4, a najbardziej wrażliwe te wytworzone w pH=9 (P23).

P15. Kovacevic J, Ziegler J, Wałęcka-Zacharska E, Reimer A, Kitts D, Gilmour M. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*. *Appl Environ Microbiol* 2016, 82, 939-953.

- P16. Allen KJ, Wałęcka-Zacharska E, Chen JC, Kosek-Paszkowska K, Devlieghere F, Van Meervenne E, Osek J, Wiczorek K, Bania J. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiol* 2016, 54, 178-189.
- P17. Skowron K, Kwiecińska-Piróg J, Grudlewska K, Świeca A, Paluszak Z, Bauza-Kaszewska J, Wałęcka-Zacharska E, Gospodarek-Komkowska E. The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *Int J Food Microbiol* 2018, 282, 71-83.
- P18. Skowron K, Wiktorczyk N, Grudlewska K, Wałęcka-Zacharska E, Paluszak Z, Kruszewski S, Gospodarek-Komkowska E. Phenotypic and genotypic evaluation of *Listeria monocytogenes* strains isolated from fish and fish processing plants. *Ann Microbiol* 2019, 69, 469-482.
- P19. Skowron K, Wiktorczyk N, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Wałęcka-Zacharska E, Paluszak Z, Gospodarek-Komkowska E. Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria spp.* strains isolated from cheese. *Int J Food Microbiol* 2019, 296, 75-82.
- P20. Skowron K, Wałęcka-Zacharska E, Grudlewska K, Wiktorczyk N, Kaczmarek A, Gryń G, Juszcuk K, Kwiecińska-Piróg J, Paluszak Z, Kosek-Paszkowska K, Gospodarek-Komkowska E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from milk and humans and the possibility of milk-borne strains transmission. *Pol J Microbiol* 2019, 68, 353-369.
- P21. Skowron K, Kwiecińska-Piróg J, Grudlewska K, Gryń G, Wiktorczyk N, Balcerek M, Załuski D, Wałęcka-Zacharska E, Kruszewski S, Gospodarek-Komkowska E. Antilisterial activity of polypropylene film coated with chitosan with propolis and/or bee pollen in food models. *Biomed Res Int* 2019, 7817063.
- P22. Skowron K, Wałęcka-Zacharska E, Grudlewska K, Białucha A, Wiktorczyk N, Bartkowska A, Kowalska M, Kruszewski S, Gospodarek-Komkowska E. Biocidal effectiveness of selected disinfectants solutions based on water and ozonated water against *Listeria monocytogenes* strains. *Microorganisms* 2019, 7, 127.
- P23. Skowron K, Wałęcka-Zacharska E, Grudlewska K, Gajewski P, Wiktorczyk N, Wietlicka-Piszc M, Dudek A, Skowron KJ, Gospodarek-Komkowska E. Disinfectant susceptibility of biofilm formed by *Listeria monocytogenes* under selected environmental conditions. *Microorganisms* 2019, 7, 280.

Pozostałe tematy badawcze

Oznaczenie częstości występowania wirusa BVD u bydła

Wirusowa biegunka bydła (ang. bovine viral diarrhea, BVD), wywołana przez wirusa BVD, powoduje zaburzenia rozrodu, spadek wydajności mlecznej i problemy w odchowie cieląt, wpływając tym samym na opłacalność hodowli bydła (Houe, 2003). Celem badań, w których uczestniczyłam była ocena skuteczności szczepień przeciwko wirusowi BVD u bydła. Z surowicy zwierząt izolowałam RNA, a następnie oznaczyłam obecność wirusa BVD metodą RT-PCR. Badania wykazały znaczne obniżenie częstości występowania wirusa w stadach bydła tym samym potwierdzając skuteczność długoterminowego programu szczepień bydła.

P24. Rypuła K, Płoneczka-Janeczko K, Bania J, Wałęcka E, Bierowiec K, Rozpędek W. Reduction of prevalence of persistent BVDV infection in cattle herds by long-term vaccination program (preliminary clinical study). *Pol J Vet Sci* 2013, 16, 381-383.

Analiza częstości występowania szczepów *Arcobacter butzleri* i *Arcobacter cryaerophilus* w mięsie i charakterystyka genotypowa szczepów

W ostatnich latach wykazano, że szczepy *A. butzleri* i *A. cryaerophilus* mogą powodować infekcje jelitowe u ludzi, manifestujące się bólem brzucha oraz biegunką. Za główną przyczynę zachorowań uznaje się konsumpcję żywności zanieczyszczonej tymi pałeczkami (Vandenberg i wsp., 2004). W pracach, w których uczestniczyłam analizowano występowanie i lekooporność izolatów *Arcobacter* w 210 próbkach mięsa surowego (P25) oraz określono ich zróżnicowanie genetyczne i występowanie czynników wirulencji (P26). Najwyższą częstość występowania *Arcobacter spp.* zaobserwowano w mięsie drobiowym, a najczęstszym gatunkiem był *A. butzleri*. Większość izolatów *A. butzleri* wykazało oporność na β -laktamy i erytromycynę, podczas gdy większość szczepów *A. cryaerophilus* była wrażliwa na erytromycynę. Największą skuteczność wobec obu szczepów wykazywały tetracykliny, aminoglikozydy oraz fluorochinolony. Ponad połowa szczepów *A. butzleri* cechowała wielolekooporność. Analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów wykazała bliskie pokrewieństwo szczepów *A. butzleri* co może obrazować ich zdolność do rozprzestrzeniania się.

P25. Zacharow I., Bystron J., Wałeczka-Zacharska E., Podkowiak M., Bania J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from retail meat in Lower Silesia region, Poland. *Pol J Vet Sci* 2015, 18, 63–69.

P26. Zacharow I., Bystron J., Wałeczka-Zacharska E., Podkowiak M., Bania J. Genetic diversity and incidence of virulence-associated genes of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from pork, beef, and chicken meat in Poland. *BioMed Res Int* 2015, 956507.

Badania oddziaływania ekstraktów z chmielu, flawonoidów i ich pochodnych na wybrane patogenne mikroorganizmy

Szyszki chmielu stanowią źródło ponad 30 flawonoidów. Dowiedziono, że preparaty pochodzące z szyszek chmielu wykazują szereg właściwości biologicznych (Chadwick i wsp., 2006). W badaniach, w których uczestniczyłam oceniano skuteczność ekstraktów z chmielu i ich pochodnych w redukcji liczby patogenów ludzkich i zwierzęcych. Wykazano, że 7 flawonoidów znacząco hamowało wzrost szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis*, podczas gdy ekstrakty z chmielu posiadały właściwości przeciwgrzybicze (*Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. semitectum*). Wyniki te wskazują na możliwość wykorzystania tych substancji w walce z patogenami roślin oraz w leczeniu infekcji wywołanych przez gronkowce.

P27. Bartmańska A., Wałeczka-Zacharska E., Tronina T., Popłoński J., Sordon S., Brzezowska E., Bania J., Huszcza E. Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules* 2018, 23, 2059.

Badania nad rolą fosforybozylotransferazy nikotynamidowej w niespecyficznym zapaleniu jelita

Szacuje się, że około 5 milionów ludzi na świecie choruje na niespecyficzne zapalenie jelita (Colombel i Mahadevan, 2017). Brak jednak standardu pozwalającego na diagnozę i monitorowanie tego schorzenia. Fosforybozylotransferaza nikotynamidowa (Namp1) zwana też wisfatyną jest wewnątrzkomórkowym enzymem, który odgrywa ważną rolę w procesach fizjologicznych i patologicznych (Carbone i wsp., 2017). W badaniach, w których uczestniczyłam określono ekspresję wisfatyny oraz prozapalnych cytokin w surowicy, leukocytach i komórkach epitelialnych jelita od pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz chorobą Crohna. Wykazano, że u pacjentów z niespecyficznym zapaleniem jelita poziom Namp1 był podwyższony zarówno na poziomie białka jak i RNA, sugerując tym samym jego rolę jako potencjalnego markera w diagnostyce niespecyficznego zapalenia jelita

P28. Neubauer K, Bednarz-Misa I, Wałęcka-Zacharska E, Wierzbicki J, Agrawal A, Gamian A, Krzystek-Korpaczka M. Oversecretion and overexpression of nicotinamide phosphoribosyltransferase/Pre-B colony-enhancing factor/visfatin in inflammatory bowel disease reflects the disease activity, severity of inflammatory response and hypoxia. *Int J Mol Sci* 2019, 20, 166.

Badania nad skutecznością promieniowej jonizacji katalitycznej w eliminacji pałeczek *Klebsiella pneumoniae* NDM

Klebsiella pneumoniae NDM stanowi poważne zagrożenie dla hospitalizowanych pacjentów, dlatego też niezmiernie ważna jest jej eradykacja ze środowiska szpitalnego. Celem badań była ocena skuteczności promieniowej jonizacji katalitycznej (ang. radiant catalytic ionization, RCI) w eliminacji tych pałeczek z powietrza oraz różnych materiałów stosowanych do ścielenia łóżek szpitalnych. Dowiedziono, że RCI skutecznie redukowałą liczbę bakterii ze wszystkich badanych powierzchni oraz w powietrzu, wskazując tym samym na możliwość zastosowania tej technologii do dezynfekcji w szpitalach.

P29. Skowron K, Wiktorczyk N, Kwiecińska-Piróg J, Sękowska A, Wałęcka-Zacharska E, Gospodarek-Komkowska E. Elimination of *Klebsiella pneumoniae* NDM from the air and selected surfaces in hospital using radiant catalytic ionization. *Lett Appl Microbiol* 2019, 69, 333-338.

7.3 Nagrody i wyróżnienia

- 2010 – zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu I stopnia w dziedzinie badań naukowych,
- 2011 – zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu I stopnia w dziedzinie badań naukowych,
- 2013 – indywidualna Nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu I stopnia za osiągnięcia naukowe,
- 2016 – laureatka Stypendium Fundacji na rzecz Nauki Polskiej dla Młodych Uczonych START,

- 2016 - zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu I stopnia w dziedzinie badań naukowych,
 2017 – zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu I stopnia w dziedzinie badań naukowych,
 2019 – zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu I stopnia w dziedzinie badań naukowych.

7.4 Zestawienie liczbowe dorobku naukowego

Tabela 1. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego.

Kategorie prac	Przed doktoratem	Po doktoracie	Łącznie
1. Oryginalne prace twórcze	8	20	28
2. Artykuły popularnonaukowe	0	1	1
3. Komunikaty opublikowane w materiałach konferencji naukowych	2	9	11
4. Rozdziały w monografiach	1	0	1
Łącznie	11	30	41

Tabela 2. Sumaryczna punktacja publikacji.

	Przed doktoratem	Po doktoracie	Łącznie
Sumaryczny <i>Impact factor</i> publikacji ¹	10,758	51,425	62,183
Sumaryczna punktacja MNiSW publikacji ²	186	809	995

Liczba cytowań według bazy Web of Science*: **174**, bez autocytowań : **162**

Liczba cytowań według bazy Scopus*: **179**, bez autocytowań : **168**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **7**

Indeks Hirscha według bazy Scopus: **7**

Sumaryczna punktacja zawarta w tabeli 2 dotyczy publikacji zweryfikowanych przez Bibliotekę UPWr.

¹ **Wartości IF** podano zgodnie z wartością w roku publikacji. Dla artykułów opublikowanych po 2018 zgodnie z wartością IF w roku 2018.

² **Punktację MNiSW** podano zgodnie z wykazem MNiSW w roku publikacji. Dla artykułów opublikowanych po 2018 zgodnie z wykazem MNiSW opublikowanym 31.07.2019.

PIŚMIENNICTWO

Bruno J., Freitag N. *Listeria monocytogenes* adapts to long-term stationary phase survival without compromising bacterial virulence. *FEMS Microbiol Lett* 2011, 323, 171-179.

Buncic S., Avery S.M., Rocourt J., Dimitrijevic M. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int J Food Microbiol* 2001, 65, 201-212.

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 2018.

Gilmour M.W., Graham M., Van Domselaar G., Tyler S., Kent H., Trout-Yakel K.M., Larios O., Allen V., Lee B., Nadon C. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* 2010, 18, 11:120.

Kazmierczak M.J., Wiedmann M., Boor K.J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *J Bacteriol* 2005, 185, 5722-5734.

Kazmierczak M.J., Mithoe S.C., Boor K.J., Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J Bacteriol* 2003, 185, 5722-5734.

Kim, H., Boor, K.J. and Marquis, H. *Listeria monocytogenes* sigmaB contributes to invasion of human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2004, 72, 7374-7378.

Kim, H., Marquis, H. and Boor, K.J. SigmaB contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of inlA and inlB. *Microbiology* 2005, 151, 3215-3222.

Law R.J., Gur-Arie L., Rosenshine I., Finlay B.B. In vitro and in vivo model systems for studying enteropathogenic *Escherichia coli* infections. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013, 3, a009977.

McWilliams, G.; Furey, S.; Williamson, T.; O'Brolchain, M.; Anderson, W.; Quinn, G. Issuing temperature guidance to consumers on the cooking and storage of food. *Safefood* 2004, 1-22.

Melo J., Andrew P.W., Faleiro M.L.: *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res Int* 2015, 64, 75-90.

Minor T, Lasher A, Klontz K, Brown B, Nardinelli C, Zorn D. The per case and total annual costs of foodborne illness in the United States. *Risk Analysis* 2015, 35, 1125-1139.

Nelson K.E., Fouts D.E., Mongodin E.F., Ravel J., DeBoy R.T., Kolonay J.F., Rasko D.A., Angiuoli S.V., Gill S.R., Paulsen I.T., Peterson J., White O., Nelson W.C., Nierman W., Beanan M.J., Brinkac L.M., Daugherty S.C., Dodson R.J., Durkin A.S., Madupu R., Haft D.H., Selengut J, Van Aken S., Khouri H., Fedorova N., Forberger H., Tran B., Kathariou S., Wonderling L.D., Uhlich G.A., Bayles D.O., Luchansky J.B., Fraser C.M. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res* 2004, 32, 2386-2395.

- Neuhaus K., Satorhelyi P., Schauer K., Scherer S., Fuchs T.M., Acid shock of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures induces *prfA*, epithelial cell invasion, and lethality towards *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* 2013, 14, 285.
- Nightingale K.K., Schukken Y.H., Nightingale C.R., Fortes E.D., Ho A.J., Her Z., Grohn Y.T., McDonough P.L., Wiedmann M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70, 4458-4467.
- Nightingale K.K., Windham K.E., Yeung M., Wiedmann M. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71, 8764-8772.
- Nishikawa K, Yoshida M, Kusuhara M, Ishigami N, Isoda K, Miyazaki K, Ohsuzu F. Left ventricular hypertrophy in mice with a cardiac-specific overexpression of interleukin-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, 291, H176-83.
- Olesen I., Vogensen F.K., Jespersen L. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Food Pathog Dis* 2009, 6, 669–680.
- Orsi R.H., den Bakker H.C., Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*. 2011, 301, 79-96.
- Pricope L., Nicolau A., Wagner M., Rychli K.: The effect of sublethal concentrations of benzalkonium chloride on invasiveness and intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2013, 31, 230-235.
- Pricope-Ciolacu L., Nicolau A., Wagner M., Rychli K.: The effect of milk components and storage conditions on the virulence of *Listeria monocytogenes* as determined by a Caco-2 cell assay. *Int J Food Microbiol* 2013, 166, 59-64.
- Radoshevivh L., Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Rev Microbiol* 2018, 15, 32-46.
- Ragon M., Wirth T., Hollandt F., Lavenir R., Lecuit M., Le Monnier A. Brisse, S. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog* 2004, 4, e1000146.
- Rakic Martinez M., Wiedmann M., Ferguson M., Datta A.R. Assessment of *Listeria monocytogenes* virulence in the *Galleria mellonella* insect larvae model. *PLoS ONE* 2017, 12, e0184557.
- Ress, C.E.; Dodd, C.E.; Gibson, P. T.; Booth, I.R.; Stewart, G.S. Significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *Int J Food Microbiol* 1955, 28, 263-275.
- Roche SM, Velge P, Bottreau E, Durier C, Marquet-van der Mee N, Pardon P. Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *Int J Food Microbiol* 2001, 68, 33-44.
- Roche SM, Gracieux P, Milohanic E, Albert I, Virlogeux-Payant I, Témoin S, Grépinet O, Kerouanton A, Jacquet C, Cossart P, Velge P. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71, 6039-6048.

Roche S.M., Grépinet O., Kerouanton A., Ragon M., Leclercq A., Témoin S., Schaeffer B., Skorski G., Mereghetti L., Le Monnier A., Velge P. Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates,” BMC Microbiol 2012, 12, 304-315.

Skandamis P. N., Yoon Y., Stopforth J. D., Kendall P. A., Sofos J. N., “Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stress” . Food Microbiology 2008, 25, 294-303.

Stollewerk K., Cruz C.D., Fletcher G., Garriga M., Jofré A. The effect of mild preservation treatments on the invasiveness of different *Listeria monocytogenes* strains on Greenshell mussels. Food Control 2017, 71, 322-328.

Swaminathan B., Gerner-Smidt P.: The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection 2007, 9, 1236-1243

Témoin S., Roche S.M., Grépinet O., Fardini Y., Velge P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. Microbiology 2008, 154, 939-948.

van der Veen, S., Moezelaar, R., Abee, T., Wells-Bennik, M.H. The growth limits of a large number of *Listeria monocytogenes* strains at combinations of stresses show serotype- and niche-specific traits. J Appl Microbiol 2008, 105, 1246-1258.

Vandenberg O., Dediste A., Houf K., Ibekwem S., Souayah H., Cadranel S., Douat N., Zisis G., Butzler J.P., Vandamme P. *Arcobacter* species in humans. Emerg Infect Dis 2004, 10, 1863-1867.

Zhou X., Jiao X., Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* in the Chinese food system: strain characterization through partial actA sequencing and tissue-culture pathogenicity assays. J Med Microbiol 2005, 54, 217-224.

E. Huel-Deceuf