

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko

Dorota Korsak

Nazwisko panińskie: Żaczek

2 Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- **2004.** Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, nadany uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Fizjologiczna rola białka wiążącego penicylinę *Listeria monocytogenes* EGD kodowanego przez gen *lmo2754*”.

Promotor: prof. dr hab. Zdzisław Markiewicz (Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski),

Recenzenci: prof. dr hab. Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka (Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski) oraz prof. dr hab. Stanisław Tyski (Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków).

- **1995.** Tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tytuł pracy magisterskiej: „Charakterystyka osłon *Yersinia kristensenii*”.

Opiekun pracy: prof. dr hab. Zdzisław Markiewicz.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 01.04.2019 do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 01.10.2016 – 31.03.2019: asystent w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 01.10.2005 – 30.09.2016: adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 01.10.2005 do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Żywności i Suplementów Diety Instytutu Żywności i Żywienia im. prof. dra n. med. Aleksandra Szczygła
- 01.03.2000 – 30.09.2005: starszy specjalista badawczo-techniczny w Pracowni Mikrobiologii Narodowego Instytutu Żywności i Żywienia im. prof. dra n. med. A. Szczygła
- 02.01.1995 – 29.02.2000: technolog w Pracowni Mikrobiologii Narodowego Instytutu Żywności i Żywienia im. prof. dra n. med. A. Szczygła

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Oporność na antybiotyki, związki dezynfekcyjne oraz metale ciężkie bakterii z rodzajów *Listeria* i *Campylobacter*, wyizolowanych z żywności i zakładów przetwórstwa spożywczego

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczególnym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy

- i.** Maćkiw E.,[†] **D. Korsak**, K. Rzewuska, K. Tomczuk, E. Rożynek. **2012.** Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Control*, 23: 297–301
IF₂₀₁₂ – 2,738; IF_{5-letni} – 3,006; punktacja MNiSW – 40 pkt; liczba cytowań (wg bazy Web of Science, WoS) – 26

Wkład habilitantki: **25%**. Współautorstwo koncepcji badań; udział w analizie wyników badań oraz w przygotowaniu manuskryptu.

- ii.** **Korsak D.**,[†] A. Borek*, S. Daniluk*, A. Grabowska*, K. Pappelbaum. **2012.** Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 158: 203–208
IF₂₀₁₂ – 3,425; IF_{5-letni} – 3,938; MNiSW – 40 pkt; liczba cytowań (wg WoS) – 34

Wkład habilitantki: **80%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; pozyskanie środków na finansowanie badań (grant MNiSW 25553/B/P01/2008/35); utworzenie kolekcji szczepów *Listeria* spp.; opieka nad studentkami (Anna Borek, Sylwia Daniluk, Anna Grabowska) podczas wykonywania przez nie badań, które weszły w skład publikacji; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu, w tym wszystkich tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- iii.** Rożynek E., E. Maćkiw, W. Kamińska, K. Tomczuk, M. Antos-Bielska, K. Dzierżanowska-Fangrat, **D. Korsak**[†]. **2013.** Emergency of macrolide-resistant *Campylobacter* strains in chicken meat in Poland and the resistance mechanism involved. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10: 655–660
IF₂₀₁₃ – 2,092; IF_{5-letni} – 2,399; MNiSW – 30 pkt; liczba cytowań (wg WoS) – 7

Wkład habilitantki: **55%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie oraz przeprowadzenie części doświadczeń (badanie zmienności w regionie *cmeE*-IRregion-*cmeA*); przeprowadzenie wszystkich analiz *in silico* sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu, w tym tabeli i ryciny; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- iv. **Korsak D.,[†] E. Maćkiw, E. Rożynek, M. Żyłowska. 2015.** Prevalence of *Campylobacter* spp. in retail chicken, turkey, pork, and beef meat in Poland between 2009 and 2013. *Journal of Food Protection*, 78: 1024–1028
IF₂₀₁₅ – 1,609; IF_{5-letni} – 1,963; MNiSW – 30; liczba cytowań (wg WoS) – 12

Wkład habilitantki: **65%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań (udział w opracowaniu algorytmu postępowania dla Głównego Inspektoratu Sanitarnego, dotyczącego pobierania próbek do badania żywności, w ramach monitoringu żywności w zakresie zanieczyszczeń mikrobiologicznych termotolerancyjnymi bakteriami z rodzaju *Campylobacter*); planowanie i kontrola nad badaniami wykonywanymi w pracowni mikrobiologii IŻŻ; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu, w tym tabeli; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- v. **Korsak D.,[†] A. Krawczyk-Balska. 2016.** Rifampicin and rifabutin resistant *Listeria monocytogenes* strains isolated from food products carry mutations in *rpoB* gene. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13: 363–368
IF₂₀₁₆ – 2,129; IF_{5-letni} – 2,234; MNiSW – 30 pkt; liczba cytowań (wg WoS) – 0

Wkład habilitantki: **90%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie wszystkich badań eksperymentalnych; analiza *in silico* sekwencji genu *rpoB* oraz kodowanego przez niego białka; analiza statystyczna wyników; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu, w tym wszystkich tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- vi. **Korsak D.,[†] M. Szuplewska. 2016.** Characterization of nonpathogenic *Listeria* species isolated from food and food processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 238: 274–280
IF₂₀₁₆ – 3,339; IF_{5-letni} – 3,771; MNiSW – 40 pkt; liczba cytowań (wg WoS) – 3

Wkład habilitantki: **75%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części badań eksperymentalnych (zaklasyfikowanie badanych szczepów *Listeria* do poszczególnych gatunków; oznaczenie wrażliwości na substancje przeciwbakteryjne, badanie rozpowszechnienia plazmidów); opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu, w tym wszystkich tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- vii. **Korsak D.,[†] A. Krawczyk-Balska. 2017.** Identification of the molecular mechanism of trimethoprim resistance in *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14: 696–700
IF₂₀₁₇ – 2,476; IF_{5-letni} – 2,406; MNiSW – 30 pkt; liczba cytowań (wg WoS) – 0

Wkład habilitantki: **75%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji i planu badań; wykonanie części eksperymentów (otrzymanie szczepów spontanicznych mutantów opornych na trimetoprim, określenie częstości mutacji, oznaczenie wrażliwości szczepów mutantów *L. monocytogenes* oraz szczepów *E. coli* na trimetoprim); analiza *in silico* sekwencji nukleotydowej promotora genu *dhfr* oraz sekwencji aminokwasowej produktu tego genu; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu, w tym wszystkich tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- viii. **Korsak D.**,[†] C. Chmielowska**, M. Szuplewska, D. Bartosik. **2019.** Prevalence of plasmid-borne benzalkonium chloride resistance cassette *bcrABC* and cadmium resistance *cadA* genes in nonpathogenic *Listeria* spp. isolated from food and food-processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 290: 247–253
IF₂₀₁₇ – 3,451; IF_{5-letni} – 3,972; MNiSW – 40 pkt; liczba cytowań (wg WoS) – 0

Wkład habilitantki: **60%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części badań eksperymentalnych (określenie częstości występowania genów kodujących kasetę *bcrABC* oraz genów *cad* determinujących oporność na kadm w szczepach *Listeria* spp.); opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu, w tym wszystkich tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

[†] – autor korespondencyjny

* Studenci wykonujący pod moim kierunkiem prace dyplomowe w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

** Doktoranci wykonujący prace w Zakładzie Genetyki Bakterii (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – **21,259**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW – **280**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, do dnia złożenia wniosku (wg WoS) – **82**

- c) **Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

WPROWADZENIE

Bakterie charakteryzuje duża zmienność, zarówno na poziomie genetycznym, jak i metabolicznym, która pozwala im na zasiedlanie różnorodnych nisz ekologicznych. Duża plastyczność tych mikroorganizmów pozwala im również na szybkie dostosowanie się do zmian zachodzących w środowisku, w tym również wynikających z pojawienia się szkodliwych dla nich substancji.

W drodze ewolucji bakterie wykształciły kilka głównych mechanizmów determinujących oporność na środki przeciwbakteryjne. Oporność ta może być spowodowana np.: (i) zmianą (inaktywacją) leku w jego nieaktywną pochodną przez specyficzne enzymy, (ii) modyfikacją lub zablokowaniem miejsca docelowego działania leku, (iii) zahamowaniem transportu leku do wnętrza komórki w wyniku zmian przepuszczalności osłon komórkowych, (iv) usuwaniem leku z komórki na drodze aktywnego transportu przez systemy transportowe, tzw. pompy, (v) wytworzeniem alternatywnej drogi umożliwiającej ominięcie etapu wrażliwego na lek (ang. *by-pass*), lub (vi) zmianą funkcjonowania systemów regulacyjnych, niezwiązanych bezpośrednio z mechanizmem działania leku (Munita i Arias, 2016).

Bakterie nabywają oporność w dwojaki sposób: (i) w wyniku mutacji, np. w genach, które (same lub ich produkty białkowe) są celem działania dla takich środków,

lub (ii) nabywania egzogennej DNA wraz z determinantami oporności od innych, nawet odległych filogenetycznie gatunków bakterii, w wyniku horyzontalnego transferu genów (HGT, ang. *horizontal gene transfer*). Główną rolę w generowaniu oporności na drodze HGT odgrywają ruchome elementy genetyczne (MGE, ang. *mobile genetic elements*), wśród których kluczową rolę odgrywają plazmidy i elementy transpozycyjne (TE, ang. *transposable elements*) (Aleksun i Levy, 2007).

Należy podkreślić, że oporność na jeden środek przeciwbakteryjny może wynikiem kooperatywnego działania różnych mechanizmów, a także, że oporność szczepu bakterii na dany środek przeciwbakteryjny może być powodowana przez różne, niezależnie działające mechanizmy.

Oporność na leki przeciwbakteryjne jest jednym z najważniejszych problemów współczesnej medycyny, rzutującym na efektywność leczenia wielu chorób zakaźnych. Zjawisko to ma wymiar globalny i stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Oporność bakterii narasta bardzo dynamicznie, a tempo jej rozprzestrzeniania jest niewspółmiernie większe niż wprowadzanie nowych substancji przeciwbakteryjnych do terapii. Przyczyny tej sytuacji przewidział i wskazał już ponad 70 lat temu odkrywca pierwszego antybiotyku – Aleksander Fleming, ostrzegając, podczas wykładu "noblowskiego", przed nierozważnym stosowaniem antybiotyków.

Pojawianie się coraz większej liczby szczepów opornych spowodowane jest przede wszystkim nadmiernym lub niewłaściwym stosowaniem środków przeciwdrobnoustrojowych w wielu różnych sektorach, m.in. medycyny, medycyny weterynaryjnej, produkcji zwierzęcej, rolnictwa, przemysłu spożywczego, ochrony środowiska, handlu i in. Skutki nieprawidłowego stosowania takich środków w jednym z sektorów, dotyczą wszystkie pozostałe. Począwszy od lat 50-tych XX wieku, w weterynarii, w leczeniu zakażeń bakteryjnych lub w celu zapobiegania wystąpieniu objawów chorobowych, w zabiegach zootechnicznych, w transporcie zwierząt oraz jako stymulatory wzrostu w paszach, stosowano substancje, które należały do tych samych grup związków chemicznych co antybiotyki/chemioterapeutyki stosowane w terapii lub profilaktyce zakażeń bakteryjnych u ludzi (Founou i wsp., 2016).

Konsekwencją powszechnego stosowania tych związków, zwłaszcza w profilaktyce oraz produkcji zwierzęcej, był wzrost częstości występowania szczepów antybiotykoopornych izolowanych od zwierząt. Jednym z przykładów jest oporność na antybiotyki glikopeptydowe, w tym wankomycynę, uznawaną do niedawna za tzw. lek ostatniej szansy. Jako jedną z przyczyn pojawienia się szczepów *Enterococcus* spp. opornych na wankomycynę wskazuje się stosowanie awoparcyny jako dodatku do pasz w hodowli (Różańska i wsp., 2013). Biorąc pod uwagę zagrożenia dla zdrowia publicznego, jakie związane są z narastaniem oporności wśród szczepów odzwierzęcych, w roku 2006 Unia Europejska zakazała stosowania jakichkolwiek antybiotyków/chemioterapeutyków w chowie i hodowli zwierząt, z wyjątkiem zastosowań terapeutycznych (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1831/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt).

Bakterie odporne mogą przenosić się wzdłuż łańcucha pokarmowego w sposób bezpośredni lub pośredni. Do przeniesienia szczepów opornych może zatem dojść: (i) w wyniku bezpośredniego kontaktu człowieka ze zwierzętami, które są skolonizowane przez odporne bakterie komensalne czy patogenne, lub (ii) kontaktu z substancjami biologicznymi, takimi jak krew, mocz, kał, ślina, i nasienie pochodzenia odzwierzęcego.

Szczególnie narażeni są lekarze weterynarii, pracownicy rzeźni, rolnicy czy osoby zajmujące się przetwórstwem żywności pochodzenia zwierzęcego. Początkowo ten sposób transmisji szczepów opornych bagatelizowano. Dowiedziono jednak jednoznacznie, że osoby mające bezpośredni kontakt z takimi zwierzętami mogą wprowadzać bakterie odporne do środowiska człowieka, w tym środowiska szpitalnego (Marshall i Levy, 2011). Do przeniesienia szczepów opornych może również dojść w wyniku spożycia żywności zanieczyszczonej takimi szczepami, a dotyczy to zarówno żywności pochodzenia zwierzęcego (np. mięso, ryby, owoce morza, jaja, mleko i produkty mleczne itd.) jak i żywności pochodzenia roślinnego. W licznych publikacjach i raportach pojawiają się informacje o izolacji, zarówno od zwierząt, jak i z różnych rodzajów żywności pochodzenia zwierzęcego, szczepów opornych i wieloopornych (EFSA, 2018; Founou i wsp., 2016). Ponadto dowiedziono, że izolowano od ludzi i z żywności szczepy odporne mogą należeć do jednego typu klonalnego (lub bardzo blisko spokrewnionych typów), co wskazuje, że źródłem tych szczepów była żywność (Acar i Moulin, 2006; Marshall i Levy, 2011).

Ranga problemu narastania oporności wśród bakterii, powiązanie tego zjawiska ze stosowaniem antybiotyków i chemioterapeutyków, oraz zagrożenie dla zdrowia publicznego, doprowadziły do intensyfikacji badań nad klinicznymi aspektami oporności oraz monitorowania tego zjawiska u bakterii zoonotycznych – zarówno patogennych (bezpośrednio zagrażających zdrowiu ludzi), jak i komensalnych (będących potencjalnym rezerwuarem genów oporności i indykatorem stosowania substancji przeciwbakteryjnych).

Mimo rosnącej świadomości zagrożeń, monitorowanie antybiotykooporności wśród drobnoustrojów bytujących w żywności oraz wiedza na temat znaczenia tego zjawiska dla medycyny i weterynarii są niewystarczające. Brakuje ujednoczonych wytycznych międzynarodowych, które pozwoliłyby zbadać to zjawisko w skali globalnej. Niewątpliwie, wielosektorowe podejście do walki z antybiotykoopornością wymaga skoordynowania działań w zakresie monitorowania oporności wśród bakterii pochodzących z żywności i przenikających do łańcucha pokarmowego. Zintegrowany system monitorowania antybiotykooporności powinien umożliwiać porównanie danych na temat rozpowszechnienia zjawiska antybiotykooporności w hodowlach zwierzęcych, wśród drobnoustrojów występujących w żywności oraz w organizmach ludzi.

Na mocy obowiązujących w Polsce uregulowań prawnych (dyrektywa 2003/99/WE Parlamentu Europejskiego i Rady) kraje członkowskie Unii Europejskiej są zobowiązane do wykrywania określonych chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych u zwierząt oraz w produktach pochodzenia zwierzęcego, w celu zapobiegania zakażeniom i zatruciom przenoszonym przez żywność. Do grupy czynników zoonotycznych, które podlegają monitoringowi zaliczono między innymi bakterie *Campylobacter* spp. i *Listeria monocytogenes*. Dodatkowo kraje członkowskie Unii Europejskiej na mocy Decyzji Wykonawczej Komisji Europejskiej 2013/652/UE są zobowiązane do monitorowania lekooporności między innymi *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* pochodzących od zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego wytworzonej z tych gatunków.

Bakterie *Campylobacter* spp.

Termotolerancyjne gatunki bakterii z rodzaju *Campylobacter*, zwłaszcza *C. jejuni* i *C. coli*, są uznawane za główną przyczynę bakteryjnego zapalenia żołądka i jelit u ludzi. Bakterie te są jednym z czterech kluczowych czynników odpowiadających za przypadki biegunek na świecie (WHO). Kliniczna manifestacja choroby bywa bardzo różnorodna, obejmuje bowiem zarówno przypadki bezobjawowe, jak i ostre stany zapalne jelit, którym

towarzyszy długotrwała krwawa i śluzowa biegunka. Pałeczki *Campylobacter* spp. są także coraz częściej identyfikowane jako przyczyna ostrych stanów zapalnych obwodowego układu nerwowego (tzw. zespół Guillaina-Barré), reaktywnego artretyzmu oraz charakteryzujących się wysoką śmiertelnością ogólnoustrojowych infekcji (Poropatich i wsp., 2010). W krajach europejskich od 2005 r. kamylobakterioza jest najczęściej rejestrowaną chorobą odzwierzęcą. W 2017 roku liczba potwierdzonych przypadków wynosiła 246158 ze średnią zapadalnością 64,8 na 100000 osób. Jednak mimo dużej liczby przypadków, śmiertelność jest na niskim poziomie – 0,04% (EFSA, 2018). Zakażeniom pokarmowych na tle *Campylobacter* sprzyja niska dawka infekcyjna (już 500 komórek może wywołać pełnoobjawowe zakażenia), przy czym zależna jest ona od szczepu oraz wieku i wrażliwości osobniczej człowieka. Zachorowaniom sprzyja również szerokie rozpowszechnienie pałeczek z tego rodzaju w przyrodzie. Naturalnym rezerwuarem tych drobnoustrojów jest przewód pokarmowy zwierząt stałocieplnych. Ich obecność stwierdza się zarówno u zwierząt hodowlanych (takich jak, drób, bydło, świnie, owce, psy i koty), jak i u dzikiego ptactwa (Altekruse i Tollefson, 2003; Humphrey i wsp. 2007). Istotnym rezerwuarem *Campylobacter* spp., szczególnie w miesiącach zimowych, są osady denne zbiorników wodnych, w tym również wód morskich (Pitkänen, 2013). Konsekwencją występowania tych mikroorganizmów w środowisku jest ich obecność w surowcach pochodzenia zwierzęcego oraz produktach spożywczych. Często izolowane są z różnego rodzaju mięs, surowego mleka i produktów mlecznych, rzadziej ryb i produktów rybnych, owoców morza oraz warzyw (EFSA, 2018). Do zakażenia ludzi dochodzi przede wszystkim w wyniku spożycia surowego lub niedogotowanego zanieczyszczonego mięsa, głównie drobiowego, ale także wieprzowego i wołowego, zanieczyszczonego mleka lub wody (Blaser i Engberg, 2008). Do zakażenia może dojść także w wyniku bezpośredniego kontaktu ze zwierzętami domowymi lub hodowlanymi. W warunkach domowych przyczyną zakażenia mogą być zanieczyszczenia krzyżowe, tj. przeniesienie bakterii, m.in. pochodzących z wysięku z surowego mięsa, na ręce osoby przygotowującej potrawę lub na sprzęt kuchenny i inne potrawy (Hilton i Austin, 2000).

Bakterie *Listeria* spp.

Do rodzaju *Listeria* zalicza się obecnie 20 gatunków (Leclercq i wsp., 2019). *L. monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi* to gatunki, które występują powszechnie w środowisku naturalnym (w glebie, wodzie, roślinach, ściekach), a niektóre z nich bytują w przewodach pokarmowych zwierząt, takich jak ssaki, ptaki, ryby, gady, płazy, skorupiaki i owady (Luque-Sastre i wsp., 2018; Orsi i Wiedman, 2016). W obrębie tego rodzaju jedynie dwa gatunki, *L. monocytogenes* i *L. ivanovii*, są patogenne. *L. monocytogenes* może wywoływać sporadyczne, lecz ciężkie zakażenia, zarówno u ludzi, jak i zwierząt. Pojawiają się jednak nieliczne doniesienia, w których opisywane są przypadki listeriozy u ludzi wywołanej przez *L. ivanovii*, *L. innocua* i *L. seeligerii*. *L. ivanovii* jest natomiast patogenem zwierząt (owiec i bydła). Sporadyczne przypadki listeriozy, głównie u owiec, powoduje również *L. innocua* (Luque-Sastre i wsp., 2018). Zakażenie u ludzi zwykle przybiera w postaci łagodnego nieżytu żołądkowo-jelitowego (ang. *listerial gastroenteritis*), a niekiedy przybiera formę ostrej infekcji (ang. *invasive listeriosis*). U zdrowych dorosłych najczęściej rozwija się łagodna forma infekcji z typowymi dolegliwościami ze strony przewodu pokarmowego. Częstość występowania infekcji o łagodnym przebiegu jest trudna do oszacowania, ponieważ część zatruć pokarmowych wywołanych przez *L. monocytogenes* może przebiegać bezobjawowo.

Do grupy największego ryzyka zakażenia *L. monocytogenes* należą kobiety ciężarne, noworodki, osoby powyżej 65 roku życia i chorzy z upośledzoną odpornością układu

immunologicznego. U osób o obniżonej odporności (np. chorzy na nowotwory, AIDS czy osoby przyjmujące leki immunosupresyjne) i u osób starszych głównie dochodzi do zakażenia układu nerwowego (zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, ropnia mózgu) lub zakażenia ogólnego z typowymi objawami posocznicy. Innymi również niebezpiecznymi powikłaniami są: zapalenie wsierdza, zapalenie i ropnie wątroby, zapalenie otrzewnej, ropnie gałki ocznej, infekcje skórne, zapalenie stawów czy szpiku kostnego (Doganay, 2003; Ghandi i Chikindas, 2007). Drugą grupę zachorowań stanowią zakażenia okołoporodowe. U kobiet w ciąży występuje sepsa z lekkimi objawami klinicznymi przypominającymi grypę. Jednak w wyniku infekcji, w większości przypadków dochodzi do zakażenia płodu, co objawia się poronieniem lub przedwczesnym porodem. U noworodków zakażonych w życiu płodowym rozwija się wczesny zespół objawów infekcji i ma on postać posocznicy. W przypadku późnej listeriozy noworodek rodzi się zdrowy, a choroba ujawnia się zwykle od 8 do 30 dni od porodu i jest to zazwyczaj zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (Slutsker i Schuchat, 1999).

Konsekwencją powszechnego występowania *L. monocytogenes* w środowisku, relatywnie wysokiej odporności na czynniki fizyczno-chemiczne, a także wyjątkowej w świecie bakterii zdolności nie tylko do przeżycia, lecz również do namnażania się w szerokim zakresie temperatur, jest jej obecność w surowcach zwierzęcych i roślinnych oraz produktach spożywczych. Bakteria ta izolowana jest z produktów mlecznych (miękkich i pół-miękkich serów), różnych rodzajów mięs i produktów zawierających mięso, ryb i produktów zawierających mięso z ryb, owoców morza oraz warzyw i owoców (EFSA, 2018). Szacuje się, że 99% przypadków zakażeń u ludzi wywołanych przez *L. monocytogenes* jest spowodowanych spożyciem żywności zanieczyszczonej pierwotnie lub wtórnie tym drobnoustrojem (Scallan i wsp, 2011). Na świecie, w zależności od regionu i kraju, każdego roku odnotowuje się średnio od 0,1 do 10 przypadków infekcji o ostrym przebiegu na milion mieszkańców (WHO). W Unii Europejskiej w 2017 r. zarejestrowano 2480 przypadków listeriozy (średnia zapadalność wynosiła 0,48 przypadki na 100 tys.) (EFSA, 2018). Listerioza jest rzadką chorobą, jednak przebiega z wysoką śmiertelnością, sięgającą 30%, pomimo stosowania w leczeniu terapii antybiotykowej. Cecha ta, w połączeniu z częstą obecnością *L. monocytogenes* w żywności, zdecydowanie wyróżnia listeriozę spośród innych zatruc pokarmowych, i podkreśla jak poważny stanowi ona problem dla zdrowia publicznego (Olaimat i wsp., 2018).

Celem naukowym prac opisujących osiągnięcie naukowe, będące podstawą postępowania habilitacyjnego, było (i) określenie zakresu rozprzestrzenienia fenotypów oporności na różne związki przeciwbakteryjne wśród szczepów bakterii izolowanych z żywności, oraz (ii) poznanie molekularnego podłoża tego zjawiska. Badania przeprowadzono na modelu termotolerancyjnych gatunków bakterii z rodzaju *Campylobacter* oraz bakterii z rodzaju *Listeria*, w tym *L. monocytogenes*. Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 8 powiązanych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2012-2019.

A. Ocena wrażliwości szczepów *Campylobacter* spp. na leki stosowane w leczeniu kamylobakteriozy oraz określenie molekularnego podłoża oporności bakterii

Publikacje:

Maćkiw E., **D. Korsak**, K. Rzewuska, K. Tomczuk, E. Rożynek. **2012**. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Control*, 23: 297–301

Rożynek E., E. Maćkiw, W. Kamińska, K. Tomczuk, M. Antos-Bielska, K. Dzierżanowska-Fangrat, **D. Korsak**. **2013**. Emergency of macrolide-resistant *Campylobacter* strains in chicken meat in Poland and the resistance mechanism involved. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10: 655–660

Bakterie *Campylobacter* są z reguły wrażliwe na różne środki antybakteryjne, jednak w ostatnich latach udokumentowano wzrastającą oporność wśród szczepów izolowanych od ludzi i zwierząt na powszechnie stosowane leki przeciwbakteryjne, co może stanowić poważny problem w leczeniu zakażeń wywołanych przez te mikroorganizmy.

Za lek z wyboru w leczeniu kamylobakteriozy uznawana jest erytromycyna lub azytromycyna (makrolidy). O zastosowaniu tych leków w terapii decyduje zazwyczaj łatwość ich użycia, niewystępowanie poważnych działań niepożądanych, a przede wszystkim stosunkowo wysoki stopień skuteczności klinicznej. W przypadku stwierdzonych stanów zapalnych jelit bez identyfikacji czynnika etiologicznego powodującego chorobę stosuje się również fluorochinolony. Alternatywnie, w leczeniu ogólnoustrojowych infekcji wywołanych przez *Campylobacter* można stosować tetracyklinę (tetracykliny), gentamicynę (aminoglikozydy) czy chloramfenikol (Achson i Allos, 2001; Blaser i Engberg, 2008).

Głównym celem badań dotyczących bakterii *Campylobacter*, które prowadziłam, było (i) dokonanie oceny wrażliwości szczepów izolowanych z różnych rodzajów mięsa kurcząt, dostępnego w sprzedaży, na leki przeciwdrobnoustrojowe, które stosowane są w leczeniu kamylobakteriozy u ludzi oraz w weterynarii, a także (ii) zbadanie molekularnego podłoża stwierdzonych fenotypów oporności. Próbkę do badań, zarówno schłodzone mięso kurczaków (161), jak i podroby (57) pobierano w okresie od stycznia 2008 do grudnia 2009 r. Bakterie izolowano zgodnie ze standardową procedurą opisaną w normie PN-EN ISO 10272-1:2007/Ap1:2008P. Przynależność do określonego gatunku potwierdzano metodą PCR stosując specyficzne startery (On i Jordan, 2003). 143 próbek (65,6% badanych) zanieczyszczonych było bakteriami *Campylobacter*. Dominującym gatunkiem był *C. coli*, którego obecność stwierdzono w 75,5% próbek. W pozostałych występował *C. jejuni*. Analiza fenotypów oporności, przeprowadzona metodą dyfuzyjno-krażkową, pokazała, że 127 (88,8%) izolatów było opornych przynajmniej na jedną z czterech badanych substancji, a 10 (7%) na co najmniej trzy. Największy odsetek szczepów opornych dotyczył ciprofloksacyny (97,9% *C. coli* i 100% *C. jejuni*), następnie tetracykliny (62% *C. coli* i 71,4% *C. jejuni*). Czternaście izolatów (9,8%), w tym 10 *C. coli* (9,3%) i 4 *C. jejuni* (11,4%) było opornych na erytromycynę, natomiast 9 (6,3%), w tym 6% *C. jejuni* i 4% *C. coli*.

W szczepach *Campylobacter* wysoki poziom oporności na fluorochinolony jest związany z występowaniem punktowych mutacji w tzw. obszarze warunkującym oporność na chinolony (ang. *QRDRs*) w genie *gyrA* kodującym podjednostkę A topoisomazy II (gyrazy) (Fàbrega i wsp., 2009; Rzewuska i wsp., 2010). Przeprowadzone badania pokazały, że oporność wszystkich izolatów jest wynikiem tranzykcji C→T w kodonie 86, genu *gyrA*, która skutkuje zmianą treoniny na izoleucynę.

Z kolei we wszystkich izolatach fenotypowo opornych na tetracykliny wykazano obecność genu *tet(O)*. Gen ten koduje białko Tet(O), które pełni funkcje ochronne, uniemożliwiając przyłączenie antybiotyku do rybosomu. Jednym z mechanizmów warunkujących wysoki poziom oporności na erytromycynę szczepów *Campylobacter* są punktowe mutacje w genie kodującym podjednostkę V 23S rRNA (pozycje nukleotydowe 2074 i 2075). W przeprowadzonych badaniach jedynie w przypadku 2 izolatów *C. coli* zidentyfikowano zmianę A2075G, w dwóch kolejnych A2074C.

Kolejne badania miały na celu wyjaśnienie genetycznego podłoża oporności na erytromycynę szczepów *Campylobacter*. Po zbadaniu wrażliwości na erytromycynę 211 izolatów, do dalszych badań wybrano 10 opornych szczepów *C. coli* oraz (jako kontrolę) 5 szczepów fenotypowo wrażliwych na erytromycynę. Oznaczenie wrażliwości metodą gradientowo-dyfuzyjną z zastosowaniem E-testu wykazało, że izolaty, które zostały zaklasyfikowane na podstawie badania metodą dyfuzyjną jako odporne, charakteryzują się wysoką opornością na erytromycynę (MIC \geq 256 μ g/ml). W przypadku pozostałych szczepów wartości MIC wahały się od 0,5 do 4 μ g/ml). Ponadto, 8 z 10 opornych na erytromycynę izolatów było również opornych na ciprofloksacynę i tetracyklinę, natomiast 2 były odporne na ciprofloksacynę, lecz wrażliwe na tetracyklinę.

Oporność na makrolidy szczepów *Campylobacter* może być spowodowana mutacjami w cząsteczce 23S rRNA. Dlatego też przeprowadzono analizę sekwencji nukleotydowej genu kodującego 23S rRNA, która wykazała obecność dwóch punktowych mutacji w szczepach opornych. W przypadku 8 izolatów zidentyfikowano tranzycję A \rightarrow G w pozycji 2075, a w 2 izolatach w pozycji 2074. W każdym izolacie zmutowane były wszystkie trzy kopie genu 23S rRNA. Poza wyżej opisaną mutacją, w szczepach opornych modyfikacji mogą ulegać również białka rybosomalne L4 i L22, wchodzące w skład podjednostki 50S rybosomu. Analiza sekwencji genu *rplD* analizowanych szczepów, kodującego białko L4, nie wykazała jednak żadnych zmian w porównaniu z sekwencją *rplD* wzorcowego szczepu wrażliwego *C. coli* JV20 (GeneBank NZ_AEER01000024). W przypadku jednego szczepu wrażliwego zidentyfikowano substytucję Val121Ala. Natomiast zidentyfikowano punktowe zmiany w genie *rplV* kodującym białko L22, skutkujące następującymi substytucjami aminokwasów: Ala103Val (3 izolaty), Thr109Ala (4 izolaty), Val129Ala (2 izolaty). Co ciekawe, substytucje Ala103Val i Thr109Ala zidentyfikowano również w jednym z badanych szczepów, który był wrażliwy na erytromycynę.

Jednym z mechanizmów oporności *Campylobacter* spp. na różne substancje przeciwbakteryjne jest ich aktywne usuwanie z komórki przy pomocy systemu białek CmeABC (ang. *Campylobacter multidrug efflux*) (Lin i wsp., 2002). Wiadomo, że mutacje w genie *cmeR*, kodującym represor transkrypcji operonu *cmeABC*, lub w regionie międzygenowym, zlokalizowanym od 50 do 35 nukleotydów powyżej genu *cmeA* (konsensus sekwencji: TGTAATAAATATTACA), prowadzą do nadekspresji genów operonu *cmeABC* (Lin i wsp., 2005). Aby sprawdzić, czy system CmeABC współuczestniczy w determinowaniu oporności na erytromycynę, w badanych izolatach przeanalizowano sekwencje genu *cmeR* i regionu międzygenowego. Jedynie w przypadku izolatu 149/06 stwierdzono delecję jednego nukleotydu – adeninowego, pierwotnie rozdzielającego odwrócone powtórzenia sekwencji (patrz podkreślenia w przedstawionym wyżej konsensusie sekwencji międzygenowej). Przeprowadzona w ostatnim etapie badań "makrorestrykcyjna" analiza DNA (metoda PFGE) wykazała, że dwa szczepy odporne są pochodzenia klonalnego. Szczepy te zostały wyizolowane w różnym czasie w 2009 r., z surowców pochodzących od jednego producenta. Dwa inne izolaty należące do drugiej grupy klonalnej zostały wyizolowane z surowców pochodzących od różnych producentów.

Główne osiągnięcie poznawcze

- Stwierdzenie wysokiej częstości występowania oporności na fluorochinolony (ciprofloksacynę) i tetracykliny (tetracyklinę) wśród szczepów *C. coli* i *C. jejuni* izolowanych z mięsa i podrobów kurcząt znajdujących się w sprzedaży.
- Wykazanie, że wysoki poziom oporności na erytromycynę szczepów *C. coli* spowodowany jest tranzycją (A→G; pozycje 2075 i 2074) we wszystkich kopiach genu 23S rRNA bakterii opornych.
- Wykazanie, że mutacje w rybosomowych białkach L4 i L22 nie wpływają na fenotyp oporności.
- Wskazanie na możliwość rozprzestrzeniania się szczepów opornych pochodzenia klonalnego.

B. Długoterminowe monitorowanie stopnia zanieczyszczenia bakteriami *Campylobacter* spp. surowców spożywczych pochodzenia zwierzęcego

Publikacja:

Korsak D., E. Maćkiw, E. Rożynek, M. Żyłowska. **2015.** Prevalence of *Campylobacter* spp. in retail chicken, turkey, pork, and beef meat in Poland between 2009 and 2013. *Journal of Food Protection*, 78: 1024–1028

Badania, których celem jest oszacowanie częstości występowania bakterii patogennych na każdym etapie produkcji żywności, począwszy od pozyskania surowca, przez produkcję, magazynowanie i dystrybucję aż do konsumpcji, są istotne nie tylko z poznawczego punktu widzenia. Dostarczają one także cennych informacji, które są wykorzystywane do przeprowadzenia mikrobiologicznej oceny ryzyka, która obejmuje (i) identyfikację realnego zagrożenia wywołanego przez drobnoustroje oraz jego wpływ na konsumenta, (ii) badanie wpływu zanieczyszczenia surowca oraz sposobu przetwarzania na poziom zagrożenia, oraz (iii) informowanie konsumenta o poziomie zagrożenia.

Od 2009 r. uczestniczę w opracowywaniu, dla Głównego Inspektoratu Sanitarnego, rocznych planów pobierania próbek do badania żywności w ramach urzędowej kontroli i monitoringu żywności, w zakresie zanieczyszczeń mikrobiologicznych termotolerancyjnymi bakteriami z rodzaju *Campylobacter*. Celem badań monitoringowych, które prowadzone były w latach 2009-2013 na terenie kraju we współpracy z wojewódzkimi stacjami sanitarno-epidemiologicznymi, było oszacowanie stopnia zanieczyszczenia bakteriami *Campylobacter* spp. surowców pochodzenia zwierzęcego (takich jak, mięso drobiowe, mięso wołowe i wieprzowe), znajdujących się obrotie detalicznym, a więc bezpośrednio dostępnych dla konsumenta. Badaniami objęto łącznie 1700 próbek świeżego mięsa, które pobrano ze sklepów małych i wielkopowierzchniowych. Bakterie izolowano zgodnie ze standardową procedurą badawczą opisaną w normie PN-EN ISO 10272-1:2007/Ap1:2008P. Przynależność do określonego gatunku potwierdzano metodą PCR stosując specyficzne startery (On i Jordan, 2003). Obecność *Campylobacter* spp. stwierdzono łącznie w 690 z 1400 (49,3%) próbek mięsa drobiowego. Bakterie wyizolowano, odpowiednio, z 50,2% i 41,1% próbek mięsa z kurczaków i z indyka, oraz z 50,1% i 42,6% próbek podrobów z kurczaka i z indyka.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w częstości występowania bakterii w różnych kategoriach badanego mięsa z kurczaków i mięsa z indyka. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że zarówno świeże mięso, jak i podroby drobiowe, są w wysokim stopniu zanieczyszczone bakteriami *Campylobacter* spp. Przeprowadzone

badania wykazały ponadto, że stopień zanieczyszczenia mięsa wołowego i wieprzowego jest stosunkowo wysoki, bowiem wynosi, odpowiednio, 10,1% i 10,6%. Analiza pozycji taksonomicznej badanych szczepów pokazała, że *C. jejuni* był najczęściej izolowanym gatunkiem z mięsa z kurczaków (46,6%), wieprzowiny (68,6%) i wołowiny (66,7%), natomiast *C. coli* z mięsa z indyków (71,2%).

Główne osiągnięcia poznawcze

- Przeprowadzenie pierwszych tak kompleksowych badań dotyczących częstości występowania *Campylobacter* spp. w różnych surowcach pochodzenia zwierzęcego, dostępnych w obrocie detalicznym.
- Wykazanie, że stopień skażenia mikrobiologicznego różnych kategorii mięsa drobiowego jest wysoki, co powoduje, że surowce takie potencjalnie mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumenta.
- Wykazanie, że mięso wołowe i wieprzowe jest również zanieczyszczone *Campylobacter* spp. i surowce takie potencjalnie również mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumenta.

C. Analiza fenotypów oporności na antybiotyki i inne związki antybakteryjne szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z żywności oraz zakładów przetwórstwa spożywczego

Publikacja:

Korsak D., A. Borek, S. Daniluk, A. Grabowska, K. Pappelbaum. **2012.** Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 158: 203–208

Badanie lekooporności różnych gatunków należących do rodzaju *Listeria* prowadzone są na świecie od wielu lat. Pierwszy oporny szczep *L. monocytogenes* został wyizolowany w 1988 r. Szczep ten był oporny na tetracyklinę, w stężeniu $> 10 \mu\text{g/ml}$ (Poyart-Salmeron i wsp., 1990). W tym samym roku, we Francji, od 84-letniego pacjenta chorego na zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu wyizolowano pierwszy szczep oporny na kilka antybiotyków (chloramfenikol, erytromycynę, streptomycynę, tetracyklinę i monocyklinę) (Poyart-Salmeron i wsp., 1990). Od tego czasu pojawiają się informacje o szczepach *L. monocytogenes* i *Listeria* spp. opornych na jeden lub większą liczbę antybiotyków, pochodzących z materiału klinicznego, środowiska naturalnego, żywności oraz środowiska zakładów przemysłowych (Olaimat i wsp., 2018).

W ramach badań, które prowadziłam, dokonano identyfikacji i charakterystyki puli szczepów *L. monocytogenes*. Próbkę do badań na obecność bakterii z rodzaju *Listeria* pobierano (i) na etapie obrotu detalicznego, zarówno ze sklepów wielkopowierzchniowych, jak i sklepów małych, oraz (ii) na etapie produkcji, z różnych zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego i rybnego, w okresie 2004-2010, na obszarze centralnej i północno-wschodniej Polski.

Bakterie izolowano zgodnie ze standardową procedurą opisaną w normie PN-EN ISO 11290-1:1999/Ap1:2005. Przynależność do rodzaju *Listeria* i gatunku *L. monocytogenes* potwierdzano metodą PCR, stosując specyficzne startery (Huang i wsp., 2007). Zgromadzono kolekcję liczącą 471 szczepów *L. monocytogenes*. Dwieście szczepów wyizolowano ze świeżych i wędzonych ryb, 144 ze świeżych i mrożonych warzyw, 43 z żywności gotowej do spożycia (RTE, ang. *ready-to eat*) (produkty garmazeryjne, np.

wędliny, kiełbasy), 13 z produktów nabiałowych, 16 z surowego mięsa, 15 z wyrobów cukierniczych i 40 z linii produkcyjnej.

W pierwszym etapie badań wszystkie szczepy scharakteryzowano pod względem (i) przynależności do określonej grupy serotypowej (testy molekularne), zgodnie z procedurą opisaną przez Doumith i wsp. (2004), oraz (ii) wrażliwości na 13 antybiotyków/chemioterapeutyków stosowanych w medycynie (w leczeniu listeriozy), weterynarii i hodowli (metoda podwójnych rozcieńczeń w podłożu płynnym lub metoda gradientowo-dyfuzyjna z zastosowaniem E-testu). Określono również związek pomiędzy przynależnością szczepów do danej grupy serotypowej, a jedną z trzech linii filogenetycznych *L. monocytogenes* (Ward i wsp., 2004). Wykazano, że zdecydowana większość szczepów (256; 54,4 %) należy do serogrupy I, obejmującej serotypy 1/2a i 3a. Drugą licznie reprezentowaną serogrupą była serogrupa II, obejmująca serotypy 1/2c i 3c – zaliczono do niej 120 szczepów (25,5%). Pięćdziesiąt dziewięć szczepów (12,5%) należało do serogrupy III (serotypy 1/2b, 3b i 7), a jedynie 36 (7,6%) do serogrupy IV (serotypy 4b, 4d i 4e). Analizując związek pomiędzy grupą serotypową a linią filogenetyczną wykazano, że dominowały szczepy należące do linii filogenetycznej II (serotypy 1/2a, 1/2c, 3a i 3c) (79,8%; 376/471), podczas gdy pozostałe szczepy (20,2%; 95/471) należały do linii I (4b, 1/2b, 4e, 4d). Żaden szczep nie został zaliczony do linii III (4a, 4c, 4b).

Fenotypowe badanie wrażliwości pokazało, że wszystkie szczepy były wrażliwe na 9 z 13 badanych związków. Jedynie dwa szczepy były odporne: (i) szczep 371/05, wyizolowany w 2005 z mrożonego zielonego groszku – odporny na antybiotyki z grupy tetracyklin: tetracyklinę i minocyklinę, oraz (ii) szczep 44/04, wyizolowany w 2004 z linii produkcyjnej zakładu przetwórstwa owocowo-warzywnego, odporny na chemioterapeutyki z grupy fluorochinolonów (ciprofloksacynę i norfloksacynę). Wykazano, więc że częstość występowania oporności wśród szczepów *L. monocytogenes* jest bardzo niska.

W kolejnym etapie pracy podjęto badania, których celem było określenie genetycznego podłoża oporności obu ww. szczepów. Do tej pory w szczepach z rodzaju *Listeria* zidentyfikowano pięć determinantów oporności na tetracykliny: *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(S)* i *tet(T)*. Ostatnie trzy z wymienionych kodują specyficzne białka cytoplazmatyczne chroniące rybosom przed działaniem antybiotyku, natomiast geny *tet(L)* i *tet(K)* kodują białka błony zewnętrznej, które na drodze aktywnego transportu usuwają antybiotyk z komórki (Bertrand i wsp., 2005). Oporność związana z genem *tet(M)* jest najczęściej spotykaną opornością na tetracyklinę i minocyklinę wśród bakterii gramododatnich z rodzaju *Enterococcus*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*, lecz występuje też w niektórych patogennych bakteriach gramujemnych (Roberts i wsp., 1986). Wykazano, że gen *tet(M)* może być związany z dużymi koniugacyjnymi elementami integrującymi z DNA (ICE, ang. *integrative and conjugative elements*) o szerokim zakresie gospodarzy, np. Tn916 czy Tn1545 (Bertrand i wsp., 2005; Granier i wsp., 2011; Li i wsp., 2007; Morvan i wsp., 2010; Poyart-Salmeron i wsp., 1992; Yan i wsp., 2010). Przeprowadzone badania pokazały, że oporność na tetracykliny szczepu 371/05 związana jest z obecnością genu *tet(M)*, który nie jest usytuowany w obrębie ICE.

U bakterii gramododatnich znane są dwa mechanizmy chromosomowej oporności na fluorochinolony. Pierwszy z nich związany jest z występowaniem punktowych mutacji w tzw. obszarze warunkującym oporność na chinolony (ang. *QRDRs*) – w genach *gyrA* i *gyrB* kodujących podjednostki topoizomerazy II (gyrazy) i/lub w genach *parC* i *parE*, kodujących podjednostki topoizomerazy IV (za główny cel działania tych chemioterapeutyków uważa się topoizomerazę IV). Drugi mechanizm oporności polega na aktywnym usuwaniu fluorochinolonów z wnętrza komórki do środowiska zewnętrznego w wyniku działania białek o aktywności pomp (Fábrega i wsp., 2009; van Hoekle i wsp.,

2011). W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że oporność na fluorochinolony szczepu 44/04 nie jest spowodowana punktowymi mutacjami w genach kodujących poszczególne podjednostki obu enzymów, a jej przyczyną jest nadekspresja chromosomowego genu *lde*, kodującego białko pompy.

Główne osiągnięcia poznawcze

- Utworzenie reprezentatywnej kolekcji szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z różnych rodzajów środków spożywczych i środowiska zakładów przetwórstwa żywności.
- Wykazanie, że oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki stosowane w leczeniu listeriozy oraz w weterynarii i hodowli, wśród szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z takich środowisk w Polsce, występuje z bardzo niską częstością – 0,42%.
- Wykazanie, że ponad połowa szczepów należy do I grupy serotypowej, która obejmuje serotyp 1/2a – bakterie o tym serotypie są najczęściej izolowane z żywności.
- Wykazanie, że oporność na tetracykliny związana jest z obecnością genu *tet(M)*, który nie jest sprzężony z elementem ICE.
- Wykazanie, że oporność na hydrofilowe fluorochinolony wynika z nadekspresji genu *lde* kodującego białko pompy.

D. Określenie molekularnych podstaw oporności szczepów *L. monocytogenes* na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki

Publikacje:

Korsak D., A. Krawczyk-Balska. 2016. Rifampicin and rifabutin resistant *Listeria monocytogenes* strains isolated from food products carry mutations in *rpoB* gene. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13: 363–368

Korsak D., A. Krawczyk-Balska. 2017. Identification of the molecular mechanism of trimethoprim resistance in *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14: 696–700

W trakcie badań, których wyniki zostały przedstawione w publikacji pt “Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland” (Korsak i wsp., 2012), określano m.in. wrażliwość szczepów *L. monocytogenes* na różne antybiotyki i chemioterapeutyki, w tym ryfampicynę, antybiotyk z grupy ryfamycyn. Uzyskane wartości minimalnego stężenia hamującego (ang. *minimal inhibitory concentration*, MIC) ryfampicyny, wyznaczone metodą E-test, mieściły się w zakresie 0,04-0,25 µg/ml, co pozwoliło zaklasyfikować wszystkie badane szczepy do kategorii wrażliwych na ten antybiotyk. Jednak w przypadku 15 szczepów, w obrębie strefy zahamowania wzrostu wokół paska testowego obserwowano pojedyncze kolonie, co wskazywało na fenotyp oporności. Wszystkie kolonie zostały poddane dalszym analizom, których wyniki zostały zaprezentowane w pracy Korsak i Krawczyk-Balska (2016).

Ryfampicyna, podobnie jak wszystkie ryfamycyny, jest inhibitorem syntezy RNA. Na poziomie molekularnym, lek wiąże się swoim pierścieniem makrocyklicznym z podjednostką β DNA-zależnej polimerazy RNA (RNAP, ang. *DNA-dependent RNA polymerase*), hamując jej aktywność transkrypcyjną. Wraz z blokadą transkrypcji dochodzi do zahamowania syntezy białek (Campbell i wsp., 2001). Oporność na ryfamycyny jest głównie spowodowana zmianami w obrębie genu *rpoB*, kodującego podjednostkę β polimerazy RNA. Spontaniczne mutacje w genie *rpoB* to głównie pojedyncze punktowe

substytucje, rzadziej delecje i insercje. 95% mutacji lokuje się w czterech regionach w pobliżu N-końca podjednostki β polimerazy, zaangażowanej bezpośrednio w wiązanie ryfampicyny (Floss i Yu, 2005; Goldstein, 2014). U *Escherichia coli* mutacje najczęściej pojawiają się w regionie I (aminokwasy 505-537), II (aminokwasy 562-575) i III (aminokwasy 684-690) oraz rejonie N-terminalnym białka (Campbell i wsp. 2001). Opisano również inne mechanizmy oporności, lecz występują one bardzo rzadko (Goldstein, 2014).

Ryfampicyna charakteryzuje się szerokim spektrum działania antybakteryjnego przeciwko bakteriom gramdodatnim oraz, w mniejszym stopniu, gramujemnym (Floss i Yu, 2005). Mimo, iż antybiotyk ten wykazuje wysoką aktywność *in vitro* wobec *L. monocytogenes*, jego zastosowanie w leczeniu zakażeń spowodowanych przez ten patogen budzi kontrowersje. Sugeruje się jednak, że przynajmniej w przypadku pacjentów o obniżonej odporności układu immunologicznego, zastosowanie jej w terapii skojarzonej z ampicyliną mogłoby zminimalizować ryzyko niepowodzenia terapeutycznego (Barocci i wsp., 2015).

Badania rozpoczęłam od wstępnej charakterystyki wyselekcjonowanych izolatów, która obejmowała zbadanie ich wrażliwości na ryfampicynę i ryfabutyne, drugi antybiotyk z grupy ansamycyn. Wyznaczone metodą podwójnych rozcieńczeń antybiotyku w podłożu płynnym wartości MIC mieściły się w granicach 1 to >256 $\mu\text{g/ml}$ dla ryfampicyny i 0,5-128 $\mu\text{g/ml}$ dla ryfabutyiny. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dziewięć izolatów charakteryzuje się jednoczesnym wysokim poziomem oporności na oba testowane antybiotyki, a pozostałe 6 niskim. Przeprowadzona, w następnym etapie badań, analiza sekwencji genów *rpoB* (zamplifikowanych w reakcji PCR) opornych izolatów pozwoliła zidentyfikować 10 punktowych mutacji, które skutkowały substytucjami aminokwasów. Dziewięć z tych substytucji (Ser466Pro, Gln470Lys Asp473Asn, Gly479Asp, His483Tyr/Arg/Asp, Arg486His i Leu490Pro) zlokalizowanych było w regionie odpowiadającym regionowi I polimerazy RNA *E. coli*, natomiast jedna zmiana (Pro521Leu) w regionie II. Wykazano, że tylko substytucje w pozycjach 470, 479, 483 i 486 białka skutkują wysokim poziomem oporności. W przypadku innych gatunków bakterii, zmiany w pozycjach odpowiadających zmianom u *L. monocytogenes* również skutkują wysokim poziomem oporności. Natomiast zmiany w pozycjach 473, 490 i 521, których efektem jest niska oporność mutantów *L. monocytogenes*, w przypadku innych gatunków bakterii powodują oporność na wysokim poziomie.

Z danych opublikowanych w literaturze wiadomo, że mutacje w genie *rpoB* mogą zmieniać wrażliwość bakterii na antybiotyki z innych niż ansamycyny grup terapeutycznych. I tak np. zmiany w niektórych pozycjach *rpoB* skutkują: (i) zmniejszoną wrażliwością szczepów *Staphylococcus aureus* na wankomycynę (Watanabe i wsp., 2010), (ii) zmniejszoną wrażliwością *Brucella abortus* na trimetoprim/sulfametoksazol (Sandalakis i wsp., 2012), (iii) zmniejszoną wrażliwością *Mycobacterium tuberculosis* na ofloksacynę (Louwe i wsp., 2011) czy (iv) zwiększoną opornością enterokoków na niektóre cefalosporyny (Kristich i Little, 2012). Jednak przeprowadzone przeze mnie badania nie wykazały wpływu mutacji w genie *rpoB* na zmianę wrażliwości szczepów *L. monocytogenes*.

Mutacje w genach metabolizmu podstawowego, które prowadzą do pojawienia się fenotypu oporności, mogą jednocześnie negatywnie wpływać na przebieg niektórych procesów metabolicznych, co objawia się np. obniżeniem tempa wzrostu szczepów opornych, zmniejszeniem efektywności wirulencji itp. W celu określenia jaki wpływ na kondycję szczepów opornych na ryfampicynę mają poszczególne mutacje w genie *rpoB*, przeprowadzono tzw. *pairwise competition assay*, zgodnie z procedurą opisaną przez

Cohan i wsp. (1994). Wykazano, że jedynie mutacje prowadzące do zmiany Gln470Lys i Gly479Asp nie miały wpływu na kondycję mutantów. Pozostałe substytucje w różnym stopniu wpływały na obniżenie "kondycji" szczepów opornych, co nie było związane z poziomem oporności na ryfampicynę, do której prowadziła określona zmiana. Podobne wyniki otrzymano badając wpływ mutacji w genach *rpoB* na "kondycję" takich bakterii jak *Bacillus subtilis* (Cohan i wsp., 1994), *E. coli* (Reynolds, 2000) czy *S. aureus* (Wichelhaus i wsp., 2002). Jednak w przypadku takich bakterii jak *Enterococcus faecium* pokazano, że większy wpływ na obniżenie kondycji szczepów opornych miały zmiany, które warunkowały wyższy poziom oporności (Enne i wsp., 2004).

Zakażenia wywołane przez *L. monocytogenes* zazwyczaj wymagają leczenia środkami przeciwbakteryjnymi. Alternatywą dla standardowej terapii, którą jest połączenie antybiotyków z grupy β -laktamów (głównie penicyliny lub ampicyliny) z aminoglikozydami (np. gentamicyną), jest zastosowanie tzw. kotrimoksazolu, w skład którego wchodzi dwa chemioterapeutyki – trimetoprim i sulfametoksazol (Hof, 2004). Kotrimoksazol, w monoterapii lub łącznie z innymi antybiotykami, stosowany jest głównie w przypadku pacjentów, u których stwierdzono nietolerancje na β -laktamy lub w przypadku niepowodzenia terapeutycznego po zastosowaniu standardowej procedury leczenia (Fernandez-Sabe i wsp., 2009; Grant i wsp., 2010; Günther i Philipson, 1982; Merle-Melet i wsp., 1996; Spitzer i wsp., 1986; Winslow i Pankey, 1982).

Kolejny cel badawczy, który postawiłam przed sobą, polegał na zbadaniu częstości pojawiania się oporności *L. monocytogenes* na trimetoprim, a następnie wyjaśnieniu molekularnego podłoża oporności.

Mechanizm działania trimetoprimu polega na blokowaniu jednego z etapów syntezy kwasu foliowego. Jednym z kluczowych enzymów w szlaku tetrahydrofoliowym jest reduktaza dihydrofolianowa (ang. *dihydrofolate reductase*, DHFR). DHFR katalizuje redukcję 7,8-dihydrofolianu do 5,6,7,8-tetrahydrofolianu zależną od NADPH. Ze względu na analogię strukturalną z dihydrofolianem, trimetoprim u bakterii jest konkurencyjnym inhibitorem tego enzymu (Huovinen i wsp., 1995). Zapobiega on konwersji kwasu dihydrofoliowego do tetrahydrofoliowego, powodując wyczerpanie tego ostatniego. Niedobór folianów prowadzi do śmierci bakterii.

W pierwszym etapie prowadzonych przeze mnie badań, stosując procedurę polegającą na posiewie szczepu referencyjnego *L. monocytogenes* ATCC 13932 na podłoże uzupełnione trimetoprimem w stężeniu 10 razy wartość MIC dla tego szczepu, otrzymałam 64 kolonie odporne na ten chemioterapeutyk. Mutanty odporne pojawiły się z częstotliwością $6,85 \pm 0,92 \times 10^{-8}$ na komórkę. Wyznaczone wartości MIC trimetoprimu dla wszystkich analizowanych izolatów pokazały, że są od 32 do 64-razy mniej wrażliwe na trimetoprim w porównaniu ze szczepem referencyjnym (wartości MIC mieściły się w granicach od 2 do 8 $\mu\text{g/ml}$). Na podstawie otrzymanych wyników badania fenotypowego wszystkie izolaty zakwalifikowano do kategorii niskoopornych na trimetoprim. Z danych literaturowych wiadomo, że jednym z mechanizmów oporności na trimetoprim są zmiany w sekwencji aminokwasowej reduktazy dihydrofolianowej, które skutkują obniżeniem powinowactwa enzymu do trimetoprimu. Dlatego też w kolejnym etapie badań postanowiłam sprawdzić czy oporność jest wynikiem zmian w genie *dhfr* i/lub w obrębie promotora tego genu.

Przeprowadzona *in silico* analiza genomu modelowego szczepu *L. monocytogenes* EGD-e (GeneBank AL591824) pozwoliła zidentyfikować gen *lmo1873*, który koduje potencjalną reduktazę dihydrofolianową, a także promotor operonu 333, w skład którego wchodzi ten gen. Gen *lmo1873* i promotor tego genu, wszystkich mutantów i szczepu wzorcowego, został zamplifikowany (PCR), a następnie zsekwencjonowany. Analiza porównawcza sekwencji izolatów opornych z sekwencją szczepu referencyjnego

wrażliwego na trimetoprim wykazała, że wszystkie zmiany zaszły w obrębie genu *lmo1873* i miały one charakter transwersji lub tranzycji. Zmiany te skutkowały substytucjami aminokwasów w białku Lmo1873. Zidentyfikowano zarówno pojedyncze (61 szczepów), jak i podwójne (3 szczepy) podstawienia aminokwasowe. Najczęściej występująca pojedyncza zmiana miała miejsce w pozycji 46 sekwencji aminokwasowej sekwencji białka Lmo1873. Transwersja cytozyny na adeninę (ACC→AAC) w sekwencji nukleotydowej skutkowałą podstawieniem treoniny na asparaginę (33 z 61 izolatów). Kolejna zmiana, którą zidentyfikowano w przypadku 21 izolatów, polegała na substytucji metioniny na walinę w pozycji 20. Cztery izolaty miały substytucje w pozycji 21 (prolina na leucynę), natomiast trzy w pozycji 95, gdzie leucyna zastąpiła walinę. W przypadku trzech szczepów stwierdzono substytucje dwóch aminokwasów. Co ciekawe, jedną z tych zmian była zamiana Thr46Asn, a więc zmiana, która była najczęściej identyfikowana w przypadku izolatów mających pojedyncze zmiany w sekwencji aminokwasowej. Dwa z trzech izolatów dodatkowo miały zmianę Met20Ile, a jeden Leu85Phe. Wykazano również, że dodatkowe zmiany nie zwiększały wrażliwości mutantów w porównaniu ze szczepami niosącymi tylko substytucje Thr46Asn.

W celu potwierdzenia, że gen *lmo1873* koduje reduktazę dihydrofolianową, a oporność na trimetoprim izolatów *L. monocytogenes* jest wynikiem punktowych zmian w genie *lmo1873*, skonstruowałam wektory ekspresyjne, które umożliwiły uzyskanie ekspresji wszystkich zmienionych wariantów genów *lmo1873* w heterologicznym gospodarzu – *E. coli*. Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że szczepy *E. coli* niosące zmienione warianty genu *lmo1873* charakteryzują się obniżoną wrażliwością na trimetoprim, w porównaniu ze szczepem *E. coli* niosącym "dziką" kopię genu *lmo1873*.

Główne osiągnięcia poznawcze

- Wykazanie, że punktowe mutacje w genie *rpoB* determinują oporność na ansamycyny w spontanicznych mutantach *L. monocytogenes*.
- Identyfikacja nieopisanych wcześniej u *L. monocytogenes* punktowych mutacji w genie *rpoB*, w wyniku których dochodzi do substytucji: Ser466Pro, Gln470Lys, Arg486His, Leu490Pro i Pro521Leu.
- Wykazanie, że w przypadku innych gatunków bakterii, zmiany w pozycjach odpowiadających substytucjom w pozycji 473, 490 i 521 *L. monocytogenes* dają odmienny efekt fenotypowy.
- Wykazanie, że zmiany w genie *rpoB* nie wpływają na fenotyp wrażliwości szczepów mutantów na antybiotyki i chemioterapeutyki z innych niż ansamycyny grup terapeutycznych.
- Wykazanie, że gen *lmo1873* *L. monocytogenes* koduje reduktazę dihydrofolianową.
- Wykazanie, że punktowe mutacje w genie *lmo1873* determinują niski poziom oporności *L. monocytogenes* na trimetoprim.
- Wykazanie, że spontaniczne mutanty *L. monocytogenes* odporne na trimetoprim pojawiają się z częstością 10^{-8} .
- Wykazanie, że zmiana kodonu ACC w sekwencji genu *lmo1873*, kodującego treoninę w pozycji 46 białka, dominuje wśród szczepów opornych i determinuje oporność na wysokie stężenia trimetoprimu.
- Identyfikacja nieopisanej wcześniej u innych gatunków bakterii punktowej mutacji w genie kodującym reduktazę dihydrofolianową, w wyniku których dochodzi do substytucji Thr46Asn.

E. Detekcja i charakterystyka determinantów oporności sprzężonych z mobilnym DNA niepatogennych szczepów *Listeria* spp., izolowanych z zakładów przetwórstwa spożywczego

Publikacje:

Korsak D., M. Szuplewska. **2016.** Characterization of nonpathogenic *Listeria* species isolated from food and food processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 238: 274–280

Korsak D., C. Chmielowska, M. Szuplewska, D. Bartosik. **2019.** Prevalence of plasmid-borne benzalkonium chloride resistance cassette *bcrABC* and cadmium resistance *cadA* genes in nonpathogenic *Listeria* spp. isolated from food and food-processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 290: 247–253

Kolejne badania miały na celu analizę występowania fenotypów oporności wśród niepatogennych gatunków *Listeria* spp. Badania te rozpoczęłam od zgromadzenia puli szczepów, w tym 75 *L. innocua*, 49 *L. welshimeri*, 2 *L. seeligeri* i 1 *L. grayi*. Wszystkie te szczepy zostały następnie scharakteryzowane pod względem wrażliwości na (i) osiem antybiotyków i chemioterapeutyków, (ii) chlorek benzalkoniowy (BC) – środek dezynfekcyjny należący do czwartorzędowych soli amoniowych stosowany w przetwórstwie spożywczym, (iii) jony metali takich jak kadm (Cd) i arsen (As). Przeprowadzona została również analiza częstości występowania pozachromosomowych elementów genetycznych – plazmidów, mogących przenosić determinanty oporności w wyniku HGT.

Wykazano, że dwa analizowane szczepy *L. innocua* były odporne na tetracyklinę i minocyklinę. Dowiedziono, że oporność na te związki spowodowana była obecnością w chromosomie obu szczepów pojedynczych kopii genu *tet(M)*, który nie był sprzężony z ICE z rodziny Tn916-Tn1545. Znacznie wyższą częstość występowania oporności wśród badanych szczepów stwierdzono w przypadku chlorku benzalkoniowego oraz kadm, odpowiednio, 18,11% i 55,91%. Natomiast wszystkie izolaty były wrażliwe na arsen. Zaobserwowano pewną korelację – wszystkie szczepy odporne na BC były jednocześnie odporne na Cd. Jednak z drugiej strony, aż 67,61% izolatów opornych na Cd była wrażliwa na BC. Analiza profili replikonów pozachromosomowych wykazała obecność plazmidów, w zakresie wielkości 50-90 kpz, w 61 izolatach. Na podstawie wyników analizy restrykcyjnej (RFLP) plazmidy te pogrupowano, wyróżniając 12 profili. Co ciekawe, plazmidy o tym samym profilu występowały w izolatach danego gatunku. Wyjątek stanowiły plazmidy zakwalifikowane do typu I, występujące w 6 szczepach *L. innocua* oraz w 1 szczepie *L. welshimeri*, co może wskazywać na możliwość koniugacyjnego transferu tego replikonu. Wykazano, że istnieje korelacja między opornością na BC a obecnością plazmidów – wszystkie odporne izolaty niosły plazmidy. Zaobserwowano również związek między opornością na Cd i obecnością plazmidów w szczepach *L. innocua* i *L. seeligeri*. Natomiast w przypadku *L. welshimeri*, 23,08% szczepów opornych nie zawierało plazmidu, co sugerowało, że determinanty oporności zlokalizowane są w chromosomach tych szczepów (Korsak i Szuplewska, 2016).

Głównym naturalnym źródłem metali ciężkich w środowisku jest erozja skał i aktywność wulkaniczna, jednak najwięcej ich dociera w wyniku działalności człowieka, tj. z przemysłu wydobywczego, hutnictwa, rolnictwa, odpadów komunalnych. Metale ciężkie uruchomione z minerałów drogą naturalną lub antropogeniczną trafiają do łańcucha troficznego i oddziałują na organizmy, w tym bakterie. Wzrost i rozwój mikroorganizmów w środowisku zanieczyszczonym metalami ciężkimi jest możliwy dzięki wykształceniu

różnych mechanizmów oporności. Z kolei czwartorzędowe sole amoniowe, dzięki swym właściwościom bakteriobójczym i grzybobójczy, już od lat 30 XX wieku są stosowane na szeroką skalę, jako środki dezynfekcyjne. Związki te odgrywają kluczową rolę w kontrolowaniu rozprzestrzeniania się patogenów w środowisku szpitalnym, w środowisku przetwórstwa żywności, a także w gospodarstwach domowych. Jednak ich długotrwałe stosowanie spowodowało powstanie oporności wśród szczepów bakteryjnych, jak również grzybów (Gerba, 2015).

Chociaż dość dużo wiadomo na temat podłoża genetycznego oporności na chlorek benzalkoniowy i kadm w szczepach *L. monocytogenes*, brak jest takich danych dla szczepów niepatogennych z tego rodzaju taksonomicznego. Rozpoczęłam zatem badania oporności na BC i Cd w puli niepatogennych *Listeria* spp. Postawiłam sobie kilka celów: (i) zidentyfikowanie determinantów oporności na BC i Cd, (ii) określenie ich lokalizacji w genomach szczepów opornych oraz (iii) zbadanie możliwości ich transferu do *L. monocytogenes*. Badaniami objęto 67 izolatów fenotypowo opornych na Cd, w tym 22 opornych także na BC.

Główna strategia oporności *L. monocytogenes* na czwartorzędowe sole amoniowe, w tym BC polega na usuwaniu tych związków z komórek na drodze aktywnego transportu przy udziale specyficznych białek błonowych tzw. pomp. Do tej pory, w opornych szczepach *L. monocytogenes* zidentyfikowano, zarówno w chromosomie jak i ruchomych elementach genetycznych, kilka genów kodujących tego typu białka: (i) *qacH* w transpozonie Tn6188, usytuowanym w chromosomie (Müller i wsp., 2013; Müller i wsp., 2014), (ii) *qacA* i *qacEAI-sul* (Xu i wsp., 2014), (iii) *emrE* zlokalizowany w obrębie wyspy genomowej LGII szczepu *L. monocytogenes* odpowiedzialnego za epidemię listeriozy w Kanadzie w 2008 r. (Kovacevic i wsp., 2016), (iv) *mdrL* zlokalizowany w chromosomie (Mereghetti i wsp., 2000; Romanova i wsp., 2002; Romanova i wsp., 2006), (v) *emrC* zlokalizowany w plazmidzie pLMST6 (Kremer i wsp., 2017), (vi) kasetę *bcrABC*, w skład której wchodzi trzy geny, a która pierwotnie została zidentyfikowana w transpozonie znajdującym się w plazmidzie pLM80 (Dutta i wsp., 2013; Elhanafi i wsp., 2010). Kasetę *bcrABC* zidentyfikowano również w chromosomach szczepów *L. monocytogenes* (Dutta i wsp., 2013).

Również oporność na Cd związana jest z aktywnym transportem. W szczepach *L. monocytogenes* zidentyfikowano cztery różne determinanty: (i) *cadA1* związany z transpozonom Tn5422 znajdującym w plazmidach (Lebrun i wsp., 1994a; Lebrun i wsp., 1994b), (ii) *cadA2* zlokalizowany w dużych plazmidach, np. pLM80 niosącym również kasetę *bcrABC* (Kuenne i wsp., 2010; Mullapudi i wsp., 2008; Nelson i wsp., 2004), (iii) *cadA3*, związany z elementami ICE *L. monocytogenes* EGDe (Glaser i wsp., 2001) oraz (iv) *cadA4* zidentyfikowany w chromosomie szczepu *L. monocytogenes* Scott A (Briers i wsp., 2011).

W celu określenia genetycznego podłoża oporności na BC i Cd wszystkie szczepy zostały przebadane pod kątem obecności kasety *bcrABC* i genów *cadA* (*cadA1*-*cadA4*). Przeprowadzona analiza pokazała, że 95,5% (21 z 22) szczepów fenotypowo opornych na BC posiadało kasetę *bcrABC*. Szczepy te miały również gen *cadA1* (7 izolatów) lub *cadA2* (14 izolatów). Obecność genów oporności była skorelowana z plazmidami I lub III profilu restrykcyjnego. W jednym szczepie fenotypowo opornym na BC i Cd, *L. innocua* 27/06, nie stwierdzono obecności kasety *bcrABC*, jednak szczep ten zawierał gen *cadA1*. Z kolei izolaty fenotypowo odporne na Cd i wrażliwe na BC, miały tylko jeden wariant genu *cadA* – *cadA1*. Wyjątek stanowiło 15 izolatów *L. innocua*, w tym 12 bezplazmidowych i 3 mające plazmidy o tym samym profilu restrykcyjnym. W szczepach tych nie zidentyfikowano żadnego wariantu *cadA*, co może sugerować, że oporność na Cd ma inne niż poznane do tej pory dla *L. monocytogenes* podłoża genetyczne. Przeprowadzona

hybrydyzacja DNA-DNA pokazała, że wszystkie zidentyfikowane geny, *bcrABC*, *cadA1* i *cadA2*, zlokalizowane są w plazmidach reprezentujących wszystkie wyznaczone profile restrykcyjne.

W kolejnych eksperymentach sprawdzono, czy plazmidy reprezentujące poszczególne profile restrykcyjne są zdolne do transferu koniugacyjnego do komórek *L. monocytogenes*. Okazało się, że tylko jeden plazmid, który nazwano pLIS1 (niosący geny *bcrABC* i *cadA2*, profil III), pochodzący ze szczepu 40/70 *L. welshimeri*, jest przenoszony z wysoką częstością do *L. monocytogenes* 10403S. Do transferu nie był zdolny żaden plazmid niosący gen *cadA1*. Może to świadczyć o tym, że plazmidy niosące ten gen nie są koniugacyjne. Nie można jednak wykluczyć, że te replikony mogą wymagać jak dotąd nie zidentyfikowanych czynników lub warunków, które umożliwią skuteczny transfer.

Analiza pełnej sekwencji nukleotydowej plazmidu pLIS1 wykazała, że ma on wielkość 81588 pz. Plazmid ten oprócz genów zaangażowanych replikację, stabilizację i transfer, zawiera również geny nadających fenotypy oporności na BC i Cd. Analiza porównawcza sekwencji pLIS1 z sekwencjami innych plazmidów *Listeria* spp. zdeponowanymi w bazach danych wykazała, że jest on blisko spokrewniony z plazmidami typu pLM80, pochodzącymi ze szczepów *L. monocytogenes*. Wysoki poziom identyczności sekwencji tych replikonów, występujących w szczepach izolowanych z różnych środowisk sugeruje, że ich rozprzestrzenienie jest wynikiem silnej presji selekcyjnej. Co ciekawe, wspólną cechą pLIS1 i plazmidów pokrewnych, oprócz obecności genów oporności, jest obecność licznych elementów transpozycyjnych (TE). Wydaje się więc, że TE odgrywają ważną rolę w zarówno promowaniu rearanzacji plazmidów bakterii z rodzaju *Listeria* spp., jak i nabywaniu determinantów oporności.

Główne osiągnięcia poznawcze

- Wykazanie, że oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki wśród niepatogennych szczepów *Listeria* występuje z bardzo niską częstością – 1,57%.
- Wykazanie, że gen *tet(M)*, występujący w pojedynczej kopii w chromosomie szczepów opornych na tetracykliny, nie jest związany z ICE, co ogranicza jego transfer do innych gatunków *Listeria* spp.
- Wykazanie, po raz pierwszy, istnienia korelacji pomiędzy opornością na BC, Cd i obecnością plazmidów w niepatogennych szczepach *Listeria* spp.
- Wykazanie, po raz pierwszy, że oporność na Cd niepatogennych szczepów *Listeria* spp. związana jest z obecnością genów *cadA1* i *cadA2*.
- Wykazanie, po raz pierwszy, że oporność na chlorek benzalkoniowy niepatogennych szczepów *Listeria* spp. związana jest z obecnością kasety *bcrABC*.
- Identyfikacja i kompleksowa analiza genomowa nieopisanego wcześniej plazmidu *L. welshimeri*.
- Wykazanie, że pLIS1 jest plazmidem koniugacyjnym.

PODSUMOWANIE

Przedstawione w niniejszym wniosku prace, w których opisano rozpowszechnienie oporności na różne środki przeciwbakteryjne wśród bakterii z rodzajów *Campylobacter* i *Listeria*, izolowanych z żywności i środowiska związanego z produkcją żywności, oraz molekularne podłoże tego zjawiska, obejmowały badania z zakresu mikrobiologii, mikrobiologii żywności i genetyki bakterii. Badania te umożliwiły poznanie mechanizmów umożliwiających przystosowanie się tych bakterii do przeżycia w środowisku, w którym istnieje silna presja selekcyjna.

Przeprowadzone badania pokazały, że mięso i podroby drobiowe znajdujące się w sprzedaży, a więc bezpośrednio dostępne dla konsumenta, są źródłem termotolerancyjnych szczepów *Campylobacter* spp., opornych na antybiotyki i chemioterapeutyki stosowane w leczeniu zakażeń u ludzi. Niepokojące jest także to, że wiele analizowanych szczepów było opornych na więcej niż jeden lek przeciwbakteryjny. Natomiast w przypadku bakterii z rodzaju *Listeria*, zarówno *L. monocytogenes*, jak i gatunków niepatogennych, oporność na leki przeciwbakteryjne była na bardzo niskim poziomie. Po raz pierwszy wykazano jednak, że obecność w środowisku antybiotyków z grupy rifamycyn czy trimetoprimu, tj. leków przeciwbakteryjnych, które mogą być stosowane w terapii listeriozy, prowadzi do selekcji szczepów *L. monocytogenes* opornych na te związki, a mechanizm oporności związany jest punktowymi mutacjami w genach, których produkty są celem działania tych substancji.

Dzięki nabywaniu oporności, bakterie są w stanie przeżyć w środowisku naturalnym, w obecności np. toksycznych jonów metali, czy też w środowisku przetwórstwa żywności, w którym stosowane są różne środki dezynfekcyjne. Badania nad rozpowszechnieniem oporności na jony metali i środki dezynfekcyjne koncentrowały się do tej pory głównie na jednym gatunku – *L. monocytogenes*. W prowadzonych badaniach wykazano po raz pierwszy, że oporność na metale toksyczne np. kadm czy środki dezynfekcyjne np. chlorek benzalkoniowy występuje wśród niepatogennych szczepów *Listeria* z wysoką częstością, oraz to, że oporności te mogą być skorelowane, co oznacza, że pojedynczy czynnik selekcyjny może prowadzić do selekcji szczepów o fenotypach wieloopornych. Pokazano również, że usytuowanie determinantów oporności w ruchomych elementach genetycznych – plazmidach – umożliwi ich przeniesienie drogą horyzontalnego transferu do *L. monocytogenes*. Tak więc niepatogenne gatunki z rodzaju *Listeria* mogą stanowić rezerwar genów o charakterze adaptacyjnym, w tym genów oporności na środki przeciwbakteryjne. Należy również podkreślić, że pLIS1, pierwszy plazmid scharakteryzowany w szczepie z gatunku *L. welshimeri*, wykazuje wysokie podobieństwo do grupy plazmidów typu pLM80 pochodzących ze szczepów *L. monocytogenes*. Wysoki poziom konserwatywności sekwencji tych replikonów, występujących w różnych gospodarzach izolowanych z różnych środowisk sugeruje, że mogą one być utrzymywane w komórkach dzięki działaniu silnej presji selekcyjnej.

Realizacja niniejszego osiągnięcia była możliwa dzięki wykorzystaniu zarówno klasycznych, jak i nowoczesnych metod badawczych z zakresu fizjologii bakterii, biologii molekularnej i bioinformatyki. Realizacja części badań była możliwa dzięki realizacji własnego projektu badawczego, finansowanego przez MNiSW (projekt zakończony w NCN).

PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach planuję kontynuować badania, które dotyczą identyfikacji ruchomych elementów genetycznych *Listeria* spp. Badania te dostarczą informacji na temat struktury plazmidów, a także pozwolą określić rolę tych replikonów w determinowaniu specyficznych właściwości poszczególnych szczepów oraz oszacowaniu wpływu przenoszonego przez nie egzogenne DNA na ukształtowanie struktury genomów *Listeria* spp.

Chciałabym również rozpocząć nowe projekty naukowe.

Przeprowadzone przeze mnie analizy *in silico* sekwencji genomu *L. monocytogenes* EGD-e pozwoliły zidentyfikować kilkanaście genów potencjalnie kodujących białka błonowe, które na drodze aktywnego transportu mogą uczestniczyć w transporcie na zewnątrz komórki różnych związków, w tym związków o działaniu przeciwbakteryjnym.

Celem planowanych badań będzie więc wyjaśnienie roli białek transportowych w powstawaniu tolerancji lub oporności *L. monocytogenes* na różne związki o działaniu przeciwbakteryjnym, a także określenie ich funkcji w procesie tworzenia biofilmów oraz utrzymywaniu homeostazy komórkowej.

W trakcie prowadzonych przeze mnie badań zgromadziłam także kolekcję szczepów *Cronobacter* spp., oportunistycznych bakterii patogennych, izolowanych z żywności oraz ze środowiska naturalnego. Planuję przeprowadzenie charakterystyki fenotypowej i genetycznej tych szczepów, mającej na celu m.in. oszacowanie roli mobilomu w determinowaniu cech fenotypowych i patogennych właściwości tych bakterii.

BIBLIOGRAFIA

1. Acar J. F., G. Moulin. 2006. Antimicrobial resistance at farm level. *Scientific and Technical Review*, 25:775–792
2. Acheson D., B.M. Allos. 2001. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32:1201–1206
3. Alekshun M.N., S.B. Levy. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128:1037–1050
4. Altekruze S.F., L.K. Tollefson. 2003. Human campylobacteriosis: a challenge for the veterinary profession. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223:445–452
5. Barocci S., A. Mancini, B. Canovari, E. Petrelli, E. Sbriscia-Fioretti, A. Licci, S. D'Addesa, G. Petrini, M. Giacomini, A. Renzi, A. Migali, S. Briscolini. 2015. *Listeria monocytogenes* meningitis in an immunocompromised patient. *New Microbiologica*, 38:113–118
6. Bertrand S., G. Huys, M. Yde, K. D'Haene, F. Tardy, M. Vrints, J. Swing, J.-M. Collard. 2005. Detection and characterization of *tet(M)* in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. *Journal of Medical Microbiology*, 54:1151–1156
7. Blaser B., J. Engberg. 2008. In: Nachamkin I, C.M. Szymanski, M.J. Blaser, editors. *Campylobacter*. p 99–120. ASM Press; Washington DC, USA, 121
8. Briers, Y., Klumpp, J. Schuppler, M., Loessner, M.J. 2011. Genome sequence of *Listeria monocytogenes* Scott A, a clinical isolate from a food-borne listeriosis outbreak. *Journal of Bacteriology*, 193, 4284–4285
9. Campbell E.A., N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, S.A. Darst. 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104:901–912
10. Cohan F.M., E.C. King, P. Zawadzki. 1994. Amelioration of the deleterious effects of an adaptive mutation in *Bacillus subtilis*. *Evolution*, 48:81–95
11. Decyzja Wykonawcza Komisji Europejskiej 2013/652/UE z dnia 12 listopada 2013 r. „w sprawie monitorowania i sprawozdawczości w zakresie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u bakterii zoonotycznych i komensalnych”
12. Doganay M. 2003. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35:173–175
13. Doumith M., C. Buchrieser, G. Philippe, Ch. Jacquet, P. Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:8819–8822
14. Dutta V., D. Elhanafi, S. Kathariou. 2013. Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette *bcrABC* in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79:6067–6074
15. EFSA. 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal*, 16:5182
16. Elhanafi D., V. Dutta, S. Kathariou. 2010. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:8231–8238
17. Enne V.I., A.A. Delsol, J.M. Roe, P.M. Bennett. 2004. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53:203–207
18. Fàbrega A., S. Mandura, E. Giral, J. Villa. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, 2:40–60
19. Fernandez-Sabé N., C. Cervera, F. Lopez-Medrano, M. Llano, E. Sáez, O. Len, J. Fortún, M. Blanes, R. Laporta R., J. Torre-cisneros, J. Gavalda, P. Muñoz, M.C. Fariñas, M.J. Aguado A. Moreno, J. Carratalà. 2009. Risk factors, clinical features, and outcomes of listeriosis in solid-organ transplant recipients: a matched case-control study. *Clinical Infectious Diseases*, 49:1153–1159

20. Floss H.G., Y. Tin-Wein. 2005. Rifamycin – mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical Reviews*, 105:621–635
21. Founou L.L., R.C. Founou, S.Y. Essack. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7:1881
22. Gandhi M., M.L. Chikinda. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Microbiology*, 113:1–15
23. Gerba Ch.P. 2015. Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Applied and Environmental Microbiology*, 81:464–469
24. Glaser P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brand, T. Chakraborty, A. Charnbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, E. Duchaud, L. Durant., O. Dussurget, K.D. Entian, H. Fsihi, F. Garca-del Portillo, P. Garrido. L. Gautier, W. Goebel, N. Gómez-López, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L.M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam J.M. Vicente, E. Ng, H Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.C. Pérez-Diaz, R. Purcell, B. Rimmel M. Rose, T. Schlueter, S. Simoes, A. Tierrez, J.A. Vázquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, P. Cossart. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294:849–852
25. Goldstein, B.P. 2014. Resistance to rifampicin: a review. *Journal of Antibiotics*, 67:625–630
26. Granier S.A., C. Moubareck, C. Colaneri, A. Lemire, S. Roussel, T-T. Dao, P. Courvalin, A. Brisabois. 2011. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:2788–2790
27. Grant M.H., H. Ravreby, H. Lorber. 2010. Cure of *Listeria monocytogenes* meningitis after early transition to oral therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:2276–2277
28. Günther G., A. Philipson. 1988. Oral trimethoprim as follow-up treatment of meningitidis caused by *Listeria monocytogenes*. *Reviews Infectious Diseases*, 10:53–55
29. Hilton A.C., E. Austin. 2000. The kitchen dishcloth as a source of and vehicle for foodborne pathogens in a domestic setting. *International Journal of Environmental Health Research*, 10:257–261
30. Hof H. 2004. An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 5:1727–1735
31. Huang B., S. Eglezos, B.A. Heron, H. Smith, T. Graham, J. Bates, J. Savill, J. 2007. Comparison of multiplex PCR with conventional biochemical methods for the identification of *Listeria* spp. isolates from food and clinical samples in Queensland, Australia. *Journal of Food Protection*, 70:1874–1880
32. Humphrey T., S. O'Brien, M. Madsen. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117:237–257
33. Huovinen P., L. Sundström, G. Sewdberg, O. Sköld, O. 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:279–289
34. Kovacevic J., J. Ziegler, E. Walecka-Zacharska, A. Reimer, D.D. Kitts, M.W. Gilmour. 2016. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82:939–953
35. Kremer P.H.C., J.A. Lees, M.M. Koopmans, B. Ferwerda, A.W.M. Arends, M.M. Feller, K. Schipper, M. Valls Seron, A. van der Ende, M.C. Brouwer, D. van de Beek, S.D. Bentley. 2017. Benzalkonium tolerance genes and outcome in *Listeria monocytogenes* meningitis. *Clinical Microbiology and Infection* 23, 265.e1–265.e7
36. Kristich C.J, J.L Little. 2012. Mutations in the β subunit of RNA polymerase alter intrinsic cephalosporin resistance in *Enterococci*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 55:2022–2027
37. Kuenne C., S. Voget, J. Pischmarov, S. Oehm, A. Goesmann, R. Daniel, T. Hain, T. Chakraborty. 2010. Comparative analysis of plasmids in the genus *Listeria*. *PLoS One*, 5:e12511
38. Lebrun M., A. Audurier, P. Cossart. 1994a. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *Journal of Bacteriology*, 176: 3040–3048
39. Lebrun, M., A. Audurier, P. Cossart. 1994b. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are present on Tn5422, a novel transposon closely related to Tn917. *Journal of Bacteriology*, 176: 3049–3061
40. Leclercq A., A. Moura, G. Vales, N. Tessaud-Rita, C. Aguilhon, M. Leciut. 2019. *Listeria thailandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69:74–81
41. Li Q., J.S. Sherwood, C.M. Logue. 2007. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. *Letters in Applied Microbiology*, 44:86–91
42. Lin J., L.O. Michel, Q Zhang. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46:2124–2131
43. Lin, J. M. Akiba, O. Sahin, Q. Zhang. 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:1067–1075

44. Louw G.E., R.M. Warren, N.C. Gey van Pittius, R. Leon, A. Jimenez, R.H. Pando, C.R. McEvoy, M. Grobbelaar, M. Murray, P.D. van Helden, T.C. Victor. 2011. Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184:269–276
45. Luque-Sastre, L., C. Arroyo, E.M. Fox, B.J. McMahon, L. Bai, F. Li, S. Fanning. 2018. Antimicrobial resistance in *Listeria* species. *Microbiology Spectrum*, 6:4
46. Marshall B.M., S.B. Levy. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Review*, 24:718–733
47. Mead P. S., J. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, R.V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5:607–625
48. Mereghetti L., R. Quentin, N. Marquet-Van der Mee, A. Audurier. 2000. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5083–5086
49. Merle-Melet M., L. Dossou-Gbete, P. Maurer, P. Meyer, A. Lozniewski, O. Kuntzburger, M. Wéber, A. Géberard. 1996. Is amoxicillin–cotrimoxazole the most appropriate antibiotic regimen for listeria meningoenzephalitis? Review of 22 cases and the literature. *Journal of Infection*, 33:79–85
50. Morvan A., C. Moubareck, A. Leclercq, M. Harve-Bazin, S. Bremont, M. Lecuit, P. Courvalin, A. Monniera. 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:2728–2731
51. Mullanpudi S., R.M. Siletzky, S. Kathariou. 2008. Heavy-metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of turkey processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:1464–1468
52. Müller A., K. Rychli, A. Zaiser, C. Wieser, M. Wagner, M., S. Schmitz-Esser. 2014. The *Listeria monocytogenes* transposon Tn6188 provides increased tolerance to various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide. *FEMS Microbiological Letters*, 361:166–173
53. Müller A., K. Rychli, M. Muhterem-Uyar, A. Zaiser, B. Stessl, C.M. Guinane, P.D. Cotter, M. Wagner, S. Schmitz-Esser. 2013. Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS ONE*, 8:e76835
54. Munita J.M., C.A. Arias. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4:10
55. Mylonakis E., M. Paliou, E.L. Hohmann, S.B. Calderwood, E.J. Wing. 2002. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore)*, 81:260–269
56. Nelson K.E., D.E. Fouts, E.F. Mongodin, J. Ravel, R.T. DeBoy, J.F. Kolonay, D.A. Rasko, S.V. Angiuoli, S.R. Gill, I.T. Pulsen, J. Peterson, O. White W.C. Nelson, W. Nierman, M.J. Beanan, L.L.M. Brinkac, S.C. Daugerty, R.J. Dodson, A.S. Durkin, R. Madupu, D.H. Haft, J. Selengut, S. van Aken, H. Khuri, N. Fedorova, H. Forberger, B. Tran, S. Kathariou, L.D. Wonderling, G.A. Uhrlich, D.O. Bayles, J.B. Luchansky, C.M. Fraser. 2004. 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 Research*, 32:2386–2395
57. Olaimat A.N., M.A., Al-Holy, H.M. Shabhz, H.M. Al-Nabulsi, M.N. Abu Ghoush, T.M. Osaili, M.M. Ayyash, R.A. Holley. 2018. Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety*, 17:1277–1292
58. On S.L., P.J. Jordan. 2003. Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:330–336
59. Orsi, R.H., M. Wiedmann. 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100:5273–5287
60. PN-EN ISO 10272-1:2007/Ap1:2008P. Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. - Część 1: Metoda wykrywania.
61. PN-EN ISO 11290-1:1999/Ap1:2005. Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* - Metoda wykrywania obecności.
62. Poropatich K.O., C.L. Walker, R.E. Black. 2010. Quantifying the association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: a systematic review. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 28:545–552
63. Poyart-Salmeron C., C. Carlier, P. Trieu-Cuot, A.L. Courtier, P. Courvalin. 1990. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*, 335:1422–1426
64. Poyart-Salmeron C., P. Trieu-Cuot, C. Carlier, A. MacGorowan, J. McLaughlin, P. Courvalin. 1992. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36:463–466
65. Reynolds M.G. 2000. Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics*, 156:1471–1481

66. Roberts, M. C., Hillre, S. L., Hale, J., Holmes, K. K., Kenny, G. 1986. Tetracycline resistance and *tetM* in pathogenic urogenital bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30:810–812
67. Romanova N.A., P.F. Wolffs, L.Y. Brovko, M.W. Griffiths. 2006. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:3498–3503
68. Romanova N.A., S. Favrin, M. W. Griffiths. 2002. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat-processing industry. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:6405–6409
69. Róžańska H., A. Lewtak-Piłat, J. Osek. 2013. Enterokoki – bakterie o wielu obliczach. *Życie Weterynaryjne* 88:562–564
70. Sandalakis V., A. Psaroulaki, P.J. De Bock, A. Christidou, K. Gevaert, G. Tsiotis, Y.J. Tselentis. 2012. Investigation of rifampicin resistance mechanisms in *Brucella abortus* using MS-driven comparative proteomics. *Journal of Proteome Research*, 11:2374–2385
71. Scallan E., R.M. Hoekstra, F.J. Angulo, R.V. Tauxe, M-A. Widdowson, S.L. Roy, J.L. Jones, P.M. Griffin. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17:7–15
72. Slutsker L., A. Schuchat. 1999. Listeriosis in humans. In: Ryser E.T, E.H. Marth, editors. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; p. 75–95
73. Spitzer P.G., S.M. Hammer, A.W. Karchmer. 1986. Treatment of *Listeria monocytogenes* infection with trimethoprim-sulfamethoxazole: case report and review of the literature. *Reviews Infectious Diseases*, 8:427–430
74. van Hoekl A.H., D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A.P. Robert, H.J.M. Aarts. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 2:203
75. Ward T.J., L. Gorski, M.K. Borucki, R.E. Mandrell, J. Hutchins, K. Pupedis. 2004. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 186:4994–5002
76. Watanabe Y., Cui, Y. Katayama, K. Kozue, K. Hiramatsu. 2011. Impact of *rpoB* mutation on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49:2680–2684
77. WHO, <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
78. WHO, <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/en/>
79. Wichelhaus T.A., V. Schäfer, V. Brade, B. Böddinghaus. 1999. Molecular characterization of *rpoB* mutations conferring cross-resistance to rifamycins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:2813–2816
80. Winslow D.L., G.A. Pankey. 1982. *In vitro* activities of trimethoprim and sulfamethoxazole against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22:51–54
81. Xu D., Y. Li, M.S. Zahid, S. Yamasahi, L. Shi, J.R. Li, H. Yan. 2014. Benzalkonium chloride and heavy-metal tolerance in *Listeria monocytogenes* from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, 190:24–30
82. Yan H., S.B. Neogi, M. Ziyao, W. Guan, Z. Shen, S. Zhang, L. Li, S. Yamasaki, L. Shi, N. Zhong. 2010. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. *International Journal of Food Microbiology*, 144:310–316

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Publikacje:

Korsak D., J. Popowski. 1996. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* with the use polymerase chain reaction. *Acta Microbiologica Polonica*, 45: 305–308

Korsak D., J. Popowski. 1997. *Campylobacter jejuni* in coccoid form does not reverse into spiral form in chicken guts. *Acta Microbiologica Polonica*, 46: 409–412

Popowski J., A. Łękowska-Kochaniak, **D. Korsak. 1997.** The incidence of heat tolerant *Campylobacter* in rivers and lakes of the Warsaw region. *Roczniki PZH*, 48: 253–262

Popowski J., D. Korsak. 2004. *Campylobacter jejuni* coccoid forms and food safety PCR and electron microscope study. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, 31: 295–303

Bakterie należące do rodzaju *Campylobacter* to mikroaerofilne spiralne, ruchliwe pałeczki, które w niesprzyjających warunkach środowiska mogą ulec transformacji z formy spiralnej do formy kokoidalnej. Niektórzy badacze uważają, że formy kokoidalne bakterii *Campylobacter* to komórki żywe, lecz nie hodowalne, tzw. VBNC (ang. *viable but non-culturable*), które w sprzyjających warunkach mogą powrócić do swojej pierwotnej postaci morfologicznej. Inni uważają, że to formy degeneracyjne, które są przejawem śmierci komórki bakteryjnej.

Pracę naukową w Pracowni Mikrobiologii Narodowego Instytutu Żywności i Żywienia rozpoczęłam od badań, które miały na celu wyjaśnienie, czy formy kokoidalne bakterii z rodzaju *Campylobacter* mają charakter degeneracyjny, czy też stanowią rodzaj formy spoczynkowej.

Przeprowadzone badania wykazały, że komórki *C. jejuni* inkubowane w roztworze soli fizjologicznej warunkach tlenowych ulegają transformacji do form kokoidalnych, a im wyższa temperatura inkubacji, tym proces ten przebiega szybciej (95% komórek uległo przekształceniu już po 1 dniu inkubacji w temp. 37 °C, natomiast po 19 dniach inkubacji w temp. 4 °C). Wraz ze wzrostem procentowego udziału komórek kokoidalnych w populacji i wydłużeniem czasu inkubacji, obserwowano stopniowy spadek oznaczalności bakterii metodą PCR, co było prawdopodobnie wynikiem degradacji DNA. Uzyskane wyniki pokazały, że formy kokoidalne zachowują swoją integralność przez krótki czas. Wraz z jego upływem ulegają stopniowej degradacji (Korsak i Popowski, 1996; Popowski i Korsak, 2004). Badania na zwierzętach (dwudniowe kurczaki) pokazały również, że formy kokoidalne nie są w stanie ulec rewersji do żywej formy spiralnej (Korsak i Popowski, 1997). Wyniki tych badań pozwoliły wnioskować, że kokoidalne formy *Campylobacter* stanowią fazę przejściową w trakcie zamierania populacji i nie spełniają też kryteriów pozwalających zaliczyć je tzw. form VBNC.

Równolegle uczestniczyłam w badaniach, których celem było poszerzenie informacji dotyczących występowania termotolerancyjnych bakterii z rodzaju *Campylobacter* w różnego rodzaju wodach powierzchniowych (rzeki i wody stojące) oraz na powierzchni różnych obiektów znajdujących się na dnie tych zbiorników. Wyniki pokazały, że około 70% próbek wody było zanieczyszczonych *Campylobacter*, podczas gdy zanieczyszczenie podwodnych obiektów utrzymywało się na znacznie niższym poziomie i wynosiło 33%. Dominującym gatunkiem był *C. jejuni*. W wodzie stwierdzono również obecność takich gatunków jak *C. coli* i *C. lari* podczas gdy na powierzchni obiektów tylko *C. coli*. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że głównym źródłem zanieczyszczenia wód są ścieki gospodarcze i komunalne, a w mniejszym stopniu odchody dzikich ptaków. Badanie obecności *Campylobacter* w próbkach wody w lepszym stopniu oddawało rzeczywisty stopień zanieczyszczenia danego zbiornika tą bakterią niż badanie obiektów stałych w wodzie (Popowski i wsp., 1997).

Przedstawione badania finansowane były z grantu KBN nr 4 S40401707.

Publikacja:

Pawelec D., D. Korsak, A. Wszyńska, E. Rozynek, J. Popowski, E. K. Jagusztyn-Krynicka. 2000. Genetic diversity of the *Campylobacter* genes coding immunodominant proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 185: 43–49

Kolejne badania, w których brałam udział dotyczyły zbadania zróżnicowania wybranych genów bakterii *Campylobacter*. Punktem wyjścia było zidentyfikowanie w szczepie *C. jejuni* 72Dz/92 Lior 71 trzech genów [*cjaA* (*ompH1*), *cjaC* (*hisJ*) i *cjaD* (*omp18*)], które, jak wynikało z danych literaturowych, kodują białka o silnych właściwościach immunogennych. Białka te to potencjalni kandydaci na szczepionkę anty-*Campylobacter*. Stosując metodę hybrydyzacji i western-blot potwierdzono obecność białek CjaA, CjaC i CjaD we wszystkich 30 badanych klinicznych szczepach *Campylobacter*. Jednak stosując metodę PCR, w której wykorzystywano różne pary starterów geny zidentyfikowano je jedynie w 10 spośród analizowanych szczepach. Przeprowadzone *in silico* analizy wykazały różnice w sekwencji nukleotydowej w poszczególnych genach między różnymi szczepami.

W przypadku *cjaC* zmiany obejmowały głównie region 5' genu, natomiast w przypadku dwóch pozostałych genów polimorfizm dotyczył całych genów. Większość obserwowanych podstawień nukleotydów wystąpiła w pozycji trzeciej kodonu, a więc były to mutacje ciche.

Przeprowadzone badania pokazały, że pomimo tego, że geny *cjaA*, *cjaC* i *cjaD* wykazują polimorfizm sekwencji nukleotydowej, kodują one białka o właściwościach immunogennych.

Publikacja:

Korsak D., K. Dzierżanowska-Fangrat, J. Popowski, E. Rozynek. **2004.** Występowanie markerów zjadliwości *iam* w szczepach *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* izolowanych z tusz drobiowych. Roczniki PZH, 55: 307–312

Punktem wyjścia badań opisanych w ww. pracy były doniesienia dotyczące korelacji pomiędzy sekwencją DNA zwaną *iam* (ang. *invasion associated marker*), zidentyfikowaną w genomach niektórych szczepów *C. jejuni* i *C. coli*, a inwazyjnością szczepów niosących ten marker. Zaobserwowano wcześniej korelację między obecnością tej sekwencji w *Campylobacter* spp. a stanami biegunkowymi wywoływanymi przez te bakterie. Głównym celem badań było określenie częstości występowania markera *iam* w szczepach *Campylobacter* izolowanych z tuszek drobiowych. Z kloaki kurcząt wyizolowano 70 szczepów termotolerancyjnych bakterii *Campylobacter*, w tym 48 szczepów *C. jejuni* i 22 *C. coli*. Wykazano, że marker *iam* obecny jest w genomach wszystkich szczepów *C. coli* i 69% szczepów *C. jejuni*. Uzyskane wyniki potwierdziły podejrzenia, że drób stanowi bardzo istotny potencjalny rezerwuuar inwazyjnych i patogennych dla człowieka szczepów *Campylobacter*.

Publikacja:

Korsak D., M. Siwińska, J. Zawadzka, Z. Markiewicz. **2002.** The penicillin-binding proteins of *Listeria monocytogenes* - a re-evaluation. Acta Microbiologica Polonica, 51: 5–12

Równoległe do badań realizowanych w Samodzielnej Pracowni Mikrobiologii Instytutu Żywności i Żywienia rozpoczęłam badania w grupie pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Markiewicza w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej Instytutu Mikrobiologii Wydziału Biologii UW. Badania te dotyczyły charakterystyki grupy białek zdolnych do wiązania penicyliny i innych antybiotyków β -laktamowych, które nazwano białkami wiążącymi penicylinę (PBP, ang. *penicillin binding proteins*). Enzymy te, zlokalizowane w

błonie cytoplazmatycznej wszystkich bakterii syntetyzujących peptydoglikan, katalizują ostatnie etapy biosyntezy tego polimeru. Badania rozpoczęłam od wstępnej charakterystyki białek PBP *L. monocytogenes* EGD. W pierwszym etapie badań przeprowadziłam identyfikację tych białek, która polegała na badaniu kompleksów utworzonych z białek (izolowanych z błony cytoplazmatycznej) oraz wyznakowanej radioaktywnie penicyliny benzylowej. Analizując wzór białek izolowanych z komórek *L. monocytogenes* EGD, otrzymany po rozdziale w żelu SDS-PAGE i przeprowadzonej fluorografii, zidentyfikowano pięć prążków, które odpowiadały poszczególnym białkom PBP związanym z radioaktywnym antybiotykiem. Określona została, w pojedynczej rosnącej komórce szczepu EGD *L. monocytogenes*, zarówno łączna liczba cząsteczek PBP, jak i liczba poszczególnych PBP. Wyznaczono również przybliżone masy poszczególnych PBP *L. monocytogenes* EGD, które wahały się od 95 kDa dla PBP1 do 48 kDa dla PBP5. Badania te dały początek badaniom, których celem było określenie funkcji, jakie w komórce *L. monocytogenes* pełni/pełnią drobnocząsteczkowe białka PBP. Badania te weszły w skład mojej rozprawy doktorskiej.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Publikacje:

Korsak D., W. Vollmer, Z. Markiewicz. 2005a. *Listeria monocytogenes* EGD lacking penicillin-binding protein 5 (PBP5) producer a thicker cell wall. *FEMS Microbiology Letters*, 251: 281–288

Korsak D., M. Popowska, Z. Markiewicz. 2005b. Analysis of the murein of a *Listeria monocytogenes* EGD mutant lacking functional penicillin binding protein 5 (PBP5). *Polish Journal of Microbiology*, 54: 339–342

Korsak D., Z. Markiewicz, G.O. Gutkind, J.A. Ayala. 2010. Identification of the full set of *Listeria monocytogenes* penicillin-binding proteins and characterization of PBP2 (Lmo2812). *BMC Microbiology*, 10: 239

Białka należące do klasy wysokocząsteczkowych PBP są głównymi enzymami odpowiedzialnymi za syntezę peptydoglikanu. Dzięki aktywności transglikozyazy i/lub transpeptydazy, katalizują zarówno reakcję włączania prekursora do istniejącej mureiny (powodując tym samym wydłużanie łańcucha cukrowego), jak i wytwarzanie wiązań peptydowych. Enzymy te odgrywają więc kluczową rolę we wzroście komórki bakteryjnej, determinowaniu jej prawidłowego kształtu, a także w formowaniu septy i przebiegu procesu podziału komórkowego. Białka zaliczane do klasy niskocząsteczkowych PBP nie uczestniczą w syntezie peptydoglikanu, ale modyfikują go. Usuwają one ostatnią cząsteczkę D-alaniny z pentapeptydu prekursora (DD-karboksypeptydazy) lub hydrolizują istniejące w peptydoglikanie wiązania poprzeczne, łączące boczne peptydy sąsiednich łańcuchów cukrowych (DD-endopeptydazy). Decydują tym samym o stopniu usieciowania mureiny. Uważa się, że białka te pełnią istotną rolę w determinowaniu kształtu komórki bakteryjnej.

Analiza *in silico* sekwencji genomu *L. monocytogenes* EGD-e (GeneBank: AL591824) pozwoliła zidentyfikować gen *lmo2574*, który wykazywał wysokie podobieństwo do genów kodujących niskocząsteczkowe PBP innych gatunków bakterii.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że gen *lmo2574* koduje niskocząsteczkowe białko PBP5. Białko to specyficznie rozpoznaje wiązanie peptydowe pomiędzy dwiema

cząsteczkami D-alaniny w reszcie D-alanylo-D-alaninowej jednego z syntetyzowanych w cytoplazmie prekursorów mureiny, UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. PBP5 jest więc enzymem o aktywności DD-karboksypeptydazy. Wykazano również, że enzym nie posiada aktywności DD-endopeptydazy ponieważ nie rozpoznaje wiązania D-alanina-D-A₂pm w poprzecznych mostkach peptydowych, łączących sąsiednie łańcuchy cukrowe peptydoglikanu. Białko to charakteryzowało się wysoką aktywnością wobec muropeptydów a stosunkowo niską wobec, nie trawionej muramidazą, mureiny *E. coli*. Tak więc substratami *in vivo* dla tego białka są niskocząsteczkowe fragmenty mureiny, a więc muropeptydy o strukturze monomerów, które powstają w trakcie obrotu metabolicznego peptydoglikanu (tzn. w trakcie zachodzących równolegle procesów jego syntezy i degradacji). Badania pokazały, że białko wykazuje aktywność katalityczną w szerokim zakresie pH, osiągając maksymalną aktywność przy pH 4,5 a w obecności penicyliny (będącej strukturalnym analogiem D-alanylo-D-alaniny) pentapeptyd prekursora mureiny nie ulega hydrolizie do tetrapeptydu, co jest spowodowane zahamowaniem aktywności enzymu wskutek utworzenia stosunkowo trwałego (w środowisku wodnym) kompleksu między penicyliną, a białkiem PBP5. W obecności penicyliny białko traci zatem aktywność DD-karboksypeptydazy (Korsak i wsp., 2005a).

W celu wyjaśnienia roli, jaką pełni w komórce *L. monocytogenes* PBP5 skonstruowano mutanta insercyjnego w genie *lmo2754*. Analiza funkcjonalna wykazała, że DD-karboksypeptydaza kodowana przez gen *lmo2754* nie jest niezbędna do wzrostu i przeżycia *L. monocytogenes* w warunkach laboratoryjnych. Jednak brak tego białka wydłuża czas generacji szczepu mutanta i zwiększa liczbę warstw peptydoglikanu (Korsak i wsp., 2005a). Zmiany w profilu muropeptydowym polegające na drastycznym obniżeniu, w mureinie mutanta, ilości muropeptydów, zawierających łańcuchy peptydowe, składające się z trzech aminokwasów oraz pojawienie się muropeptydów, zarówno w postaci monomerów, jak i oligomerów, które podstawione są łańcuchami pentapeptydowymi świadczy o tym, że PBP5 odgrywa podstawową rolę w modyfikowaniu peptydoglikanu ściany komórkowej (Korsak i wsp., 2005b).

Badania dotyczące aktywności enzymatycznej białka PBP5 realizowane były podczas pobytu na stażu naukowym w laboratorium prof. Joachima-Volkera Höltje w Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie w Tybindze. Natomiast badania dotyczące roli białka PBP5 w modyfikowaniu peptydoglikanu (analiza profili muropeptydowych) finansowane były z grantu uniwersyteckiego 2003/2004 r., którego byłam kierownikiem. Przedstawione wyniki badań weszły w skład rozprawy doktorskiej i zostały opublikowane po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora.

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam moje zainteresowania białkami PBP *L. monocytogenes* EGD. W kolejnych przeprowadzonych badaniach stosując różne znakowane fluorescencyjne pochodne antybiotyków β -laktamowych (Bocillin-FL, Bocillin-650 oraz Ampicillin-Alexa430) wykazano, że 9 spośród 10 zidentyfikowanych w genomie *L. monocytogenes* EGD-e genów potencjalnie kodujących białka PBP rzeczywiście koduje białka należące do tej rodziny. Osiem z tych białek zidentyfikowano traktując ekstrakt białek izolowanych z komórek *L. monocytogenes* znakowanymi antybiotykami β -laktamowymi, natomiast dziewiąte białko, Lmo2812 (PBPD2), po uzyskaniu jego nadekspresji w komórkach *E. coli*, a następnie oczyszczeniu metodą chromatografii. Niemożność wizualizacji tego białka w ekstrakcie białkowym mogła być spowodowana niskim poziomem ekspresji genu kodującego to białko. W toku badań wykazano, że gen *lmo2812* koduje niskocząsteczkowe białko Lmo2812 o aktywności DD-karboksypeptydazy. Białko to specyficznie rozpoznawało wiązanie peptydowe pomiędzy dwiema cząsteczkami D-alaniny w reszcie D-alanylo-D-alaninowej syntetycznego substratu – tripeptydu: N α N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala oraz w naturalnym

monomerycznym pentapeptydzie - NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala). Białko wykazywało aktywność katalityczną w szerokim zakresie pH, osiągając maksymalną aktywność przy pH 7.0. Lmo2812 nie wykazywało natomiast aktywności wobec nietrawionego peptydoglikanu *E. coli* ani wobec naturalnego dimerycznego muropeptydu (NAcGlc-NAcMur-tetrapeptyd-NAcGlc-NAcMur-pentapeptyd). Badania te jednoznacznie pokazały, że substratami dla Lmo2812, podobnie jak dla PBP5, są niskocząsteczkowe fragmenty peptydoglikanu, więc białko to również bierze udział w jego metabolizmie. W celu wyjaśnienia roli, jaką w naturalnych procesach fizjologicznych oraz w warunkach presji antybiotykowej pełni Lmo2812 skonstruowano zmutowane szczepy, z delecją w genie *lmo2812* oraz w genach *lmo2812* i *lmo2754*. Przeprowadzona charakterystyka fizjologiczna pokazała, że mutanty te charakteryzują się wolniejszym tempem wzrostu w porównaniu ze szczepem dzikim oraz zmienioną morfologią komórek (największe zmiany morfologii obserwowano w przypadku mutantu $\Delta lmo2812\Delta lmo2754$ rosnącego w temperaturze 42 °C). Co ciekawe, nie obserwowano żadnych zmian morfologii komórek w mutancie pozbawionym tylko białka PBP5 (Korsak i wsp., 2005a). Analiza profilu muropeptydowego mutantu $\Delta lmo2812$ pokazała, że brak Lmo2812 nie ma wpływu na strukturę peptydoglikanu. Natomiast w przypadku szczepu mutantu pozbawionego obu funkcjonalnych niskocząsteczkowych białek PBP zaobserwowano obniżenie ilości muropeptydów zawierających łańcuchy peptydowe, składających się z trzech aminokwasów, a także zwiększenie ilości muropeptydów podstawionych łańcuchami pentapeptydowymi (Korsak i wsp., 2010). Identyczne zmiany obserwowano w przypadku mutantu w genie *lmo2754* (Korsak i wsp., 2005b).

Badania te realizowane były we współpracy z prof. Gabrielem O Gutkind z Uniwersytetu w Buenos Aires w Argentynie i Juanem A Ayala z Centro De Biología Molecular Severoz Madrytu w Hiszpanii.

Publikacja:

Korsak D., S. Liebscher, W. Vollmer. 2005. Susceptibility to antibiotics and β -lactamase induction in murein hydrolase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 1404–1409

Podczas kolejnego pobytu na stażu naukowym w laboratorium prof. Joachima-Volkera Höltje w Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie w Tybindze zajęłam się zagadnieniami dotyczącymi wyjaśnienia roli, jaką w komórkach *E. coli* pełnią enzymy zaliczane do grupy autolizyn. Autolizyny to enzymy, które biorą udział w modyfikacji i hydrolizie peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii. Wykazano między innymi, że odgrywają one rolę we wzroście peptydoglikanu, rozdzielaniu się komórek potomnych po zakończeniu procesu podziału, w obrocie metabolicznym peptydoglikanu, indukcji syntezy β -laktamaz, formowaniu funkcjonalnej struktury rzęski czy sporulacji i kiełkowaniu.

E. coli posiada aż 12 różnych autolizyn, które można podzielić na trzy klasy: trzy amidazy (AmiA, AmiB i AmiC), które odcinają peptyd od rdzenia cukrowego w peptydoglikanie (rozcinają wiązanie amidowe pomiędzy MurNAc i L-Ala), trzy DD-endopeptydazy PBP 4, PBP 7 oraz MepA), które hydrolizują wiązania poprzeczne między sąsiednimi peptydami w peptydoglikanie i sześć litycznych transglikozyłaz (Slt70, MltA, MltB, MltC, MltD, and EmtA), specyficznych muramidaz, które degradując wiązanie glikozydowe pomiędzy *N*-acetyloglukozaminą i kwasem *N*-acetylmuraminowym w łańcuchu cukrowym jednocześnie katalizują wewnątrzcząsteczkową transglikozylację, z wytworzeniem wiązania 1,6-anhydro w cząsteczce kwasu *N*-acetylmuraminowego.

W trakcie prowadzonych badań przeprowadzona została charakterystyka fizjologiczna mutantów wielokrotnych *E. coli* w genach kodujących hydrolazy peptydoglikanu. Określono m.in. ich wrażliwość na antybiotyki należące do różnych klas i o różnym mechanizmie działania i jednocześnie niskiej aktywności wobec bakterii gramujemnych oraz zbadano ich zdolność do syntezy β -laktamaz. Wykazano, że mutanty pozbawione wszystkich amidaz i jednej litycznej transglikozylazy - Slt70 oraz wszystkich litycznych transglikozylaz charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na bacytracynę, erytomycynę, galiderminę i wankomycynę w porównaniu ze szczepem dzikim. Z kolei mutant pozbawiony amidaz, w przeciwieństwie do szczepu dzikiego, tracił zdolność do przeżycia w obecności galiderminy i wankomycyny. Mutant pozbawiony wszystkich litycznych transglikozylaz nie był zdolny do syntezy indukowalnej obecnością cefoksytyny β -laktamazy, natomiast mutant pozbawiony wszystkich amidaz oraz DD-endopeptydaz β -laktamazę wytwarzał. Dodatkowo mutant pozbawiony litycznych transglikozylaz ulegał lizie w obecności penicyliny. Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazały, że lityczne transglikozylazy są niezbędne *E. coli* do syntezy β -laktamaz.

Wydaje się więc, że związki hamujące aktywność hydrolaz peptydoglikanu mogłyby być stosowane wraz z antybiotykami w terapii skojarzonej zakażeń wywołanych przez bakterie gramujemne. Po pierwsze inhibitory amidaz mogłyby być wykorzystane w celu zwiększenia wrażliwości bakterii gramujemnych na antybiotyki, które nie są wobec nich aktywne. Jednym z istotnych mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe jest zdolność do syntezy β -laktamaz, enzymów inaktywujących cząsteczkę antybiotyku. Zahamowanie aktywności litycznych transglikozylaz mogło by być sposobem na blokowanie indukcji syntezy β -laktamaz przez bakterie gramujemne czego skutkiem byłaby wrażliwość na antybiotyki β -laktamowe.

Publikacje:

Rożynek E., K. Dzierżanowska-Fungrat, P. Józwiak, J. Popowski, **D. Korsak**, D. Dzierżanowska. **2005**. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 615–619

Rożynek E., K. Dzierżanowska-Fangrat, **D. Korsak**, P. Konieczny, S. Wardak, J. Szych, M. Jarosz, D. Dzierżanowska D. **2008**. Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and chicken carcasses in Poland. *Journal of Food Protection*, 71: 602–607

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania nad termotolerancyjnymi gatunkami z rodzaju *Campylobacter*. Celem tych badań była, z jednej strony, charakterystyka potencjału inwazyjnego szczepów *Campylobacter* tj., ocena częstości występowania wybranych markerów zjadliwości odpowiedzialnych za patogenność, a z drugiej strony ocena ich wrażliwości na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki oraz identyfikacja mechanizmów oporności. Badaniami objęto szczepy *Campylobacter* izolowane z różnych źródeł tzn. z materiału klinicznego (wymazy z okolic odbytu od dzieci z biegunką) oraz z surowców zwierzęcych - tuszek drobiowych pochodzących z rzeźni i z handlu detalicznego.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że gen *cadF*, który koduje białko błony zewnętrznej będące adhezyną obecny jest w DNA chromosomowym prawie wszystkich szczepów *Campylobacter*. Z kolei obecność regionu DNA zwanego *iam* stwierdzono w 83,3% szczepach *C. coli* izolowanych od dzieci i w 100% szczepach izolowanych z tuszek.

Istotne różnice zaobserwowano natomiast w przypadku szczepów *C. jejuni* – jedynie w 1,6% szczepów izolowanych od dzieci wykazano obecność tego regionu i aż 54,7% szczepów izolowanych z drobiu. Różnice pomiędzy szczepami izolowanymi z różnych źródeł wykazano również w przypadku genów, *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*, kodujących poszczególne podjednostki cytotoksyny. Wszystkie 3 geny zidentyfikowano prawie we wszystkich szczepach *C. jejuni* niezależnie od źródła izolacji, natomiast w przypadku szczepów *C. coli* w 5,6% pochodzących z materiału klinicznego i aż 87,2% z drobiu. Zaobserwowane różnice w częstości występowania genów *cdtABC* i regionu *iam* między szczepami z różnych źródeł mógł wskazywać na to, że w przypadku tych pacjentów drób nie był jedynym źródłem zakażenia (Rożynek i wsp., 2005).

W kolejnych badaniach przeprowadzono ocenę wrażliwości szczepów *Campylobacter* na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki. Wszystkie szczepy z drobiu i 97,1% szczepów wyizolowanych od dzieci było wrażliwych na makrolidy: erytromycynę i azytomycynę. Natomiast najwięcej szczepów opornych było na fluorochinolony (odpowiednio 63,3% i 50%) ampicylinę (odpowiednio 21% i 13%) i tetracyklinę (odpowiednio 29% i 8%). Mechanizm oporności na tetracykliny wynikał z obecności genu *tet(O)*, na fluorochinolony z mutacji w genie *gyrA*, co prowadziło do zamiany treoniny w pozycji 86 białka na izoleucynę. Natomiast w jedynym szczepie opornym fenotypowo na erytromycynę nie zidentyfikowano mutacji punktowej w pozycji 2074 i/ lub 2075 w genie kodującym 23S rRNA (Rożynek i wsp. 2008).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że chociaż mięso drobiowe nie jest jedynym źródłem zakażeń u ludzi, to jednak może być ono istotnym źródłem opornych szczepów *Campylobacter*.

Przedstawione badania finansowane były z grantów KBN: PB 0371/P05/2002/23 oraz PB 0848/P05/2005/29.

Publikacja:

Rzewuska K., **D. Korsak**, E. Maćkiw. **2010**. Oporność bakterii *Campylobacter* sp. na antybiotyki i chemioterapeutyki. Roczniki PZH, 64: 63–68

W pracy przeglądowej przedstawiono zostały główne mechanizmy oporności bakterii *Campylobacter* na leki przeciwdrobnoustrojowe stosowane w terapii.

Publikacje:

Maćkiw E, K. Rzewuska, K. Stoś, M. Jarosz, **D. Korsak**. **2011**. Occurrence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry products for sale on the polish retail market. Journal of Food Protection, 74: 986–989

Szosland-Fałtyn A., B. Bartodziejska, J. Krolasik, B. Paziak-Domańska, **D. Korsak**, M. Chmiela. **2018**. The prevalence of *Campylobacter* spp. in polish poultry meat. Polish Journal of Microbiology, 67: 117–120

Maćkiw E., M. Modzelewska, Ł. Mąka, H. Ścieżyńska, K. Pawłowska, J. Podstupolski, **D. Korsak**. **2016**. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat products in Poland in 2007-2011. Food Control, 59: 7–11

Uczestniczyłam również w badaniach, których głównym celem było oszacowanie częstości występowania bakterii przenoszonych drogą pokarmową, takich jak

termotolerancyjne gatunki rodzaju *Campylobacter* oraz *L. monocytogenes* w różnych surowcach pochodzenia zwierzęcego oraz w żywności gotowej do spożycia znajdujących się w sprzedaży detalicznej.

Badania monitoringowe, które prowadzone były w latach 2007-2008 we współpracy z wojewódzkimi stacjami sanitarno-epidemiologicznymi pokazały, bardzo wysoką częstość występowania bakterii *Campylobacter* w świeżym, surowym mięsie z kurczaków jak i w podrobach z kurczaków wynoszącą, odpowiednio, 51,7% i 47,3%. Pomimo wysokiej częstości występowania w surowcach, w żywności RTE, takiej jak np. wędzone kurczaki, kurczaki z rożna, wędliny czy pasztety z mięsa kurczaków, obecność bakterii stwierdzono w bardzo niewielkim procencie badanych próbek – 1.2. Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że spożywanie produktów drobiowych gotowych do spożycia nie niesie za sobą niebezpieczeństwa związanego z zatruciami pokarmowymi spowodowanymi przez bakterie *Campylobacter* (Maćkiw i wsp., 2011).

Również wyniki badań z lat 2013-2015 pokazały, że 64% próbek surowego mięsa drobiowego było zanieczyszczonych bakteriami *Campylobacter*. Obecność bakterii stwierdzono w 80% próbek mięsa kaczek, 70% mięsa kurczaków, 64% mięsa gęsi i 38% mięsa indyków. Badania ilościowe pokazały natomiast, że stopień zanieczyszczenia mięsa jest niski – w 68% próbek liczba komórek bakterii nie przekroczyła 10 w 1 gramie. We wszystkich rodzajach mięsa drobiowego dominującym gatunkiem był *C. jejuni* (Szosland-Fałtyń i wsp., 2018). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że świeże mięso drobiowe oraz podroby drobiowe potencjalnie mogą być źródłem zakażenia bakteriami *Campylobacter*.

Z kolei badania, które realizowane były w ramach urzędowej kontroli żywności w latach 2007-2011 w pokazały, że w środkach spożywczych RTE takich jak produkty garmazeryjne (w tym produkty mięsne np. wędliny, kiełbasy) i ciastka *L. monocytogenes* występuje z niewielką częstością. Na 27175 przebadanych próbek ciastek i 20304 próbek produktów garmazeryjnych obecność bakterii stwierdzono odpowiednio w 0,4% i 0,7% próbek. Przeprowadzona charakterystyka fenotypowa 105 szczepów *L. monocytogenes* pokazała, że największa liczba szczepów – 33 (31,4%), należy do grupy molekularnej IVb obejmującej serotypy 4ab-4b, 4d-4e, natomiast jedynie 3 (2,9%) do IIc (serotypy 1/2c-3c). Stwierdzono również, że 10 szczepów jest opornych na ampicylinę, antybiotyk stosowany w terapii listeriozy u ludzi. Szczepy te należały do grup molekularnych IVb i IIa (serotypy 1/2a-3a) obejmujących serotypy, które często są przyczyną listeriozy. Szczepy obecne w żywności RTE, które odporne są na antybiotyki i należą do serotypów często izolowanych od ludzi potencjalnie mogą być przyczyną zatruc pokarmowych i/lub listeriozy i być przyczyną niepowodzeń terapeutycznych. (Maćkiw i wsp., 2016).

Publikacja:

Grabińska-Łoniewska A., G. Wardzyńska, E. Pajor, **D. Korsak**, K. Boruń. 2007. Transmission of specific groups through water distribution system. Polish Journal of Microbiology, 56: 129–138

Kolejne badania, w których brałam udział realizowane były we współpracy z zespołem pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Grabińskiej-Łoniewskiej z Politechniki Warszawskiej, a których celem była ocena jakości wody dopływającej do oczyszczalni ścieków oraz na różnych etapach jej uzdatniania. Badania te obejmowały określenie częstości występowania wybranych grup mikroorganizmów, w tym mikroorganizmów chorobotwórczych i oportunistycznie chorobotwórczych obecnych zarówno w wodzie jak i w biomacie tworzonej przez zagregowane komórki bakterii, grzybów, glonów,

pierwotniaków i wrotków (ZABFAPR, ang. *zoogloea aggregates of bacteria, fungi, algae, protozoa and rotifers*), która zawieszona jest w wodzie, a także biofilmach pokrywających ściany rur. W wyniku tych badań wykazano, że głównym rezerwuarem bakterii (istotnych z punktu widzenia jakości mikrobiologicznej wody wodociągowej) jest biomasa ZABFAPR, a nie woda. Wydaje się więc, że zakres kontrolnych badań mikrobiologicznych wody realizowanych w ramach obowiązujących przepisów prawnych jest niewystarczający i nie pozwala w pełni ocenić stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego systemów dystrybucji wody.

Przedstawione badania finansowane były z grantu KBN 4T09D017/25.

Publikacja:

Krawczyk-Balska A., **D. Korsak**, M. Popowska. **2014**. The surface protein Lmo1941 with LysM domain influences cell wall structure and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to cephalosporins. *FEMS Microbiology Letters*, 357: 175–183

Kolejne badania, w których brałam udział dotyczyły określenia roli, jaką w komórkach *L. monocytogenes* pełni białko Lmo1941. Przeprowadzona *in silico* analiza sekwencji aminokwasowej tego białka pokazała, że w rejonie jego C-końca obecna jest domena LysM, która jest odpowiedzialna za wiązanie białek z peptydoglikanem. Wstępne badania pokazały, że inaktywacja genu *lmo1941* zwiększa dwukrotnie wrażliwość mutanta na cefuroksym, antybiotyk β -laktamowy z grupy cefalosporyn. Ponieważ taki efekt fenotypowy mógł być spowodowany wpływem Lmo1941 na peptydoglikan przeprowadzono analizę profilu muropeptydowego szczepu mutanta. Pomimo tego, że nie stwierdzono żadnych różnic w składzie muropeptydowym w porównaniu z peptydoglikanem szczepu dzikiego, analiza ilościowa pokazała, że w szczepie mutanta ilość dwóch muropeptydów jest o połowę mniejsza. Dalsze badania, z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, pokazały, że w przypadku mutanta gęstość strefy, która uznawana jest za funkcjonalny rejon ściany o wysokim stopniu usieciowania peptydoglikanu, który zawierają liczne białka jest o połowę mniejsza niż w szczepie dzikim. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że białko Lmo1941 wpływa na strukturę ściany komórkowej.

Publikacje:

Witkowska E., **D. Korsak**, A. Kowalska, M. Książopolska-Gocalska, J. Niedziółka-Jönsson, E. Roźniecka, W. Michałowicz, P. Albrycht, M. Podrażka, R. Hołyst, J. Waluk, A. Kamińska. **2017**. Surface-enhanced Raman spectroscopy introduced into the International Standard Organization (ISO) regulations as an alternative method for detection and identification of pathogens in food industry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409: 1555–1567

Witkowska E., **D. Korsak**, A. Janeczek, A. Kowalska, A. Kamińska. **2018**. Strain - level typing and identification of bacteria - novel approach for SERS active plasmonic nanostructures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410:5019–5031

Osobny temat badawczy prowadziłam we współpracy z zespołem dr hab. Agnieszki Kamińskiej z Instytutu Chemii Fizycznej. Tematyka badawcza dotyczyła zastosowania wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii Ramana (e.g. *surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS) do identyfikacji i różnicowania bakterii. Efekt Ramana jest zjawiskiem polegającym na nieelastycznym rozproszeniu fotonów, których źródłem jest

światło laserowe, przez cząsteczki badanej substancji chemicznej. Spektroskopia Ramana daje możliwość otrzymania charakterystycznego dla danego związku chemicznego układu pasm oscylacyjnych na obrazie spektralnym – widmie. To z kolei przekłada się na uzyskanie informacji o strukturze badanego związku.

Przeprowadzone badania pozwoliły opracować metodę szybkiej identyfikacji wybranych patogennych bakterii, które mogą zanieczyszczać żywność, takich jak *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. i *Listeria monocytogenes*. Opracowana procedura oparta została na wstępnym namnażaniu bakterii zgodnie z metodyką opisaną w odpowiednich normach międzynarodowych ISO (PN-EN ISO 6579:2003 - Mikrobiologia żywności i pasz; Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp, 2) PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 – Mikrobiologia żywności i pasz; Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* - część I: Metoda wykrywania obecności oraz 3) PKN-ISO/TS 22964: 2008 - Mleko i przetwory mleczne - Wykrywanie *Enterobacter sakazakii*), a następnie ich identyfikacji i różnicowaniu do rodzaju lub gatunku metodą wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii Ramana. Dzięki połączeniu metody hodowlanych z techniką SERS, możliwe było skrócenie całkowitego czasu wykrywania i identyfikacji bakterii w żywności do zaledwie około 48 godz. z około 7 dni potrzebnych dla obecnie stosowanych metod. Ponadto okazało się, że opracowana procedura gwarantuje powtarzalność uzyskiwanych wyników i pewność rezultatu. Opracowana procedura tzw. wynalazek pt „Sposób wykrywania bakterii *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. oraz *Listeria monocytogenes* w żywności” została zgłoszona do Urzędu Patentowego (zgłoszenie patentowe nr. P.416927).

W kolejnych badaniach zastosowano technikę SERS do różnicowania szczepów w obrębie określonego gatunku bakterii, w tym przypadku *L. monocytogenes*. Wykazano, że zastosowanie tej metody umożliwia rozróżnienie szczepów należących do różnych tzw. genoserogrup tzn. IIa (serotypy 1/2a-3a), IIc (serotypy 1/2c-3c) oraz IVb (serotypy 4ab-4b, 4d-4e). Dodatkowo możliwe było rozróżnienie szczepów należących do określonej genoserogrupy, które charakteryzowały się obecnością lub brakiem w błonie cytoplazmatycznej białek, które na drodze aktywnego transportu (tzw. *efflux pumps*) usuwają z komórki związki toksyczne takie jak chlerek benzalkoniowy (kaseta *bcrABC*) czy kadm (geny *cadA*).

Badania te pokazały, że technika SERS może znaleźć zastosowanie aplikacyjne w różnych obszarach badań mikrobiologicznych.

Publikacja:

Niciński K, E. Witkowska, **D. Korsak**, K. Noworyta, J. Trzcńska-Danielewicz, A. Girstun, A. Kamińska. **2019**. Photovoltaic cells as a highly efficient system for biomedical and electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy analysis. RSC Advances, 9: 576–591

Badania prowadzone były we współpracy z zespołem dr hab. Agnieszki Kamińskiej z Instytutu Chemii Fizycznej. Celem tych badań było opracowanie platformy do badań tj. detekcji i/lub identyfikacji mikroorganizmów, różnicowania komórek nowotworowych oraz do pomiarów spektroelektrochemicznych z wykorzystaniem techniki powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (SERS).

Opracowana platforma bazuje na ogniwie fotowoltaicznym pokrytym warstwą metaliczną. Ogniwa fotowoltaiczne wykonane są krzemu pokrytego cienką warstwą azotku krzemu (warstwa antyrefleksyjna). Na powierzchni azotku krzemu znajdują się kontakty elektryczne (elektroda górna) wykonane z wysoko przewodzącego metalu (np. srebro), które mogą służyć jako miejsca przykładania potencjału elektrycznego w czasie pomiarów spektroelektrochemicznych.

Opracowana platforma charakteryzuje się wysokim współczynnikiem wzmocnienia SERS (10^8), wysoką powtarzalnością (RSD<5%) i stabilnością rejestrowanych sygnałów zarówno dla badanych związków chemicznych jak i mikroorganizmów.

Badania były realizowane w ramach grantu FNP Team-Tech/2017-4/23.

Opracowana platforma została zgłoszona jako wynalazek do Urzędu Patentowego (zgłoszenie patentowe nr. P.426643) pt „Platforma do powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana, sposób przygotowania takiej platformy, sposób oznaczania substancji i/lub mikroorganizmów z wykorzystaniem takiej platformy, zastosowanie takiej platformy do bezpośredniej detekcji i/lub identyfikacji substancji i/lub mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii, z użyciem techniki powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana lub w jej połączeniu z pomiarami elektrochemicznymi”.

6. Dane bibliometryczne.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitantki, zgodnie z rokiem opublikowania – **54,438**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitantki – **813**

Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitantki (wg WoS) – **328**

Indeks Hirscha habilitantki (wg WoS) – **10**

Dorota Korsak