

Załącznik nr 2 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr Sebastian Gnat

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

LUBLIN 2018

1. Imię i Nazwisko:

Sebastian Gnat

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania:

- **Stopień naukowy: doktor nauk biologicznych, specjalność – mikrobiologia**

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z dnia 20 listopada 2013 roku; tytuł rozprawy doktorskiej „Molekularna taksonomia bakteryjnych symbiontów *Astragalus glycyphyllos* [L.] (traganek szerokolistny)” (Promotor: prof. dr hab. Wanda Małek)

- **Tytuł: magister biologii o specjalności mikrobiologia**

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; tytuł pracy magisterskiej „Analiza numeryczna cech fenotypowych i filogeneza genu 16S rRNA rizoibów specyficznych dla *Astragalus glycyphyllos* [L.] (traganek szerokolistny)”; obrona w dniu 20 czerwca 2009 roku (Promotor: prof. dr hab. Wanda Małek)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:

- **Od 2014 roku do dnia dzisiejszego:** Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie; *adiunkt*
- **Od 2012 do 2014 roku:** Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie; *asystent*
- **Od 2009 do 2012 roku:** Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; *starszy referent inżynierjno-techniczny*

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy 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) osiągnięciem naukowym jest tematyczny cykl publikacji objęty tytułem:

Doskonalenie metod diagnostyki dermatofitów zoofilnych w aspekcie molekularnej identyfikacji gatunkowej, typowania epidemiologicznego i oceny stopnia wirulencji

b) publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

1. Ziółkowska G, Nowakiewicz A, **Gnat S**, Trościańczyk A, Zięba P, Majer-Dziedzic B. Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. MYCOSES, 2015; 58 (3): 119-126; doi:10.1111/myc.12284.

IF₂₀₁₅: 2,332; MNiSW₂₀₁₅: 30 pkt.

*Mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji genetycznej części badań, wykonaniu oznaczeń genomowych analizowanych szczepów dermatofitów, analizie i interpretacji wyników badań, a także częściowym opracowaniu manuskryptu. **Mój udział procentowy szacuję na 27%.***

2. **Gnat S**, Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Trościańczyk A, Majer-Dziedzic B, Zięba P. Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 2017; 122: 1368—1379; doi:10.1111/jam.13427.

IF₂₀₁₆: 2,099; MNiSW₂₀₁₆: 30 pkt.

*Mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu metodyki, wykonaniu oznaczeń, analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu do druku (autor korespondencyjny). **Mój udział procentowy szacuję na 90%.***

3. **Gnat S**, Nowakiewicz A, Łagowski D, Trościańczyk A, Zięba P. Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. MEDICAL MYCOLOGY, 2018; 0: 1–10; doi: 10.1093/mmy/myy011.

IF₂₀₁₆: 2,377; MNiSW₂₀₁₆: 30 pkt.

*Mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu szczepów dermatofitów, wykonaniu większości oznaczeń fenotypowych i genomowych, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). **Mój udział procentowy szacuję na 90%.***

- 4. Gnat S, Łagowski D, Nowakiewicz A, Trościańczyk A, Zięba P.** Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. MYCOSES, 2018; doi: 10.1111/myc.12791.

IF₂₀₁₆: 2,252; MNiSW₂₀₁₆: 25 pkt.

*Mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu ich metodyki, częściowym zebraniu izolatów dermatofitów, wykonaniu większości oznaczeń genomowych szczepów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). **Mój udział procentowy szacuję na 90%.***

- 5. Gnat S, Łagowski D, Nowakiewicz A, Zięba P.** Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 2018; doi: 10.1111/jam.13921.

IF₂₀₁₆: 2,099; MNiSW₂₀₁₆: 30 pkt.

*Mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu kolekcji szczepów dermatofitów, wykonaniu większości analiz fenotypowych czynników wirulencji, przeprowadzeniu interpretacji wyników, wnioskowaniu i napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). **Mój udział procentowy szacuję na 90%.***

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji:

- według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **145 pkt.**
- łączny *impact factor* według listy JCR: **11.159**

Dla publikacji nr 2 (opublikowanej w 2017 roku) i nr 3, 4 i 5 (opublikowanych w wersji online w 2018 roku) podano aktualne dane z roku 2016. Artykuły stanowiące osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy, znajdują się w załączeniu (zał. 5 i 6).

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

I. Wprowadzenie

W ostatnich latach zauważalny jest “epidemiologiczny renesans” grzybic zoofilnych wywoływanych przez różne gatunki dermatofitów. Jednymi z najważniejszych patogenów są grzyby należące do *Trichophyton mentagrophytes* complex, *T. verrucosum* i *Microsporum canis*, wywołujące wysoce zaraźliwe grzybice powierzchniowe, przenoszące się przez bezpośredni kontakt między ludźmi i zwierzętami (Barry i Hainer, 2003; Czaika i Lam, 2013; Takeda *i wsp.*, 2016). Wysoka częstotliwość zakażeń wywoływanych przez dermatofity spowodowana jest ich łatwą transmisją na inne gatunki niż pierwotny gospodarz, a szczególnie predysponowany do infekcji jest człowiek (Weitzman i Summerbell, 1995). Doniesienia naukowe podają, że dermatofitozy wykazujące objawy kliniczne pojawiają się u człowieka, gdy ten sam czynnik etiologiczny występuje u zwierzęcia jedynie asymptotycznie, czyniąc je nosicielem (Lakshmipathy i Kanabiran, 2010; Ziolkowska *i wsp.*, 2015). Infekcje powierzchniowe u zwierząt często są błędnie diagnozowane przy początku choroby i przez to błędnie leczone (Brillowska-Dąbrowska *i wsp.*, 2007), zwłaszcza podawanie preparatów steroidowych wyraźnie zmienia obraz choroby i utrudnia postawienie rozpoznania (Lakshmipathy i Kanabiran, 2010). Niewłaściwie leczone oraz nawracające grzybice powierzchniowe są potencjalnym źródłem zarażenia bezpośredniego i pośredniego dla innych zwierząt, a przede wszystkim dla ludzi (Havlickova *i wsp.*, 2008).

Postawienie prawidłowego rozpoznania utrudnione jest przez brak jednolitej ścieżki diagnostycznej przy podejrzeniu dermatofitozy (Graser *i wsp.*, 1998). Dermatofity są szczególnie trudne do identyfikacji wyłącznie na podstawie cech morfologicznych, a ich fenotypowe podobieństwo w obrębie grupy utrudnia wyznaczenie cech różnicujących (Mesquita *i wsp.*, 2016). Najnowsze typowanie genetyczne określa *Trichophyton mentagrophytes* jako jeden kompleks, morfologicznie nie do rozróżnienia, obejmujący *T. interdigitale* i *Trichophyton* sp., należący do *Arthroderma benhamiae* (Elewski, 2010; Packeau

i wsp., 2013). Ten podział taksonomiczny nie jest jednak użyteczny w praktyce klinicznej i w związku z tym diagnostycznie zbędny (Elewski, 2010; Packeu *i wsp.*, 2013). Jeszcze większych trudności nastręcza różnicowanie fenotypowe i genomowe izolatów klinicznych *T. verrucosum* i *Microsporum canis* (Dobrowolska *i wsp.*, 2011; Pasquetti *i wsp.*, 2017). Identyfikacja poszczególnych gatunków dermatofitów przeprowadzana jest rutynowo na podstawie występujących objawów klinicznych oraz opisie makromorfologii i badaniu mikroskopowym uzyskanej hodowli (De Hoog *i wsp.*, 2000). W celu uwierzytelnienia analizy diagnostycznej wykorzystuje się metody biologii molekularnej, jak dotąd sporadycznie wzbogacane o badanie aktywności enzymatycznej, która pozwala na ocenę stopnia zjadliwości izolatu klinicznego (Graser *i wsp.*, 2006; Sterry *i wsp.*, 2010). Takie postępowanie diagnostyczne pozwala uzyskać wystarczającą liczbę różnic pomiędzy gatunkami dermatofitów, aby dokonać wiarygodnej identyfikacji gatunku (Weitzman i Summerbell, 1995; Ziolkowska *i wsp.*, 2015), istotnej do wdrożenia postępowania terapeutycznego, ale przeważnie niewystarczającej z epidemiologicznego punktu widzenia (da Costa *i wsp.*, 2013; Shafiee *i wsp.*, 2014).

“Złoty standard”, najlepszy możliwy sposób postępowania wykorzystywany przy rutynowej identyfikacji dermatofitów stał się tematem trwającej dyskusji i nie ma jednego, wypracowanego stanowiska wśród mikrobiologów (Mesquita *i wsp.*, 2016; Beguin *i wsp.*, 2012). Opracowanie szybkiej, prostej i taniej metody diagnostyki infekcji i identyfikacji dermatofitów jest ważnym współczesnym wyzwaniem dla mikologów (Leibner-Ciszak *i wsp.*, 2010; Petinataud *i wsp.*, 2016). Obecny trend w diagnostyce mikologicznej podąża w kierunku wykorzystywania w identyfikacji dermatofitów badań molekularnych, przede wszystkim bazujących na analizie sekwencji ITS (ang. Internal Transcribed Spacer) i genotypowaniu, poprzedzonych skrupulatnymi badaniami morfologicznymi, uzyskaniem hodowli i ocenie mikromorfologii (Ziółkowska *i wsp.*, 2015; Courtellemont *i wsp.*, 2017).

Klasyczne metody identyfikacji dermatofitów opierają się na określeniu morfologii kolonii (zabarwienie awersu i rewersu kolonii, jej topografii, tekstury oraz szybkości wzrostu) i badaniu mikroskopowym (ocena kształtu i rozmiaru mikro- i makrokonidiów) (de Hoog *i wsp.*, 2000) w połączeniu z, rzadko wykonywanymi, badaniami biochemicznymi i fizjologicznymi (wzrost przy różnych temperaturach, wymagania pokarmowe, wytwarzanie enzymów, zdolność do perforowania włosa itp.) (Faggi *i wsp.*, 2001, Kamiya *i wsp.*, 2004). Główną wadą tych metod jest często obserwowana zmienność badanych cech, która zależy od indywidualnych właściwości badanego izolatu klinicznego, bez stałości gatunkowej, a wiele

dermatofitów ma charakter atypowy w pierwotnej izolacji (Graser *i wsp.*, 1998, Faggi *i wsp.*, 2001.). W dodatku ocena tych cech może być subiektywna, ponieważ w zależności od zastosowanego podłoża i warunków hodowli, dermatofity prezentują odmienną morfologię (Kamiya *i wsp.*, 2004). Z tych powodów badanie fenotypowe staje się praco- i czasochłonne, i w dużej liczbie przypadków nie nadaje się do rzetelnej identyfikacji dermatofitów na poziomie gatunku. Ponadto, nie posiada wystarczającej siły dyskryminacyjnej aby określić zmienność wewnątrzgatunkową, a tym samym nie jest użyteczne w dochodzeniu epidemiologicznym (Ziółkowska *i wsp.*, 2015; Gnat *i wsp.*, 2016; Watanabe *i wsp.*, 2017).

Wprowadzenie metod biologii molekularnej w latach 80-tych XX wieku wyraźnie zwiększyło wiarygodność, powtarzalność i wydajność identyfikacji dermatofitów, co przełożyło się na zwiększenie szybkości uzyskania wyniku i obniżyło związane z tym koszty (De Baere *i wsp.*, 2010; Elavarashi *i wsp.*, 2013). Sukces metod molekularnych i ich częste wykorzystywanie w rutynowej praktyce wynika z braku stabilności cech morfologicznych kultur uzyskiwanych w trakcie hodowli, co może skutkować błędną identyfikacją (Graser *i wsp.*, 1999; Graser *i wsp.*, 2008; Cafarchia *i wsp.*, 2013). Kolejnym utrudnieniem jest długi czas inkubacji niezbędny do wzrostu dermatofitów, aby uzyskać odpowiednio wyrażone cechy morfologiczne (Sharma *i wsp.*, 2015; Rezusta *i wsp.*, 2016). Chociaż zakażenie dermatofitem nie jest sytuacją bezpośredniego zagrożenia życia pacjenta, wymagającą interwencji natychmiastowej, wiarygodna identyfikacja gatunku dermatofita jest niezbędna do wykluczenia innych czynników etiologicznych, powodujących podobne zmiany jak w przypadku dermatofitozy, a tym samym do rozpoczęcia jak najwcześniej odpowiedniego leczenia (Moretti *i wsp.*, 1998; Liu *i wsp.*, 2002). Należy przy tym pamiętać, że szybkość rozprzestrzeniania się dermatofitów jest bardzo wysoka, więc przedłużająca się diagnostyka, skutkująca opóźnieniem w podjęciu właściwego postępowania terapeutycznego ma duże konsekwencje epidemiologiczne (Ming *i wsp.*, 2006; Pasquetti *i wsp.*, 2017). Drugim czynnikiem przemawiającym za stosowaniem metod molekularnych w diagnostyce dermatofitoz jest ich wysoka siła dyskryminacyjna i, w przypadku wielu technik, zdolność rozdzielcza umożliwiająca typowanie wewnątrzgatunkowe grzybów (Cano *i wsp.*, 2005; da Costa *i wsp.*, 2013). Tak wysoka rozdzielczość metod ma zasadnicze znaczenie w ocenie epidemiologicznej źródła infekcji (Cano *i wsp.*, 2005; Veraldi *i wsp.*, 2012; Neji *i wsp.*, 2016). Należy podkreślić, że w diagnostyce zakażeń powodowanych dermatofitami zoofilnymi, istotne, zwłaszcza w aspekcie powodzenia terapeutycznego, jest wskazanie pierwotnego ogniska grzyba i jego wyeliminowanie (Zhang *i wsp.*, 2009; Gnat *i wsp.*, 2018). Zwierzęta

bowiem mogą być asymptomatycznymi nosicielami dermatofitów, rozsiewając infekcję w otoczeniu (Watanabe *i wsp.*, 2017).

Wykrycie źródła zakażenia oraz możliwych dróg jego rozprzestrzeniania (Bloch *i wsp.*, 2016; Pasquetti *i wsp.*, 2017; Gupta *i wsp.*, 2017), jest kluczowe zwłaszcza przy infekcjach wieloszczepowych (Kac *i wsp.*, 2000; Gnat *i wsp.*, 2018), jak również identyfikacji nosicieli na farmach, w lecznicach weterynaryjnych, szpitalach, schroniskach dla zwierząt, a także innych miejscach, które mogą być ogniskami transmisji dermatofitów pomiędzy ludźmi, np. szpitale, szkoły, przedszkola, baseny (Jankowski *i wsp.*, 2017; Gupta *i wsp.*, 2017). Rozszerzona o aspekt epidemiologiczny diagnostyka dermatofitów jest w stanie nie tylko skrócić czas właściwego rozpoznania czynnika etiologicznego, ale przede wszystkim doprowadzić do eliminacji pierwotnych źródeł zakażenia, doboru metody dezynfekcji, a w niektórych przypadkach kwarantanny na danym obszarze, np. w gospodarstwie (Pasquetti *i wsp.*, 2017, Ming *i wsp.*, 2006). Tak ujęty rozszerzony cel diagnostyki zdecydowanie przyczyni się do redukcji kosztów zarządzania zakażeniem (Pasquetti *i wsp.*, 2017).

Rola dermatofitów w patogenezie grzybic powierzchniowych związana jest z produkcją charakterystycznego profilu enzymów, który najprawdopodobniej determinowany jest przez infekowany gatunek gospodarza zwierzęcego lub zakażonego człowieka (Cafarchia *i wsp.*, 2011; Elavarashi *i wsp.*, 2017). Przypuszcza się, że wytwarzanie enzymów może być związane ze składem tkanek skóry gospodarza i odzwierciedlać typ kolonizacji miejsc predylekcyjnych u zwierząt i człowieka (Cafarchia *i wsp.*, 2006). Natomiast samo wytwarzanie enzymów, jak i czas w jakim ono występuje, jest różne w zależności od patogennego szczepu dermatofitu (Elavarashi *i wsp.*, 2017). Równie istotne w patogenezie infekcji dermatofitami są hemolizyny (Schaufuss i Steller, 2003; Aktas i Yigit, 2015). Chemicznie hemolizyny są lipidami i białkami, które są toksyczne dla limfocytów, makrofagów i neutrofilów w przebiegu wielu infekcjach bakteryjnych (Schaufuss i Steller, 2013; Aktas i Yigit, 2015). Hemolizyny wytwarzane przez dermatofity mogą również działać podobnie i zmniejszać odpowiedź immunologiczną gospodarza (Schaufuss i Steller, 2003).

Podsumowując, obecnie wachlarz dostępnych w mikologii metod diagnostycznych jest bardzo szeroki i pozwala na przeprowadzenie kompleksowych badań identyfikacyjnych, epidemiologicznych, a także ocenę stopnia wirulencji grzyba. Pomimo tego znaczenie laboratoryjnej diagnostyki dermatofitów zoofilnych wciąż jest niedoszacowane, a przez mikologów bywa postrzegane jako czasochłonne i mało wiarygodne. Z tych powodów

uzasadnionym wydaje się podjęcie badań wskazujących na możliwe drogi postępowania identyfikacyjnego, a także poszukiwanie alternatywnych „markerów” wskazujących na poszczególne gatunki, rodzaje bądź grupy dermatofitów.

II. Cel

Badania przedstawione w publikacjach stanowiących omawiane osiągnięcie naukowe były wykonane przede wszystkim na szczepach *T. mentagrophytes* complex, *T. verrucosum* i *M. canis*, a także innych gatunkach dermatofitów (*T. rubrum*, *T. equinum*, *M. nanum*, *M. gallinae* i *E. floccosum*) wyizolowanych od zwierząt i ludzi. Główne cele przeprowadzonych badań to:

- a) opracowanie prostej, powtarzalnej i wiarygodnej ścieżki diagnostycznej dermatofitów zoofilnych metodami opartymi na analizie cech morfologiczno-hodowlanych, ocenie ich zróżnicowania genomowego, a także stopnia aktywności enzymatycznej, stanowiącej uniwersalne postępowanie identyfikacyjne dla najczęściej izolowanych od zwierząt i ludzi gatunków dermatofitów o istotnym znaczeniu epidemiologicznym;
- b) przeprowadzenie analizy porównawczej skuteczności identyfikacji gatunku patogenu za pomocą jedynie metod fenotypowych i w połączeniu z wykorzystaniem metod opartych na analizie genomu, a także ocena korelacji między wynikami diagnostyki morfologicznej, a wynikami analiz genetycznych;
- c) wystandaryzowanie czasu i typu hodowli szczepów klinicznych dermatofitów wykorzystywanych do izolacji DNA oraz stosowanej metody ekstrakcji DNA przeznaczonego do analiz molekularnych;
- d) odwzorowanie filogenezy izolatów dermatofitów na podstawie analizy cząsteczki ITS (ang. Internal Transcribed Spacer);
- e) wykazanie stopnia zróżnicowania genomów dermatofitów metodami genotypowania: MSP-fingerprinting (MicroSatellite Primed) i MP-PCR (ang. Melting-Profile PCR), a także ocena użyteczności tych metod w dochodzeniu epidemiologicznym;
- f) określenie stopnia aktywności enzymatycznej izolatów klinicznych dermatofitów oraz analiza porównawcza (w tym statystyczna) profilu wytwarzanych enzymów przez dermatofity wyizolowane od zwierząt

symptomatycznych, asymptomatycznych oraz ze zmian klinicznych u ludzi, a także wskazanie korelacji między badanym enzymem, a gatunkiem dermatofitu powodującego infekcje oraz odpowiedź na pytanie, czy intensywność zmian skórnych jest zależna od stopnia ogólnej aktywności enzymatycznej, czy też może od przewagi aktywności w przebiegu zakażenia przez jeden z nich;

- g) oznaczenie typu i stopnia intensywności hemolizy izolatów klinicznych dermatofitów zoofilnych.

III. Omówienie wyników

- a) ***Izolacja i identyfikacja gatunkowa dermatofitów izolowanych od zwierząt i człowieka***

Materiał do prowadzonych badań mikologicznych, których wyniki zostały opublikowane w cyklu prac, przedstawionych jako osiągnięcie naukowe, pobierany był zarówno od zwierząt wykazujących objawy kliniczne dermatofitozy oraz w trakcie rutynowych przeglądów farm hodowlanych zwierząt futerkowych (publikacja nr 1 i 3), ferm drobiu (publikacja nr 1 i 5), farm bydła (publikacja nr 2 i 4), hodowców (publikacja nr 1, 4, 5), jak i zwierząt towarzyszących i ich właścicieli zgłaszających się po poradę do lekarza weterynarii (publikacja nr 2 i 5). Została zebrana pula 234 izolatów klinicznych dermatofitów została zebrana, w tym: 61 szczepów *T. mentagrophytes* complex, 68 szczepów *T. verrucosum*, 45 szczepów *M. canis* i 60 szczepów innych gatunków dermatofitów pochodzących od zwierząt symptomatycznych i asymptomatycznych oraz ze zmian chorobowych od ludzi (publikacja nr 5). W przypadku zwierząt hodowlanych do pobierania materiału klinicznego wybierano zazwyczaj farmy duże, liczące około 100 zwierząt (publikacja nr 3, 4 i 5). Jednocześnie próby pobierane były także w indywidualnych i małych gospodarstwach. Szczególną uwagę, przy doborze miejsc poboru, zwracano na to, czy zgodnie z wywiadem epidemiologicznym w danym gospodarstwie, fermie lub u posiadacza już wcześniej występowały grzybice i czy osoby mające bezpośredni kontakt ze zwierzętami (hodowcy, lekarze weterynarii i inne) również uległy zarażeniu. Obserwacje własne, poczynione w trakcie wykonywania badań, wskazują, że przy ekspozycji na dermatofity zoofilne, wysokie ryzyko zarażenia należy powiązać z ciągłym kontaktem ludzi z chorymi

osobnikami, niewłaściwymi warunkami zoohigienicznymi oraz niewystarczającym nadzorem weterynaryjnym nad zwierzętami. Prawdopodobieństwo transmisji infekcji w gospodarstwie hodowlanym może zostać wyeliminowane poprzez prawidłowe użytkowanie sprzętu przez personel i ściśle przestrzeganiu zasad bioasekuracji (publikacja nr 3).

Do identyfikacji dermatofitów, w badaniach opublikowanych w cyklu stanowiącym osiągnięcie naukowe, wykorzystywałem zarówno metody diagnostyczne oparte o morfologię, jak i metody biologii molekularnej, zgodnie z najnowszymi standardami (Graser i wsp., 2008; Courtellemont i wsp., 2017). Klasyczna identyfikacja fenotypowa jest nadal uważana przez wielu mikologów za podstawowy standard każdego badania diagnostycznego i mimo coraz powszechniejszego wykorzystywania w identyfikacji dermatofitów technik biologii molekularnej, jest zawsze zalecana (Kano i wsp., 1998; Kupch i wsp., 2016). W wielu wiodących ośrodkach naukowych na świecie prowadzone są badania diagnostyczne oparte na opisie makro- i mikromorfologii dermatofitów i wykazaniu cech różnicujących gatunki (Graser i wsp., 2006; Courtellemont i wsp., 2017).

W pierwszym etapie oceny materiału diagnostycznego wykonywałem preparat bezpośredni i poszukiwałem struktur zakaźnych grzyba. Niezależnie od wyniku tego badania wstępnie zakładałem hodowlę grzyba. Taka praktyka pozwoliła oszacować korelację wyników badania bezpośredniego, stosowanego w pospolicie w diagnostyce laboratoryjnej (ocena występowania artrospor), a badaniem hodowlanym (uzyskanie wzrostu dermatofitu). Obserwację morfologii uzyskanych kolonii prowadziłem ze zwróceniem szczególnej uwagi na cechy łatwo dostrzegalne, mogące być wskazówką identyfikacyjną nawet dla niedoświadczonych w pracy z dermatofitami laborantów, takie jak zabarwienie rewersu i awersu, teksturę kolonii i jej topografię. Odnotowywałem przy tym szybkość wzrostu kolonii izolatów klinicznych poszczególnych gatunków dermatofitów, oceniając na kolejnych etapach ich mikromorfologię, celem wskazania uniwersalnego czasu inkubacji niezbędnego do wytworzenia przez grzyba typowych rozpoznawalnych elementów morfologicznych (mikrokonidiów, makrokonidiów, chlamydospor, kandelabrow, struktur spiralnych) stanowiących kolejny punkt identyfikacji (publikacja nr 1-5).

Poczynione obserwacje wskazują, że opis makromorfologii kolonii dermatofitów ma swoje uzasadnione miejsce w ścieżce diagnostycznej, bowiem wyznacza nie tylko cechy wskazujące na infekcje przez grzyba z grupy dermatofitów, ale także cechy różnicujące między gatunkami, m. in. *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* i *M. canis*, co w uchwytny sposób pozwala nakierować wstępne rozpoznanie (publikacja nr 1-4). *T. verrucosum* charakteryzował się koloniami o ziarnistej konsystencji, przypominającymi kalafior, barwy kremowej i beżowym rewersie. *M. canis* posiadał kolonie o miękko pudrowej teksturze z charakterystycznym żółtym zabarwieniem rewersu. Natomiast *T. mentagrophytes* wytwarzał puchate kolonie o jasnym awersie i żółto-pomarańczowym do brązowego rewersie z silnym pobrużdżeniem, niejednokrotnie ściągającym podłoże stałe. Natomiast w płynnym podłożu *T. mentagrophytes* formował twarde beżowo-brązowy kożuch na powierzchni. *T. verrucosum* tworzył małe (1-2 mm) granulki, łączące się w łańcuszek, które spadały na dno kolby. Z kolei *M. canis* charakteryzował kłaczkowy wzrost w całej objętości podłoża. Co więcej, również wieloszczepowe zakażenie *T. mentagrophytes* zostało udokumentowane w wykonywanym przeze mnie badaniu hodowlanym (publikacja nr 3), w którym uzyskano cztery odmienne kultury dermatofitów, wywołujące kliniczną postać dermatofitozy u tego samego osobnika (lis), a dodatkowo ich zróżnicowanie zostało potwierdzone w analizie genomów. Dotychczas podobnych doniesień nie było w literaturze naukowej. W uzyskanych wynikach potwierdziłem istotność oceny makromorfologii w trakcie diagnostyki mikologicznej. Przeprowadzone badania stanowią istotny wkład w ocenę zmienności fenotypowej izolatów klinicznych dermatofitów zoofilnych i wskazują cechy, będące „markerowymi” wyznacznikami wykorzystywanymi w rutynowej diagnostyce mikologicznej poszczególnych gatunków.

Ocena obrazu mikromorfologicznego badanych szczepów klinicznych *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* i *M. canis* wykazała wyraźne przejście od dominującej postaci strzępkowej w czwartym dniu inkubacji do formy zarodnikowej w 10 dniu. Spory pojawiły się najwcześniej w przypadku *T. verrucosum*, nieco niższa szybkość sporulacji została zaobserwowana dla izolatów *T. mentagrophytes* i *M. canis* (publikacja nr 1-4). Przeprowadzone przeze mnie obserwacje wskazały, że optymalnym czasem wykonywania oceny

mikromorfologii dermatofitów jest 7 dzień inkubacji. W wykonywanych preparatach konidia występowały w liczebności i ułożeniu pozwalającym dokonać prawidłowej oceny diagnostycznej, a jednocześnie nie dominowały preparatu i postać strzępkowa nadal była widoczna. Należy jednak nadmienić, że ocena obrazu mikromorfologicznego jest znacznie trudniejsza i wymaga znacznego doświadczenia mikrobiologa.

Wykonane przeze mnie badania identyfikacyjne dermatofitów objęły również szereg analiz molekularnych, będących wiarygodnym uzupełnieniem morfotypowania. Ponadto, w oparciu o wcześniejsze badania, stwierdzono 100% zgodność pomiędzy wynikami metod molekularnych i hodowlanych stosowanych do identyfikacji czynnika etiologicznego dermatofitozy (Kano *i wsp.*, 2001; Nenoff *i wsp.*, 2007; Elavarashi *i wsp.*, 2013). Wachlarz dostępnych metod molekularnych wdrażanych do diagnostyki mikologicznej ciągle się rozszerza i obejmuje, przede wszystkim PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) i „multiplex” PCR (Kanbe *i wsp.*, 2003; Kano, 2004; Brillowska-Dąbrowska *i wsp.*, 2007), PCR fingerprinting (Kanbe *i wsp.*, 2003; De Baere *i wsp.*, 2010), losową amplifikację polimorficznego DNA (RAPD, ang. Random Amplified Polymorphism DNA) (Liu *i wsp.*, 2002), polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. Restriction Fragment Length Polymorphism) (Shin *i wsp.*, 2003; Elavarashi *i wsp.*, 2013), profil topnienia DNA (MP-PCR, ang. PCR melting profile) (Krawczyk *i wsp.*, 2006; Leibner-Cisak *i wsp.*, 2010), wysokorozdzielczą denaturację DNA (HRM-PCR, ang. high resolution melting) (Didehdar *i wsp.*, 2016), PCR z losowo dobranymi starterami (AP-PCR, ang. arbitrary primed PCR) (Liu *i wsp.*, 2000) i sekwencjonowanie DNA (Martinez *i wsp.*, 2012; Ziółkowska *i wsp.*, 2015; Kumar *i wsp.*, 2016). Niektóre z tych metod, oparte na analizie całego materiału genetycznego grzyba, pozwalają uzyskać wysoką czułość identyfikacji i precyzyjnie ocenić stopień zróżnicowania wewnątrzgatunkowego izolatów klinicznych (Cano *i wsp.*, 2005; da Costa *i wsp.*, 2013).

W pierwszym etapie wykonywanych przeze mnie molekularnych badań diagnostycznych dermatofitów, przeprowadzałem amplifikację genu *chs-1* (kodującego syntazę chityny), stanowiącego marker grupy dermatofitów (publikacja nr 3). Określenie masy molekularnej ampliconu *chs-1* pozwalało dokonać wstępnej, szybkiej klasyfikacji izolatów klinicznych do grupy

dermatofitów w przypadkach wątpliwych. Wszystkie identyfikowane tą metodą szczepy *T. mentagrophytes*, wyizolowane od jednego osobnika, posiadały amplikony *chs-1* o masie molekularnej wynoszącej 650 pz, identycznej jak szczep referencyjny tego gatunku, a także uzyskane masy znalazły swoje identyfikacyjne potwierdzenie w bazie NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information; publikacja nr 3). Stosowanie amplifikacji genu *chs-1* znacząco przyspieszało diagnostykę dermatofitoz, a uzyskiwane przeze mnie wyniki były wysoce powtarzalne, co przedstawiłem w publikacjach.

Najważniejszym, z punktu widzenia identyfikacji gatunkowej dermatofitów, elementem badań genomowych jest amplifikacja i sekwencjonowanie cząsteczki ITS. Cząsteczki ITS spełniają jednocześnie kilka kryteriów umożliwiających wiarygodne ustalanie pozycji gatunkowej grzybów, a także badania ich ewolucyjnego pokrewieństwa. Są to, po pierwsze, powszechne występowanie we wszystkich grupach badanych organizmów oraz pełnienie w nich tych samych funkcji (Graser i wsp., 1999). Po drugie, złożona struktura zawierająca fragmenty wysoce konserwatywne, a także zmienne. Pierwsze z nich umożliwiają prawidłowe przyrównanie analizowanych sekwencji, drugie, określenie stopnia podobieństwa między nimi. Identyfikacja dermatofitu i analiza filogenetyczna jego pochodzenia na podstawie cząsteczki ITS dotyczy jednego z konserwatywnych regionów genomu – fragmentu genu rDNA, zawierającego część 18S i 28S rDNA (ITS1), 5.8S rDNA oraz fragment ITS2 (Graser i wsp., 2008). Analiza porównawcza sekwencji ITS izolatów klinicznych dermatofitów i szczepów referencyjnych dostępnych w bazie NCBI pozwalała dokonać wiarygodnej identyfikacji gatunkowej. W przypadku 28 wybranych szczepów *T. verrucosum* zebranych w okresie ostatnich 40 lat (od 1970 rok) stopień podobieństwa uzyskanych przeze mnie sekwencji ITS do analogicznych sekwencji szczepu referencyjnego *T. verrucosum* ATCC10695 wynosił 99% (publikacja nr 4). Również w przypadku infekcji wieloszczepowej *T. mentagrophytes*, analiza sekwencji ITS dała 99% wynik identyfikacji gatunkowej wszystkich izolatów (publikacja nr 3). W przeprowadzonych badaniach potwierdziłem wysoką precyzję ustalania przynależności gatunkowej dermatofitów na podstawie analizy stopnia podobieństwa sekwencji ITS.

Na podstawie różnic w sekwencji cząsteczki ITS została opracowana nowa klasyfikacja fenotypowo nierozróżnialnych gatunków *T. mentagrophytes*

complex, dzieląca grupę na formy anamorficzne i telomorficzne. Ze względu na heterogenność, interpretacja wyników molekularnej identyfikacji gatunkowej wybranych 22 izolatów *T. mentagrophytes* complex przysporzyła większych trudności. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazałem 77–99% stopień podobieństwa sekwencji ITS 17 szczepów klinicznych i szczepu referencyjnego *Arthroderma benhamiae* CBS 112371, i 92% stopień podobieństwa tej sekwencji między jednym badanym izolatem a *A. vanbreuseghemii* KMU5461 (publikacja nr 1). Pozostałych sześć szczepów sklasyfikowałem jako *T. interdigitale*. Należy zaznaczyć, że w przypadku molekularnej identyfikacji stadiów doskonałych dermatofitów, nie da się zaobserwować żadnych korelacji z morfotypowaniem (publikacja nr 1).

Wydaje się, że mniejszą użyteczność niż sekwencjonowanie posiada technika ITS-RFLP (ang. ITS-Restriction Fragment Length Polymorphism), niemniej jednak wielu autorów wykorzystuje tę metodę do identyfikacji gatunkowej dermatofitów. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach diagnostycznych posłużyłem się czterema enzymami restrykcyjnymi: *MvaI*, *HinfI*, *HhaI*, *EcoRI*, do cięcia amplikonu ITS, a uzyskane profile elektroforetyczne poddałem analizie w programie BioNumerics (VilberLourmat, France). Trawienie restrykcyjne cząsteczki ITS 22 izolatów klinicznych *T. mentagrophytes* (publikacja nr 1) enzymami *MvaI* i *HinfI* pozwoliło uzyskać trzy różne profile elektroforetyczne, w przypadku *HhaI* otrzymałem dwa wzory restrykcyjne, a enzym *EcoRI* nie różnicował amplikonów ITS badanych szczepów. Analiza uzyskanych profili elektroforetycznych wykazała sześć różnych genotypów cząsteczki ITS wśród badanych szczepów dermatofitów. Na dendrogramie skonstruowanym metodą UPGMA (ang. Unweighted Pair-Group Method Arithmetic) izolaty kliniczne *T. mentagrophytes* utworzyły grupy o współczynniku podobieństwa wzorów restrykcyjnych ITS wynoszącym 78%. Pomimo uzyskania wysokiego stopnia różnicowania profili, nie mogły być one powiązane z konkretnymi gatunkami dermatofitów i stanowić podstawy identyfikacji. Wydaje się, że technika ITS-RFLP ma znacznie niższą siłę dyskryminacyjną, a ze względu na pracochłonność wykonania, jej przydatność w diagnostyce mikologicznej dermatofitów jest ograniczona, co wykazały moje badania.

Rzadziej stosowaną praktyką w diagnostyce dermatofitów jest określanie właściwości enzymatycznych izolatów klinicznych, m. in. oznaczanie aktywności keratynazy, elastazy, lipazy, fosfolipazy, proteazy, DNazy i żelatynazy. Analizując aktywność enzymatyczną dermatofitów wykazano występowanie wyraźnych różnic w składzie wytwarzanych przez nie enzymów (Cafarchia *i wsp.*, 2013; Elavarashi *i wsp.*, 2017). W związku z tym moje zainteresowanie budziła możliwość opracowania charakterystycznego kompleksu taksonomicznego enzymów dla poszczególnych rodzajów i gatunków dermatofitów. Podjęta przeze mnie próba określenia profilu wytwarzanych enzymów przez poszczególne gatunki dermatofitów, m. in. *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. rubrum*, *T. equinum*, *M. canis*, *M. nanum*, *M. gallinae* i *E. floccosum*, wykazała, że nie istnieje charakterystyczny profil enzymatyczny, będący jednoznacznym wskazaniem diagnostycznym gatunku dermatofitu (publikacja nr 5). Niemniej jednak pewne zależności daje się wyraźnie zaobserwować. W przeprowadzonych badaniach wykazałem, że jedynie keratynaza wydaje się być skorelowana z pojawieniem się infekcji dermatofitem, niezależnie od gatunku patogenu. Inne enzymy wytwarzane są przez różne gatunki dermatofitów z różnymi częstotliwościami, np. proteaza związana jest z infekcjami izolatami klinicznymi *T. mentagrophytes*, a DNaza jest charakterystyczna dla *T. verrucosum* (publikacja nr 5).

b) ***Ocena optymalnego czasu, typu hodowli oraz metody izolacji DNA w diagnostyce molekularnej dermatofitów***

Molekularne metody diagnostyki dermatofitów wymagają wystandaryzowanej, szybkiej, łatwej i wydajnej metody izolacji DNA. Zazwyczaj należy wziąć pod uwagę dwa kluczowe czynniki procedury ekstrakcji DNA. Pierwszym z nich jest maksymalizacja wydajności techniki uzyskiwania preparatu DNA, a po drugie - zapewnienie, że wyekstrahowany DNA jest podatny na reakcje enzymatyczne, takie jak amplifikacja i cięcie restrykcyjne. Zatem, właściwy dobór czasu inkubacji izolatu klinicznego dermatofitu i typu zastosowanej hodowli, a także skuteczna metoda izolacji DNA, łącząca dwa kluczowe czynniki, jest niezbędna do prawidłowego przeprowadzenia dalszych etapów diagnostyki molekularnej dermatofitów. W literaturze nie było dotychczas

doniesień rozwiązujących ten problem. W publikacji, stanowiącej omawiane osiągnięcie naukowe, określiłem optymalny czas inkubacji, metodę hodowli i izolacji DNA, stanowiące podstawę do analiz molekularnych dermatofitów o największym znaczeniu epidemiologicznym w Europie, tj. *M. canis*, *T. mentagrophytes* i *T. verrucosum* (publikacja nr 2). Dokonana przeze mnie ocena uzyskanych różnymi metodami preparatów DNA polegała przede wszystkim na wyborze optymalnej techniki hodowli, z wykorzystaniem podłoża stałego i płynnego, w różnych przedziałach czasowych inkubacji grzybów. Analizie porównawczej poddałem następujące metody ekstrakcji DNA: technikę z wykorzystaniem mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamylowy, technikę z wykorzystaniem CTAB, a także cztery powszechnie używane zestawy kliku producentów.

Najwyższe stężenie i czystość preparatów DNA dla wszystkich analizowanych organizmów uzyskiwano stosując metodę fenol-chloroform (publikacja nr 2). Metoda CTAB pozwalała wyizolować DNA na poziomie wydajności wynoszącym 62.21% wobec stężenia DNA otrzymanego za pomocą pierwszej techniki. W przypadku zestawów komercyjnych, największą efektywność ekstrakcji wykazano dla zestawu firmy Macherey-Nagel (35.53% wobec metody fenol-chloroform), następnie dla zestawu firmy EuryX (25.97%), GeneAll (18.99%) i A&A Biotechnology (15.41%). Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że dla *M. canis* i *T. verrucosum* statystycznie istotnie wyższą wydajność ekstrakcji DNA uzyskiwano po 7 dniach inkubacji niezależnie od zastosowanego typu hodowli (stała czy płynna). Analiza wyników otrzymanych dla *T. mentagrophytes* nie wykazała statystycznie istotnych różnic w preparatach DNA uzyskiwanych w 7-dniu inkubacji (publikacja nr 2). Jednakże, notowana była tendencja większej efektywności izolacji w tym okresie hodowli. Dodatkowo, lepszym wyborem w przypadku tego dermatofitu jest stosowanie hodowli na podłożu stałym. Ostatecznie, w przeprowadzonym badaniu wskazałem metodę ekstrakcji DNA z wykorzystaniem mieszaniny fenol-chloroform i 7 dniowy okres inkubacji jako standard do analiz molekularnych dermatofitów.

c) ***Analiza historii ewolucyjnej dermatofitów w oparciu o cząsteczkę Internal Transcribed Spacer (ITS)***

Śledzenie historii ewolucyjnej mikroorganizmów, także grzybów, stanowi istotny element w obserwowaniu ich zmienności genetycznej i szacowaniu czasu dywergencji gatunków. Dla dermatofitów doniesienia dotyczące filogenezy są jeszcze sporadyczne, a szerszy zakres badań wymaga zwiększenia zasobu ogólnodostępnych sekwencji w bazach danych. Przeprowadzone przeze mnie analizy sekwencji cząsteczki ITS dostarczyły nie tylko informacji o przynależności gatunkowej poszczególnych izolatów dermatofitów, ale również uzyskane sekwencje posłużyły do wykonania analizy filogenetycznej (publikacja nr 1, 3 i 4). Literatura wskazuje na dwie użyteczne w odwzorowywaniu filogenezy dermatofitów sekwencje: genu *chs-1* i fragmentu ITS. Ta druga jest obecnie uznawana za ‘złoty standard’ w śledzeniu historii ewolucyjnej mikroorganizmów eukariotycznych i została wykorzystana przeze mnie do analizy zmienności genetycznej pozyskanych izolatów klinicznych. Do konstrukcji filogramów metodą największego podobieństwa (ML, ang. Maximum Likelihood) wykorzystywałem autorską technikę, w której podstawę określania odległości ewolucyjnych pomiędzy analizowanymi organizmami, stanowił optymalnie dobrany, według kryterium informacyjnego Akaike, model podstawień nukleotydowych (publikacja nr 1, 3 i 4).

Analiza filogenetyczna badanych szczepów *T. verrucosum* wskazała, że tworzą one monofiletyczną grupę, o współczynniku poparcia wynoszącym 99%, ze szczepem referencyjnym *T. verrucosum* ATCC10695 (publikacja nr 4). Odrębną grupę na filogramie utworzyły pozostałe analizowane gatunki grzybów z rodzaju *Trichophyton*. Z kolei najbardziej ewolucyjnie odległymi organizmami względem badanych dermatofitów były *Epidermophyton floccosum* CBS457.56 i *M. canis* CBS113480. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na wspólną drogę ewolucyjną wszystkich badanych izolatów klinicznych i *T. verrucosum* oraz odległy czas dywergencji poszczególnych gatunków dermatofitów. Analiza sekwencji ITS szczepów *T. mentagrophytes* wyizolowanych od jednego osobnika, również wykazała ich bliskie pokrewieństwo ewolucyjne, dodatkowo potwierdzając identyfikację gatunkową (publikacja nr 3). Na filogramie łączą się

one z *T. mentagrophytes* CBS318.56 w węźle o poparciu wynoszącym 99%. Odrębne grupy utworzyły włączone do analizy gatunki *Trichophyton* spp., a zupełnie zewnętrznie, jako najdalej ewolucyjnie spokrewnione organizmy, ulokowały się *E. floccosum* ATCC26072 i *M. canis* ATCC23828.

Większych trudności nastręcza interpretacja relacji filogenetycznych stadiów doskonałych *T. mentagrophytes* complex izolowanych od różnych gatunków zwierząt, zwłaszcza futerkowych (publikacja nr 1). Filogram obrazuje bliskie ewolucyjne powiązanie między izolatami klinicznymi i dermatofitami referencyjnymi z gatunku *A. vanbreuseghemii* i *T. interdigitale*, które łączy węzeł o współczynniku poparcia wynoszącym 100%. Odrębną grupę tworzą szczepy identyfikowane jako *A. benhamiae*. Dodatkowo, jeden szczep identyfikowany jako *A. benhamiae* wykazuje inną filogenezę i tworzy niezależną gałąź, która łączy się w węźle o współczynniku poparcia wynoszącym 73% ze szczepem referencyjnym *A. benhamiae* CBS112371 i pozostałymi izolatami klasyfikowanymi do tego gatunku. Przedstawione wyniki wskazują jednoznacznie na odmienne pochodzenie filogenetyczne gatunków klasyfikowanych jako *T. mentagrophytes* complex i ich krótką wspólną drogę ewolucyjną.

d) ***Analiza stopnia zróżnicowania genomów dermatofitów metodami markerów molekularnych i typowanie epidemiologiczne***

Jednym z kluczowych etapów analizy genetycznej dermatofitów jest genotypowanie zebranych izolatów klinicznych. Z epidemiologicznego punktu widzenia wydaje się, że jest to w wielu przypadkach niezastępowalny element umożliwiający wskazanie źródła infekcji. Badania epidemiologiczne nad infekcjami wywoływanymi przez dermatofity zoofilne u ludzi i zwierząt wykazały brak fenotypowego markera źródła zakażenia (da Costa *i wsp.*, 2013; Shafiee *i wsp.*, 2014). Epidemiologiczne wskazanie pierwotnego źródła infekcji oraz możliwych dróg jej rozprzestrzeniania wymaga stosowania metod opartych zwykle na analizie całego genomu grzyba. Metody markerów molekularnych mają rozdzielczość znacznie wyższą niż określenie gatunku i pozwalają na zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe, a w konsekwencji, umożliwiają prowadzenie

dochodzenia epidemiologicznego z wysokim prawdopodobieństwem powodzenia.

Metodami o wysokiej sile dyskryminacyjnej, które zastosowałem, w badaniach stanowiących osiągnięcie naukowe, do określania stopnia zróżnicowania genomów szczepów dermatofitów były następujące oznaczenia: MSP-fingerprinting (MicroSatellite Primed fingerprinting) oraz MP-PCR (PCR Melting Profile). W przeprowadzonych badaniach, odnotowałem, iż jeden osobnik może być zarażony zróżnicowanymi fenotypowo i genomowo szczepami *T. mentagrophytes* (publikacja nr 3). Wieloszczepowe zakażenie *T. mentagrophytes* udokumentowałem w badaniu hodowlanym, a dodatkowo potwierdziłem metodą MP-PCR. Stosując tę metodę ujawniłem cztery odmienne profile elektroforetyczne izolatów wywołujących dermatofitozę. Wszystkie uzyskane od tego samego osobnika szczepy były genetycznie odmienne od siebie, a dodatkowo, w tym przypadku, różnorodność genetyczna odpowiadała zróżnicowaniu morfologicznemu uzyskanemu w badaniu hodowlanym. Środowisko mikologów przedstawiało do tej pory stanowisko, oparte na wynikach rutynowo przeprowadzanej diagnostyki oznaczającej wyłącznie cechy morfologiczne, iż tylko jeden izolat może być rozpoznany od pojedynczego pacjenta (Weitzmann i Summerbel, 1995). Biorąc powyższe pod uwagę, a dodatkowo opierając się na wynikach własnych i doniesieniach literatury, uzasadnione wydaje się stwierdzenie o odrębnym źródle infekcji każdym ze szczepów przez zwierzę (publikacja nr 3).

Nie zawsze uzyskiwane wyniki genotypowania odpowiadają jednak w tak bezpośredni sposób możliwej genezie infekcji. W przeprowadzonej przeze mnie analizie metodą MP-PCR 28 szczepów klinicznych *T. verrucosum* pochodzących od krów i owiec z różnych gospodarstw oraz hodowców, pracujących w tych gospodarstwach, zebranych na przestrzeni aż 40 lat, nie udało się uchwycić żadnego zróżnicowania genomów badanych dermatofitów (publikacja nr 4). Pomimo, że izolaty pozyskiwane były od różnych zwierząt, z różnych farm i w odległych okresach czasu, żadne dwa różne profile elektroforetyczne nie zostały uzyskane. Dołączenie drugiej analizy metodą markerów molekularnych, MSP-fingerprinting ze starterami (GTG)₅ i (GACA)₄ również nie ujawniło żadnego

zróznicowania genomów szczepów *T. verrucosum*. W literaturze brak jest doniesień dotyczących genotypowania *T. verrucosum*, a powodem może być wysoka stabilność genomowa tego dermatofitu i trudności z izolacją czystej kultury. Tym bardziej zaskakującym wydaje się, odnaleziona heterogenność sekwencji cząsteczki ITS tych szczepów. W analizie, którą przeprowadziłem, sekwencja ITS izolatów *T. verrucosum* o długości 625 pz posiadała sumarycznie siedem pozycji zmiennych. Po wykonaniu przyrównania sekwencji wszystkich badanych szczepów, wskazano sześć różnych grup i łączącą je zależność, umożliwiającą wskazanie farmy, niezależnie od roku izolacji grzyba, z której pochodził dermatofit. Podobnie, izolaty kliniczne pochodzące od hodowców były identyczne jak te od zwierząt z tych samych farm (publikacja nr 4). Chociaż stopień zakonserwowania cząsteczki ITS jest zbyt wysoki, aby w sposób wiarygodny ocenić zróznicowanie wewnątrzgatunkowe dermatofitów, w omawianym przeze mnie przypadku, zaledwie 1.5% zmiennych *loci* ujawniało pochodzenie izolatów.

e) ***Stopień aktywności enzymatycznej i hemolitycznej dermatofitów zoofilnych***

Patogeneza grzybic powierzchniowych związana jest z produkcją egzoenzymów przez dermatofity. Enzymatyczne czynniki wirulencji dermatofitów są standardowo określone fenotypowo, na podstawie stopnia aktywności enzymu. Do tego celu używa się opisanych i wystandaryzowanych podłoży hodowlanych. Dotychczas została zbadana zdolność do wytwarzania następujących enzymów: keratynazy, fosfolipazy, lipazy, żelatynazy, DNazy. Wykazano, że keratynaza jest najważniejszym czynnikiem zjadliwości u dermatofitów, a elastaza odpowiada w głównej mierze za występowanie zmian skórnych u człowieka (Vermout *i wsp.*, 2008; Sharma *i wsp.*, 2011). Z kolei wysoki poziom wytwarzanej DNAzy związany jest z intensywnością procesu zapalnego u ludzi (Cafarchia *i wsp.*, 2011; Elavarashi *i wsp.*, 2017). Podobnie lipazy i proteazy, które są odpowiedzialne za początek infekcji wywołanej przez dermatofity, poprzez uszkodzenie i rozluźnianie *stratum corneum* w naskórku człowieka, i jak się przypuszcza także u zwierząt (Vermout *i wsp.*, 2008; Cafarchia *i wsp.*, 2011). Natomiast brak jest dostępnych wyników badań porównawczych, które uwzględniałyby aktywność enzymatyczną dermatofitów

w odniesieniu do intensywności objawów klinicznych u zarażonego organizmu, a także samego gatunku gospodarzy. W tym aspekcie istotne jest, czy ten sam izolat kliniczny wyizolowany od zwierzęcia i zainfekowanego człowieka prezentuje odmienny profil enzymatyczny bądź stopień aktywności enzymatycznej. Określenie stopnia aktywności enzymatycznej mogłoby służyć za czynnik prognostyczny dla przebiegu samego procesu chorobowego, ale i możliwości jego dalszego rozprzestrzeniania.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach, określiłem aktywność enzymatyczną izolatów klinicznych pochodzących od zwierząt symptomatycznych, asymptomatycznych i człowieka następujących gatunków dermatofitów: *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. rubrum*, *T. equinum*, *M. canis*, *M. nanum*, *M. gallinae* i *E. floccosum*. Ogólny stopień aktywności enzymatycznej oznaczyłem na 67%, przy czym był on zróżnicowany u poszczególnych gatunków dermatofitów. Wykazałem, że wszystkie testowane szczepy posiadają aktywność keratynazy, a dodatkowo 96% z nich także fosfolipazy (publikacja nr 5). Najniższą aktywność spośród testowanych enzymów wykazałem dla elastazy i żelatynazy, odpowiednio 23% i 14%. Co więcej, aktywności żelatynazy nie wykazywał żaden szczep *M. gallinae* i *E. floccosum*, a elastazy *T. equinum*, *M. nanum* i *M. gallinae*. Analiza wyników wskazała, że statystycznie istotnie wyższa aktywność proteazy, elastazy i DNazy występowała u izolatów *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* i *T. verrucosum* niż u innych badanych szczepów. Z kolei aktywność elastazy znajdowała się na statystycznie istotnie wyższym poziomie u szczepów *M. canis* niż u *T. mentagrophytes*. Badania, które przeprowadziłem, udowadniają, że keratynaza jest głównym czynnikiem wirulencji dermatofitów, a ocena stopnia jej aktywności stanowi użyteczną technikę prognostyczną infekcji.

Natomiast analiza aktywności enzymatycznej dermatofitów w zależności od pochodzenia materiału diagnostycznego wykazała statystycznie wyższą produkcję keratynazy u szczepów *T. mentagrophytes* i *T. verrucosum* pochodzących od zwierząt symptomatycznych, a w przypadku *M. canis* od zwierząt asymptomatycznych (publikacja nr 5). Z kolei, statystycznie większy odsetek szczepów *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* i *M. canis*, które

produkowały elastazę, pochodził z infekcji od ludzi. Nie stwierdzono natomiast żadnych różnic w aktywności tego enzymu niezależnie od pochodzenia izolatów. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać korelację aktywności elastazy z występowaniem nasilonych zmian skórnych u ludzi.

W literaturze naukowej pojawiają się doniesienia, że aktywność enzymatyczna, tym samym stopień wirulencji, dermatofitów zależy od gospodarza. W tym aspekcie ciekawe wydają się być wyniki, przeprowadzonych przeze mnie, badań nad aktywnością enzymów w wieloszczepowym zakażeniu na tle *T. mentagrophytes* jednego osobnika. Oznaczony stopień wirulencji czterech izolatów klinicznych wykazał, że wszystkie produkują keratynazę, fosfolipazę i proteazę na zbliżonym poziomie aktywności, bez uchwytnej statystycznie istotnych różnic w strefach rozkładu substratów (publikacja nr 3). Z drugiej strony, żaden z nich nie wykazał aktywności lipazy i żelatynazy. Obserwacje te nie korelują z wynikami uzyskanymi w badaniu 61 szczepów klinicznych *T. mentagrophytes* różnego pochodzenia, w którym aktywność lipazy wykazało 90% izolatów, a żelatynazy 16% z nich (publikacja nr 5). Odnosząc uzyskane wyniki do symptomatycznych infekcji *T. mentagrophytes*, taką było zakażenie wieloszczepowe, aktywności lipazy i żelatynazy wykazało odpowiednio 95% i 15% badanych szczepów. Wydaje się więc, że wytwarzanie enzymów jest ściśle skorelowane z gospodarzem infekcji.

Biorąc pod uwagę hemolizyny jako czynniki wirulencji, stopień aktywności hemolitycznej może być istotny w rozwoju infekcji w zależności od gatunku dermatofitów. Brak jest szerszych badań nad zróżnicowaniem aktywności hemolitycznej gatunków i szczepów dermatofitów, a także doniesień nad specyficznością gatunkową hemolizyn dermatofitów. W jednym z nielicznych dostępnych w literaturze opracowań wyników badań, Schaufuss i Steller (2003) zbadali wrażliwość erytrocytów pochodzących od różnych gatunków ssaków na hemolizynę wyizolowaną z *T. mentagrophytes* i zasugerowali, że hemolizyna wykazywała specyficzność wobec gatunku, od którego pochodziły erytrocyty. Ponadto, wykazano, że ludzkie erytrocyty były najbardziej odpornymi komórkami, stąd hemolizyna może być mniej ważna w patogenezie dermatofitozy zoofilnej u ludzi (Schaufuss i Steller, 2003; Elavarashi i wsp., 2017). Oznaczony

w ramach badań, stanowiących osiągnięcie naukowe, ogólny stopień aktywności hemolitycznej testowanych 234 izolatów klinicznych dermatofitów wynosił 75%. Wykazałem, że wszystkie badane szczepy *T. mentagrophytes* są zdolne do wywoływania hemolizy. Na przeciwnym biegunie znajdowały się izolaty *M. nanum*, z których żaden nie wykazywał tej właściwości (publikacja nr 5). Natomiast, statystycznie istotnie wyższy odsetek izolatów klinicznych *M. canis* pochodzących z infekcji ludzi, niż od zwierząt symptomatycznych i asymptomatycznych, wykazywał hemolizę. Podobnej zależności nie udało się stwierdzić dla szczepów *T. mentagrophytes* i *T. verrucosum*. Wykazałem również wysoki stopień aktywności hemolitycznej czterech izolatów klinicznych *T. mentagrophytes* infekujących jednego osobnika, dodatkowo znajdował się on na zbliżonym poziomie dla wszystkich szczepów (publikacja nr 3). Przeprowadzone badania wskazują, że zdolność do wywoływania hemolizy jest jednym z czynników wirulencji dermatofitów, jednak stopień tej aktywności nie może stanowić jednoznacznego czynnika prognostycznego nasilenia infekcji.

IV. Podsumowanie

Badania przedstawione w omawianych publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe dostarczyły istotnych danych dotyczących metod diagnostyki, w tym technik molekularnych, typowania epidemiologicznego i czynników wirulencji dermatofitów zoofilnych o największym znaczeniu w Europie. Pula szczepów jaką pozyskałem do przeprowadzenia badań stanowiła reprezentatywną grupę epidemiologicznie istotnych gatunków dermatofitów pochodzących od zwierząt symptomatycznych, a skrupulatny sposób zbierania materiału diagnostycznego i obserwowania ognisk infekcji umożliwił izolację szczepów klinicznych także od ludzi oraz zwierząt asymptomatycznych. Podjąłem działania w kierunku opracowania wystandaryzowanej ścieżki diagnostyki molekularnej, dostępnej do wykonania w każdym laboratorium mikrobiologicznym i prezentującej wystarczający poziom rozdzielczości, umożliwiający rzetelną identyfikację gatunku grzyba. W przedstawionych publikacjach zaproponowałem stosowanie identyfikacji dermatofitów poprzez połączenie wyników wstępnego morfotypowania, ze szczególnym uwzględnieniem makromorfologii izolatów, z badaniem genomowym opartym na określaniu masy molekularnej amplikonu genu *chs-1*, w wątpliwych przypadkach diagnostycznych, i analizie sekwencji cząsteczki ITS. Jako uzupełnienie rutynowo wykonywanej identyfikacji gatunkowej grzyba, wskazałem możliwość

typowania epidemiologicznego z zastosowaniem metod markerów molekularnych, a także udowodniłem, że w pewnych przypadkach już sama zmienność sekwencji ITS może wykazywać użyteczność we wskazywaniu źródła infekcji.

Główne ograniczenie stosowania metod molekularnych w diagnostyce dermatofitów stanowi ekstrakcja DNA w wysokim stężeniu i czystości. W przeprowadzonych badaniach wystandaryzowałem optymalny czas prowadzenia hodowli i technikę izolacji DNA dla dermatofitów, wskazując 7-dniowy okres inkubacji i metodę z wykorzystaniem mieszaniny fenol-chloroform jako niezawodny sposób uzyskania diagnostycznego preparatu DNA.

Dodatkowo, podjąłem próbę opracowania i wprowadzenia do postępowania diagnostycznego przy infekcjach dermatofitami, gatunkowo charakterystycznego profilu enzymatycznego. Pomimo braku wykazania jednoznacznego wzorca enzymów możliwego do wykorzystania w identyfikacji, udało się ocenić jak kształtuje się aktywność enzymatyczna będąca kluczowym czynnikiem wirulencji grzybów. Stwierdziłem korelację pomiędzy wytwarzaniem keratynazy a infekcją dermatofitem niezależnie od gatunku i gospodarza infekcji, a także powiązanie aktywności elastazy z powstawaniem zmian chorobowych u ludzi.

Ważną częścią, prowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego, badań było odwzorowanie filogenezy cząsteczki ITS dermatofitów. Dotychczas w literaturze naukowej temat ten podejmowany był sporadycznie ze względu na niewielką dostępność sekwencji ITS izolatów klinicznych w bazach danych. Wykazałem, że szczepy kliniczne różnych gatunków dermatofitów tworzą monofiletyczne grupy z gatunkami referencyjnymi, zgodnie z przeprowadzoną identyfikacją, o wysokich współczynnikach poparcia gałęzi. Dodatkowo, wszystkie uzyskane sekwencje ITS umieściłem w bazach, otrzymując numery dostępne, celem zwiększenia zasobu informacji do dalszych badań dotyczących historii ewolucyjnej dermatofitów.

V. Bibliografia

Aktas E, Yigit N. Hemolytic activity of dermatophytes species isolated from clinical specimens. *J Mycol Med.* 2015; **25**:e25-30.

Barry I, Hainer MD. Dermatophyte infection. *Am Fam Physician* 2003; **67**: 101-109.

Beguin H, Pyck N, Hendrickx M, Planard C, Stuble D, Detandt M. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited a multigene phylogenetic approach. *Med Mycol* 2012; **50**: 871–882.

- Bloch M, Cavignaux R, Debourgogne A, Dorin J, Machouart M, Contet-Audonneau N. From guinea pig to man: Tinea outbreak due to *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae* in pet shops in Nancy (France) *Journal de Mycologie Médicale* 2016; **26**: 227-232.
- Brillowska-Dąbrowska, A., Saunte, DM., Arendrup, MC. Five-Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 1200-1204.
- Cafarchia C, Romito D, Capelli G, Guillot J, Otranto D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis tinea corporis*. *Vet Dermatol* 2006; **17**: 327-331.
- Cafarchia C, Figueredo LA, Coccioli C, Figueredo LA, Circella E, Danesi P, Capelli D, Otranto D. Enzymatic activity of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. *Mycoses* 2011; **55**: 45-49.
- Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Gräser Y, Otranto D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol.* 2013; **20**: 336-351.
- Cano J, Rezusta A, Solé M, Gil J, Rubio MC, Revillo MJ, Guarro J. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. *J Dermatol Sci.* 2005; **39**:17-21.
- Courtellemont L, Chevrier S, Degeilh B, Belaz S, Gangneux JP, Gangneux F. Epidemiology of *Trichophyton verrucosum* infection in Rennes University Hospital, France: A 12-year retrospective study. *Med Mycol* 2017; **55**: 720-724.
- Czaika V, Lam P. *Trichophyton mentagrophytes* cause underestimated contagious zoophilic fungal infection. *Mycoses* 2013; **56**: 33-37.
- da Costa FV, Farias MR, Bier D, de Andrade CP, de Castro LA, da Silva SC, Ferreiro L. Genetic variability in *Microsporum canis* isolated from cats, dogs and humans in Brazil. *Mycoses.* 2013; **56**:582-588.
- de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. In: Hoog GS (ed), *Hyphomycetes: Explanatory Chapters, and Keys to the genera*. Utrecht: Centralbureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira i Virgili, 2000: 968-970.

- de Baere, T., Summerball, R., Theelen, B., Boekhout, T., Vaneechoutte, M. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 48-54.
- Didehdar M, Khansarinejad B, Amirrajab N, Shokohi T. Development of a high-resolution melting assay for rapid and high-throughput identification of clinically important dermatophyte species. *Mycoses* 2016; **59**: 442-449.
- Dobrowolska A, Debska J, Kozłowska M, Staczek P. Strains differentiation of *Microsporum canis* by RAPD analysis using (GACA)₄ and (ACA)₅ primers. *Pol J Microbiol.* 2011; **60**:145-148.
- Elavarashi E, Kindo AJ, Rangarajan S. Enzymatic and non-enzymatic virulence activities of dermatophytes on solid media. *J Clin Diagn Res* 2017; **11**: 23-25.
- Elavarashi, E., Kindo, A.J., Kalyani, J. Optimization of PCR RFLP Directly from the Skin and Nails in Cases of Dermatophytosis. Targeting the ITS and the 18S Ribosomal DNA Regions. *J Clin Diagn Res* 2013; **7**: 646-651.
- Elewski B. Tinea capitis: a current perspective. *J Am Acad Dermatol* 2010; **42**: 1-20.
- Faggi, E., Pini, G., Campisi, E., Bertellini, C., Difonzo, E., Manciat, F. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 3382-3385.
- Gnat S, Nowakiewicz A, Łagowski D, Trościańczyk A, Zięba P. Multiple-strain infection of *Trichophyton mentagrophytes* in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med Mycol* 2018; in press
- Gnat S, Małek W, Oleńska E, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M, Rogalski J, Wójcik M. Multilocus sequence analysis supports the taxonomic position of *Astragalus glycyphyllos* symbionts based on DNA-DNA hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; **66**:1906-1912.
- Graser, Y., el Fari, M., Presber, W., Sterry, W., Tietz, H.J. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol* 1998; **138**: 576-582.

- Graser Y, El Fari M, Vilgalys R, Kujipers AF, De Hoog GS, Presber P, Tietz H. Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence of the ribosomal ITS region. *Med Mycol* 1999; **37**: 105-114.
- Graser Y, De Hoog S, Summerbell RC. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med Mycol*. 2006; **44**: 199-209.
- Graser Y, Scott J, Summerbell R. The new species in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia* 2008; **166**: 239-256.
- Gupta AK, Versteeg SG, Shear NH. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. *J Cutan Med Surg* 2017; **21**: 525–539.
- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008; **51**: 2-15.
- Jankowski M, Charemska A, Czajkowski R. Swimming pools and fungi: An epidemiology survey in Polish indoor swimming facilities. *Mycoses* 2017; **60**: 736-738.
- Kac G. Molecular approaches to the study of dermatophytes. *Med Mycol* 2000; **38**: 329-336.
- Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiological agent of dermatophytosis. *J Dermatol Sci* 2004; **34**: 35-48.
- Kanbe TY, Suzuki A, Kamiya T, Mochizuki M, Kawasaki M, Fujihiro A, Kikuchi A. Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *J Dermatol Sci* 2003; **33**: 41-54.
- Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takashari K, Tsujimoto H, Hasegawa A. Molecular analysis of chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences of *Trichophyton mentagrophytes* complex and *T. rubrum*. *Curr Microbiol*, 1998: **37**: 236-239.
- Kano R, Aihara S, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A. Chitin synthase 1 (Chs1) gene sequences of *Microsporum equinum* and *Trichophyton equinum*. *Vet Microbiol* 2001; **78**: 85-90.

- Kano R. Chitin synthase (CHS) gene analysis of dermatophytes. *Rev Japan* 2004; **45**:47-53.
- Kupsch C, Ohst T, Pankewitz F, Nenoff P, Uhrlaß S, Winter I, Gräser Y. The agony of choice in dermatophyte diagnostics-performance of different molecular tests and culture in the detection of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *Clin Microbiol Infect* 2016; **22**: 735.e11-7
- Krawczyk B, Samet A, Leibner J, Śledzińska A, Kur J. Evaluation of a PCR melting profile technique for bacterial strain differentiation. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2327-2332.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 2016; **33**:1870-1874.
- Lakshmipathy DT, Kannabiran K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. *Nat Sci* 2010; **2**: 726–731.
- Leibner-Cisak J, Dobrowolska A, Krawczyk B, Kaszuba A, Stacek P. Evaluation of a PCR melting profile method for intraspecies differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 185-192.
- Liu DI, Coloe S, Baird R, Pederson J. Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 471.
- Liu DI, Pearce G, Lilley S, Coloe R, Baird J, Pederson J. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. *J Med Microbiol* 2002; **51**, 117-122.
- Martinez DA, Oliver BG, Graser Y, Goldberg JM, Li W. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. *mBio* 2012; **3**: e00259-12.
- Mesquita JR, Vasconcelos-Nobrega C, Oliveira J, Coelho C, Vala H, Fratti M, Arabatzis M, Velegaki A, Michel M. Epizootic and epidemic dermatophytose outbreaks caused by *Trichophyton mentagrophytes* from rabbits in Portugal. *Mycoses* 2016; **59**: 668-673.
- Ming PX, Ti YL, Bulmer GS. Outbreak of *Trichophyton verrucosum* in China transmitted from cows to humans. *Mycopathologia* 2006; **161**: 225–228.

- Moretti A, Boncio L, Pasquali P. Epidemiological aspects of dermatophyte on infections in horses and in cattle. *J Vet Med* 1998; **45**: 205-208.
- Neji S, Trabelsi H, Hadrich I, Cheikhrouhou F, Sellami H, Makni F, Ayadi A. Molecular characterization of strains of the *Trichophyton verrucosum* complex from Tunisia. *Med Mycol*. 2016; **54**: 787-793.
- Nenoff P, Herrmann J, Graser Y. *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale?* A dermatophyte in the course of time. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007; **5**: 198-202.
- Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, Martiny D, Vanderberg O, Detandt N. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol* 2013; **51**, 580–585.
- Pasquetti M, Min ARM, Scacchetti S, Dogliero A, Peano A. Infection by *Microsporum canis* in Paediatric Patients: A Veterinary Perspective. *Vet Sci* 2017; **19**: 4(3).
- Petinataud D, Berger S, Ferdynus C, Debourgogne A, Contet-Audonneau N, Machouart M. Optimising the diagnosis strategy for onychomycosis from sample collection to FUNGAL identification evaluation of a diagnostic kit for real time PCR. *Mycoses* 2016; **59**: 304-311.
- Rezusta A, Fuente S, Gilbarte Y, Vidal-Garcia M, Alcalá L, Lopez-Calleja A, Ruiz MA, Revillo MJ. Evaluation of incubation time for dermatophytes cultures. *Mycoses* 2016; **59**: 416-418.
- Schaufuss P, Steller U. Hemolytic activities of *Trichophyton* species. *Med Mycol* 2003; **41**: 511-516.
- Shafiee S, Khosravi AR, Ashrafi Tamai I. Comparative study of *Microsporum canis* isolates by DNA fingerprinting. *Mycoses* 2014; **57**(8):507-12.
- Sharma A, Chandra S, Sharma M. Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. *Mycoses* 2011; **55**: 410–415.
- Sharma V, Kumawat TK, Seth R, Chandra S. Dermatophytes; diagnosis of dermatophytosis and its treatment. *Afr J Microbiol Res* 2015; **9**: 1286-1293.

- Shin JH, Sung JH, Park SJ, Kim JA, Lee JH, Lee DY, Lee ES, Yang JM. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme analysis. *J Am Acad Dermatol* 2003; **48**: 857-865.
- Sterry W, Burgdorf W, Paus R. Ralf Pause checkliste dermatologie: venerologie, allergologie, phlebologie, andrologie. Stuttgart New York: Thieme, 2010. 6. Auflage.
- Takeda K, Mochizuki J, Izumi K, Sakata Y, Ushigami T, Nishibu A, Anzawa K, Mochizuki T. Polyclonality of *Trichophyton rubrum* isolates in a dermatophytosis patient with multiple lesions. *Med Mycol* 2016; **57**: 17-20.
- Veraldi S, Guanziroli E, Schiandchi R. Epidemic of *tinea corporis* due to *Trichophyton mentagrophytes* of rabbit origin. *Pediatr Dermatol* 2012; **29**: 392-393.
- Vermout S, Baldo A, Tabart J, Losson B, Mignon B. Secreted dipeptidyl peptidases as potential virulence factors for *Microsporum canis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; **54**: 299-308.
- Watanabe J, Anzawa K, Mochizuki T. Molecular Epidemiology of Japanese Isolates of *Microsporum canis* Based on Multilocus Microsatellite Typing Fragment Analysis. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2017; **70**: 544-548.
- Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995; **8**: 240-259.
- Zhang H, Ran Y, Liu Y. *Arthroderma vanbreuseghemii* infection in three family members with kerion and tinea corporis. *Med Mycol* 2009; **47**: 539-544.
- Ziółkowska G, Nowakiewicz A, Gnat S, Trościańczyk A, Majer-Dziedzic B, Zieba P. Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses* 2015; **58**: 118-126.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

Studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie ukończyłem w 2009 roku obroną pracy magisterskiej. W tym samym roku zostałem zatrudniony na stanowisku starszego referenta inżynierijno-technicznego w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (obecna nazwa Zakład Genetyki i Mikrobiologii) Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie. Od początku pracy na Wydziale Biologii i Biotechnologii,

oprócz pracy inżyniersko-technicznej, realizowałem moje zainteresowania naukowe, które były skoncentrowane na szeroko pojętej diagnostyce i taksonomii bakterii, zwłaszcza bakterii brodawkowych. Od początku pracy naukowej szczególnie interesujące były dla mnie zagadnienia związane z rozwojem i stosowaniem nowoczesnych, molekularnych technik diagnostycznych, identyfikacyjnych i klasyfikacyjnych, które starałem się wedle możliwości wprowadzać do własnego warsztatu pracy laboratoryjnej. W roku 2012 podjąłem zatrudnienie w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie na stanowisku asystenta. Wówczas, nie rezygnując z prowadzenia rozpoczętych badań na UMCS, podjąłem się analizy drugiego istotnego problemu, jakim była oporność drobnoustrojów na antybiotyki, chemioterapeutyki oraz inne czynniki przeciwdrobnoustrojowe. Jednocześnie realizowałem badania, pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Małek w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS, skupione na molekularnej identyfikacji izolatów bakterii brodawkowych, które zakończyłem przygotowaniem rozprawy doktorskiej. W tamtym okresie, szczególnie zainteresowałem się również tematyką rozwoju metod diagnostyki dermatofitów, zwłaszcza technik molekularnych, które to badania realizuję do dnia dzisiejszego. Od wielu lat uczestniczę czynnie lub biernie w sympozjach, konferencjach oraz szkoleniach dotyczących zagadnień związanych z tą tematyką. Moje badania naukowe, obejmujące liczne gatunki dermatofitów, związane są nie tylko z ich diagnostyką, ale także lekoopornością, zjadliwością oraz patogenezą i epidemiologią wywoływanych przez nie zakażeń. Badania te prowadzę od lat w ścisłej współpracy z klinicystami i terenowymi lekarzami weterynarii zajmującymi się chorobami zakaźnymi zwierząt różnych gatunków. Doświadczenie naukowe zdobyte w trakcie pracy badawczej i diagnostycznej jest mi niezwykle przydatne w prowadzeniu zajęć dydaktycznych z zakresu mikrobiologii weterynaryjnej dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie.

a) Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora:

Od początku pracy naukowo-badawczej moje zainteresowania koncentrowały się na szeroko pojętej diagnostyce mikrobiologicznej, a szczególnie wokół zagadnień wielokierunkowej taksonomii drobnoustrojów, a także określaniu koncepcji i definicji gatunku bakteryjnego. W pracy laboratoryjnej zajmowałem się charakterystyką fizjologiczną i biochemiczną drobnoustrojów, jak również wykorzystywałem techniki molekularne do genotypowania i określania pokrewieństwa filogenetycznego bakterii. Poznałem i stosowałem programy

komputerowe do analizy stopnia pokrewieństwa bakterii w oparciu o nukleotydowe sekwencje genów oraz oceniające podobieństwo mikroorganizmów metodami markerów molekularnych.

Moje prace badawcze miały na celu określenie właściwości fenotypowych, genomowych i ustalenie relacji filogenetycznych mikrosymbiontów dziko rosnącej rośliny bobowatej *Astragalus glycyphyllos* (traganek szerokolistny) pochodzących z Polski. Wykonana w pierwszej kolejności analiza numeryczna 102 cech fenotypowych, 28 izolatów z brodawek korzeniowych traganek szerokolistnego, wykazała, że tworzą one wspólną grupę z przedstawicielami bakterii rodzaju *Mesorhizobium*. Na dendrogramie przedstawiającym stopień podobieństwa fenotypowego bakterii, wszystkie mikrosymbionty *Astragalus glycyphyllos* oraz bakterie rodzaju *Mesorhizobium* tworzyły wspólny fenon przy współczynniku podobieństwa 76%, co świadczy o wysokim stopniu podobieństwa fenotypowego mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos* i bakterii rodzaju *Mesorhizobium*.

W celu ustalenia pozycji rodzajowej badanych bakterii wykonałem analizę porównawczą sekwencji nukleotydowych genu 16S rRNA, wybranych mikrosymbiontów *A. glycyphyllos* i odpowiednich sekwencji nukleotydowych szczepów referencyjnych. Sekwencje 16S rDNA badanych mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos* były podobne między sobą w 95- 99%, zaś ich stopień podobieństwa do sekwencji 16S rDNA różnych gatunków rodzaju *Mesorhizobium* mieścił się w granicach 95- 97%. Zgodnie z przyjętymi zasadami klasyfikacji bakterii do rodzaju, ryzobia specyficzne dla *Astragalus glycyphyllos* zostały przydzielone do rodzaju *Mesorhizobium*. Przynależność bakterii specyficznych dla *A. glycyphyllos* do rodzaju *Mesorhizobium* potwierdziłem w oparciu o analizę fragmentów restrykcyjnych 16S rDNA (RFLP-16S rDNA).

Do konstrukcji filogramów obrazujących relacje filogenetyczne mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos* do znanych gatunków bakterii brodawkowych wykorzystałem metodę największej wiarygodności (ML, ang. maximum likelihood), w której bazuje się na najbardziej odpowiednim modelu ewolucji, dopasowanym do analizowanych sekwencji DNA. Otrzymany filogram genu 16S rRNA wskazał, że organizmami najbliższymi filogenetycznie do symbiontów *Astragalus glycyphyllos* są bakterie rodzaju *Mesorhizobium*, z którymi badane izolaty z brodawek korzeniowych *A. glycyphyllos* utworzyły wspólną monofiletyczną grupę przy współczynniku poparcia (bootstrap) 95%. Jednocześnie sekwencje te wykazały największe podobieństwo do sekwencji genu 16S rRNA przedstawicieli rodzaju

Mesorhizobium (98-99%). Na drzewie filogenetycznym badane izolaty utworzyły wspólną grupę z bakteriami rodzaju *Mesorhizobium*.

W identyfikacji i różnicowaniu bakterii, w tym także bakterii brodawkowych, bardzo ważne miejsce zajmują metody molekularne oparte na analizie polimorfizmu genomowego DNA. W analizie stopnia zróżnicowania genomowego symbiontów *Astragalus glycyphyllos* w oparciu o analizę numeryczną profili ich DNA uzyskanych metodami RAPD, ERIC oraz AFLP wyodrębniłem 25 genomotypów. Tylko 3 szczepy wykazały identyczne profile DNA, co może sugerować, że reprezentują one ten sam klon bakteryjny lub użyte metody mają zbyt niską rozdzielczość aby wykazać ich zróżnicowanie genomowe.

Pomimo szeroko uznawanej wiarygodności 16S rDNA jako markera filogenetycznego, określanie pokrewieństwa mikroorganizmów prokariotycznych wyłącznie na podstawie sekwencji tego jednego genu może być obarczone błędem, głównie ze względu na możliwość zachodzenia procesu horyzontalnego transferu genów. Z tych powodów w analizie filogenetycznej bakterii, poza 16S rDNA, wykorzystuje się obecnie dodatkowo inne markery molekularne, tj. geny metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping genes), np. *dnaK*, *atpD*, *recA*, *rpoB*, *glnA*, *gyrB*, które charakteryzują się większą siłą różnicowania niższych taksonów, tj. gatunków i podgatunków. Analiza porównawcza sekwencji nukleotydowych wszystkich włączonych do analizy genów rdzeniowych, potwierdziła ustalone, w oparciu o sekwencję 16S rDNA, pokrewieństwo filogenetyczne badanych izolatów z bakteriami rodzaju *Mesorhizobium*. Również na podstawie analizy MLSA (ang. multi-locus sequence analysis) można stwierdzić, że ewolucyjnie najbliższymi „krewnymi” izolatów z brodawek korzeniowych traganka szerokolistnego są, odpowiednio, *Mesorhizobium amorphae* ACCC19665 (87- 88% identyczności sekwencji), *Mesorhizobium septentrionale* SDW014 (93- 94% identyczność sekwencji) i *Mesorhizobium ciceri* USDA3378 (86- 90% identyczność sekwencji).

Jednym ze współczesnych standardów niezbędnych dzisiaj do określenia nowego gatunku bakteryjnego jest stopień podobieństwa DNA-DNA oznaczony metodą hybrydyzacji. Uzyskane wyniki wskazały na wysoki stopień reasocjacji między DNA pochodzącym z różnych mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos*, co świadczy o ich przynależności do tego samego genomogatunku. Stopień hybrydyzacji DNA-DNA tych szczepów zawierał się w przedziale 86.6- 98.6%. Wysoki stopień reasocjacji, tj. 77.5 – 83.3% stwierdziłem między DNA izolatów z brodawek korzeniowych *Astragalus glycyphyllos* a DNA *Mesorhizobium amorphae* ICMP15022. Na tej podstawie można stwierdzić, że symbionty specyficzne dla traganka

szerokolistnego należą do genomogatunku *Mesorhizobium amorphae*. Z kolei zawartość zasad G+C w genomowym DNA wybranych mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos* zawierała się w przedziale 59,39- 62,11mol%. Na podstawie uzyskanych informacji stwierdziłem, że zawartość G+C w genomowym DNA symbiontów specyficznych dla traganka szerokolistnego mieściła się w zakresie typowym dla bakterii brodawkowych z rodzaju *Mesorhizobium* wynoszącym 59-64 mol%.

Molekularna filogeneza genów symbiotycznych (*sym*) ryzobiów stanowi dopełnienie ich wielokierunkowej charakterystyki. Geny symbiotyczne to tzw. geny adaptatywne, a ich produkty służą utworzeniu symbiozy z gospodarzem roślinnym. W wielu przypadkach historia ewolucyjna genów symbiotycznych ryzobiów jest niezależna od tej, jaką wykazują geny rdzeniowe. W badaniach genealogii ryzobiów specyficznych dla *Astragalus glycyphyllos* jako markery symbiotyczne wybrałem: gen *nodA*, *nodC*, *nodD* i *nodH*. Na filogramach wszystkich badanych genów *nod*, ryzobia specyficzne dla *Astragalus glycyphyllos* tworzyły monofiletyczne grupy z wszystkimi włączonymi do analizy bakteriami rodzaju *Mesorhizobium* przy wysokich wartościach współczynnika „bootstrap”. Generalnie, filogeneza wspólnych genów *nod*, tj. *nodA*, *nodC* i *nodD* mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos* była podobna do filogenezy ich genów rdzeniowych, co wskazuje na ich koewolucję.

Jednym z etapów ustalenia pełnej genealogii bakterii brodawkowych jest także analiza sekwencji genów *nif*, dostarczających informacji o relacjach między ryzobiami a innymi bakteriami diazotroficznymi. Historię ewolucyjną nitrogenazy określa się najczęściej na podstawie sekwencji genu *nifH* kodującego jej podjednostkę zwaną reduktazą nitrogenazy. Na drzewie filogenetycznym genu *nifH*, mikrosymbionty *Astragalus glycyphyllos*, o stopniu podobieństwa sekwencji tego genu 88-100%, utworzyły wspólną grupę o współczynniku poparcia wynoszącym 96% i duże, monofiletyczne grono (współczynnik poparcia 89%) ze wszystkimi włączonymi do analizy bakteriami rodzaju *Mesorhizobium*. Historia ewolucyjna genu *nifH* symbiontów *Astragalus glycyphyllos* była zgodna z filogenezą genu 16S rRNA i innych konserwatywnych genów rdzeniowych, a także z filogenezą genów symbiotycznych *nod*. Przeprowadzone badania pozwalały stwierdzić, że droga ewolucyjna symbiotycznej i niesymbiotycznej części genomu badanych bakterii była zgodna, i że na jej przebieg nie miał wpływu międzyrodzajowy transfer genów.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w następujących publikacjach:

- **Gnat S**, Wójcik M, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M, Ptaszyńska A, Małek W. Phenotypic characterization of *Astragalus glycyphyllos* symbionts and their phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK INTERNATIONAL JOURNAL OF GENETICS AND MOLECULAR MICROBIOLOGY, 2014; 105: 1033-1048; doi: 10.1007/s10482-014-0163-y. IF: 1,806; MNiSW: 20 pkt.
- **Gnat S**, Małek W, Oleńska E, Trościańczyk A, Wdowiak Wróbel S, Kalita M, Wójcik M. Insight into the genomic diversity and relationship of *Astragalus glycyphyllos* symbionts by RAPD, ERIC-PCR, and AFLP fingerprinting. JOURNAL OF APPLIED GENETICS, 2015; 56: 551-554; doi: 10.1007/s13353-015-0285-6. IF: 1,929; MNiSW: 20 pkt.
- **Gnat S**, Małek W, Oleńska E, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M, Łotocka B, Wójcik M. Phylogeny of symbiotic genes and the symbiotic properties of rhizobia specific to *Astragalus glycyphyllos* L. PLOS ONE, 2015; 10(10):e0141504; doi:10.1371/journal.pone.0141504. IF: 3,057; MNiSW: 40 pkt.
- **Gnat S**, Małek W, Oleńska E, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M, Rogalski J, Wójcik M. Multilocus sequence analysis supports taxonomic position of *Astragalus glycyphyllos* symbionts based on DNA:DNA hybridization. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 2016; 66: 1906-1912; doi: 10.1099/ijsem.0.000862. IF: 2,134; MNiSW: 25 pkt.

Cykl publikacji został wyróżniony **Nagrodą Naukową II stopnia im. Prof. Edmunda Mikulaszka Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w 2016 roku.**

Uczestniczyłem również w badaniach dotyczących ustalania relacji filogenetycznych mikrosymbiontów dziko rosnącej rośliny bobowatej *Robinia pseudoacacia* (robinia akacjowa, grochodrzew biały) pochodzących z Polski i Japonii. W oparciu o analizę sekwencji nukleotydowych genów symbiotycznych *nodA* i *nodC*, zostało ustalone symbiotyczne pokrewieństwo izolatów z brodawek korzeniowych *R. pseudoacacia* z bakteriami reprezentującymi mikrosymbionty *Phaseolus* sp. oraz gatunkiem *Mesorhizobium amorphae*. Filogeneza genu *nifH* bakterii specyficznych dla grochodrzewu białego była zgodna z historią ewolucyjną genu 16S rRNA. Na drzewie filogenetycznym genu *nifH* badane izolaty tworzyły wspólne grono z bakteriami reprezentującymi rodzaj *Mesorhizobium*. Obecność genu *nodH*,

który koduje enzym sulfotransferazę, w genomie mikrosymbiontów *R. pseudoacacia*, może sugerować, że bakterie te produkują specyficzne, sulfonowane czynniki Nod niezbędne w symbiotycznych interakcjach z gospodarzem roślinnym. Spośród 14 badanych roślin, mikrosymbionty grochodrzewu białego tworzyły efektywne układy symbiotyczne jedynie z przedstawicielami rodzaju *Amorpha* sp. (*Amorpha fruticosa* i *Amorpha californica*) oraz własnym gospodarzem *R. pseudoacacia*. Analiza brodawek korzeniowych *R. pseudoacacia*, przy użyciu mikroskopu świetlnego i elektronowego, wykazała, że są to brodawki niezdeteminowane.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacji:

- Mierzwa B, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M, **Gnat S**, Małek W. Insight into the evolutionary history of symbiotic genes of *Robinia pseudoacacia* rhizobia deriving from Poland and Japan. ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, 2010; 192: 341-350; doi: 10.1007/s00203-010-0561-0. IF: 1,754; MNiSW: 20 pkt.

Ponadto, brałem udział w badaniach owadów należących do rodziny Pędrusiowate (Apionidae). Większość z nich to gatunki kosmopolityczne, a ich larwy żerują na roślinach uprawnych, ważnych z gospodarczego punktu widzenia. Klasyczna identyfikacja tej grupy owadów opiera się, przede wszystkim na cechach morfologicznych. W wielu przypadkach jest to niewystarczające ze względu na występowanie taksonów o podobnych fenotypach oraz gatunków bliźniaczych. Pozycja systematyczna i status wielu gatunków były niejasne i budziły wiele kontrowersji. Rozwiązaniem okazało się zastosowanie analizy filogenetycznej opartej na sekwencji specyficznych genów. Podstawowym celem wykonywanych badań stała się analiza zastosowania genu COI w taksonomii i systematyce wybranych gatunków owadów z rodziny Apionidae. Oznaczone sekwencje genu COI przedstawicieli 23 gatunków z 15 różnych rodzajów zostały porównane z dostępnymi w GenBanku sekwencjami COI. Wyniki uzyskane dla genu COI porównano z innymi, pochodzącymi z badania genów: mitochondrialnego, kodującego 16S rRNA oraz jądrowego, kodującego 18S rRNA. Relacje filogenetyczne otrzymane na podstawie statystycznej analizy sekwencji poszczególnych gatunków były zbliżone do morfologicznego systemu klasyfikacji Apionidae, z pewnymi wyjątkami, w obrębie plemienia Oxystomatini i rodzajach Ceratapion oraz Exapion. Jednym z osiągnięć pracy było również opracowanie metody izolacji DNA z przechowywanych od ponad 60-ciu lat okazów muzealnych i eksskatów.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacji:

- Ptaczyńska A, Łętowski J, **Gnat S**, Małek W. Application of COI sequences to study phylogenetic relationships among 40 Apionidae species (Coleoptera: Curculionoidea). JOURNAL OF INSECT SCIENCE, 2012; 12: 16; doi: 10.1673/031.012.1601. IF: 0,875; MNiSW: 30 pkt.

Ważne miejsce w moich osiągnięciach naukowych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora zajmuje współautorstwo publikacji przeglądowej. Zrealizowane zadanie stanowił opis strategii adaptacji bakterii, które pozwalają im przeżyć w hiper- i hiposmotycznych warunkach. Z fizycznego punktu widzenia, jednym z czynników środowiskowych wpływających na wzrost organizmów jest jego osmolarność. Wyższe ciśnienie osmotyczne wewnątrz komórki niż podłoża umożliwia komórce utrzymanie turgoru niezbędnego do jej wzrostu i podziału. Wyniki badań wskazują, że osmoadaptacja komórek bakterii indukowana jest akumulacją jonów K⁺, która zachodzi poprzez szybką aktywację systemów transportu o niskim i wysokim powinowactwie do K⁺. Związek między transportem jonów K⁺ u bakterii, a turgorem, wskazuje, że homeostatyczny mechanizm przywracania turgoru przy wzroście osmolarności podłoża wiąże się ze zwiększonym importem potasu.

Opisywana powyżej praca przeglądowa ma następujące wskaźniki bibliometryczne:

- Małek W, Wdowiak-Wróbel S, Targońska M, Kalita M, **Gnat S**. Osmoadaptacja i systemy transportu potasu w bakteriach Gram-ujemnych. POSTĘPY MIKROBIOLOGII 2012; 51: 93–98. IF: 0,207; MNiSW: 15 pkt.

b) Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia naukowego doktora:

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, w roku 2013 zostałem zatrudniony na etacie adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej UP w Lublinie. Od tej pory moja praca naukowa związana była z wieloma aspektami bakteriologii, mikologii i wirusologii weterynaryjnej, przy czym istotną jej część stanowiły badania dotyczące tematyki mechanizmów determinujących oporność drobnoustrojów, diagnostyki i patogenezы dermatofitoz u ludzi i zwierząt, a także zwierząt wolno żyjących jako istotnego ogniwa łańcucha epidemiologicznego większości zoonoz. W wielu przypadkach prowadzona przeze mnie działalność naukowa jest wynikiem współpracy krajowej oraz międzynarodowej.

Problematyka oporności klinicznej szczepów bakteryjnych izolowanych od zwierząt obejmuje niezwykle szeroką tematykę badawczą. Ze względu na duże prawdopodobieństwo bezpośredniego kontaktu i przenoszenia opornych szczepów pomiędzy zwierzętami

hodowlanymi a człowiekiem, stały się one najlepiej przebadanym w Europie i w Polsce rezerwuarem oporności zarówno pod względem drobnoustrojów wskaźnikowych, jak i zoonotycznych. Zagadnienie związane z występowaniem zjawiska oporności szczepów izolowanych od zwierząt wolno żyjących jest stosunkowo mało poznanym problemem. Dotychczas, w literaturze naukowej spotykane są jedynie pojedyncze doniesienia, także z Polski, dotyczące izolacji opornych szczepów *Escherichia coli* i bakterii z rodzaju *Salmonella* opornych na cefalosporyny. Z tego względu podjąłem się współudziału w opracowaniu koncepcji badań mających na celu określenie znaczenia epidemiologicznego potencjalnych rezerwuarów oporności, jakimi mogą być populacje zwierząt wolno żyjących. Wyniki uzyskanych badań potwierdziły wstępne przypuszczenia dotyczące nosicielstwa szczepów o fenotypie MRSA (ang. methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*) oraz ESBL (ang. extended-spectrum beta-lactamases) u lisów i kun oraz stosunkowo wysoki odsetek (10%) wielolekoopornych, przede wszystkim na tetracyklinę, chloramfenikol i kanamycynę, szczepów *E. coli* i znacznie niższy (3%) koagulazododatnich gatunków bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, głównie *S. aureus* i *S. pseudintermedius*. Zróżnicowany poziom lekooporności cechuje również populacje szczepów *Enterococcus* izolowanych od człowieka i różnych gatunków zwierząt, a nawet grup produkcyjnych. Prowadzony od szeregu lat monitoringowy program globalnej oceny poziomu oporności drobnoustrojów zoonotycznych i wskaźnikowych u zwierząt hodowlanych w krajach europejskich, od dwóch lat nie obejmuje danych odnośnie oporności *Enterococcus* spp. Pomimo prowadzonych intensywnych badań, analiza lekooporności *Enterococcus* w aspekcie molekularnego typowania epidemiologicznego, odzwierciedlającego rozprzestrzenianie się klonów o specyficznych profilach oporności, nadal wymaga opracowania specyficznych, powtarzalnych i łatwych do zastosowania narzędzi. W przeprowadzonych badaniach wyizolowano i określono przynależność gatunkową ponad 1100 szczepów z rodzaju *Enterococcus* spp. Badania koncentrowały się przede wszystkim na gatunkach *E. faecium* i *E. faecalis* ze względu na ich znaczenie epidemiologiczne. Wykazano, że w przypadku drobiu, świń i bydła, najczęściej notowanym typem oporności była oporność na erytromycynę i tetracyklinę oraz wysokie stężenie kanamycyny i streptomycyny (ang. HLKR i HLSR). U zwierząt wolno żyjących i egzotycznych dominowały natomiast szczepy odporne na fluorochinolony i rifampicynę. Dodatkowo, oznaczono izolaty odporne na tylozynę (pochodzące od świń) i wykazano, że cechowały się w każdym przypadku krzyżową opornością na erytromycynę, a z kolei oporności na enrofloksacynę towarzyszyła niewrażliwość na ciprofloksacynę. Natomiast brak oporności na wankomycynę w badanej puli szczepów pochodzących od zwierząt domowych związany był prawdopodobnie z zakazem stosowania w

krajach Unii Europejskiej awoparcyny jako promotora wzrostu u zwierząt. Ze względu wysokie znaczenie uzyskanych wyników badań, prace w tym zakresie są nadal kontynuowane i poszerzane o oznaczanie kolejnych istotnych klinicznie fenotypów oporności.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacjach:

- Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Zięba P, **Gnat S**, Markiewicz-Wojtanowicz K, Trościańczyk A. Coagulase positive Staphylococcus isolated from wildlife: Identification, molecular characterization and evaluation of resistance profiles with focus on a methicillin-resistant strain. *COMPARATIVE IMMUNOLOGY, MICROBIOLOGY AND INFECTION DISEASE*, 2016; 44: 21-28; doi: 10.1016/j.cimid.2015.11.003. IF: 1,875; MNiSW: 25 pkt.
- Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Zięba P, **Gnat S**, Trościańczyk A, Adaszek Ł. Characterization of multidrug resistant *E. faecalis* strains from pigs of local origin by ADSRRS-fingerprinting and MALDI -TOF MS; evaluation of the compatibility of methods employed for multidrug resistance analysis. *PLOS ONE*, 2017; 12(1): e0171160; doi:10.1371/journal.pone.0171160. IF: 2,806; MNiSW: 35 pkt.
- Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Trościańczyk A, Zięba P, **Gnat S**. Determination of antimicrobial resistance of *Enterococcus* strains isolated from pigs and their genotypic characterization by method of amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS fingerprinting). *JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*, 2017; 66:175–183; doi: 10.1099/jmm.0.000400. IF: 2,159; MNiSW: 20 pkt.
- Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Trościańczyk A, Zięba P, **Gnat S**. Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. *POULTRY SCIENCE*, 2017; 96: 986-996; doi: 10.3382/ps/pew365. IF: 1,908; MNiSW: 35 pkt.

W ostatnim czasie podjąłem również badania mające na celu określenie aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów roślinnych. Wyniki przeprowadzonych wstępnie analiz dla dziewięciu ekstraktów roślinnych wykazały obiecujące rezultaty w stosunku do kilku istotnych

klinicznie gatunków bakterii, tj. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*. Wyniki uzyskanych badań wskazały, że najwyższy stopień właściwości antybakteryjnych wykazały ekstrakty *Mentha x piperita* L., a tylko nieco węższe spektrum działania posiadały ekstrakty *Hypericum perforatum* L. Na drugim biegunie tej zależności znalazły się ekstrakty z *Achillea millefolium* L., które miały najniższe spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Wykonane badanie potwierdza, że wiele ekstraktów roślinnych wykazuje działanie przeciwbakteryjne *in vitro* i może zostać wykorzystanych terapeutycznie.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacji:

- **Gnat S**, Majer-Dziedzic B, Nowakiewicz A, Trościańczyk A, Ziółkowska G, Jesionek W, Choma I, Dziedzic R, Zięba P. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial pathogens isolated from faeces of red deer (*Cervus elaphus*). POLISH JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE, 2017; 20(4): 697–706; doi: 10.1515/pjvs-2017-0087. IF: 0,697; MNiSW: 20 pkt.

Kolejne zagadnienie będące w kręgu moich zainteresowań naukowych dotyczy zwierząt wolno żyjących, stanowiących potencjalny rezerwuar czynników patogennych dla człowieka i zwierząt domowych. W Polsce kompleksowe badania dotyczące tego zagadnienia zostały przeprowadzone jedynie fragmentarycznie i jedynym usankcjonowanym prawnie badaniem monitoringowym jest wykrywanie wirusa wścieklizny. Problematyka prowadzonych badań objęła kilka odrębnych rezerwuarów nosicieli, dla których określono wstępnie grupę badanych drobnoustrojów stanowiących potencjalne zagrożenie zoonotyczne. Największą badaną grupę stanowiły mięsożerne zwierzęta wolno żyjące, obejmujące najliczniej występujące w Polsce gatunki (lis rudy, kuna leśna i kuna domowa oraz szop pracz). Dodatkowym czynnikiem predysponującym do transmisji potencjalnych zakażeń poprzez aktywne rozprzestrzenianie drobnoustrojów bakteryjnych wynika z wysokiego potencjału migracyjnego tych gatunków zwierząt. Grupa ta została kompleksowo przeanalizowana w kierunku nosicielstwa bakterii z rodzaju *Salmonella* spp, *Yersinia* spp, *Listeria* spp i koagulazo dodatnich gatunków *Staphylococcus*, ze szczególnym uwzględnieniem czynników wirulencji determinujących patogenność poszczególnych szczepów. Drugą grupę badaną ograniczono do jednego gatunku dzikich przeżuwaczy, jakim był jeleń szlachetny. Obecnie prowadzona reintrodukcja tego gatunku budzi obawy zawleczenia, wraz ze zwierzęciem, potencjalnych patogenów mogących ulegać dalszym transmisjom międzyosobniczym. Grupa ta została oceniona w aspekcie nosicielstwa przede wszystkim enterokrwotocznych (EHEC) i enteropatogennych (EPEC)

patotypów *E. coli* oraz drobnoustrojów należących do rodzaju *Yersinia* spp. i *Listeria* spp. Kolejną specyficzną grupę badanych zwierząt stanowiły dwa gatunki żółwi, a mianowicie żółw stepowy, będący gatunkiem egzotycznym, powszechnym w hodowli terrariowej i żółw błotny jako jedyny gatunek żółwia naturalnie występujący w Polsce. Zwierzęta analizowane były przede wszystkim w aspekcie nosicielstwa pałeczek *Salmonella* będących przyczyną jednej z ważniejszych zoonoz w Polsce. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że zwierzęta bez względu na gatunek okazały się nosicielami potencjalnie patogennych bakterii. Szczególnie wysoki odsetek w nosicielstwie pałeczek *Salmonella* (18,8%- 11,7% w zależności od gatunku) przypadł gądom, ale również mięsożerne zwierzęta wolno żyjące stanowią równie istotny rezerwuuar tych bakterii (2,8% do 9,2% nosicieli pałeczek *Salmonella*, w zależności od gatunku). We wszystkich badanych grupach zwierząt wykazano również obecność *Listeria* spp., w tym *L. monocytogenes*, którą wyizolowano od 4,5% - 6,6% badanych zwierząt. W podobnej liczbie wyizolowano bakterie z gatunku *Yersinia enterocolitica*, która stanowi przyczynę 96% przypadków jersiniozy u ludzi. Jednakże, najliczniejszą grupę drobnoustrojów mogących stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego stanowiły drobnoustroje z gatunku *S. aureus*, które miały najwyższy, 12% udział w biocie przewodu pokarmowego zwierząt mięsożernych i co najważniejsze cechował je bardzo zróżnicowany i bogaty panel czynników wirulencji, w tym genów kodujących enterotoksyny i toksynę szoku toksycznego. Co ważne, w przypadku wszystkich grup zwierząt materiał badawczy stanowiły wymazy z prostnicy, lub kloaki oraz próbki kału. Wykazane w nich drobnoustroje patogenne zasiedlając końcowy odcinek przewodu pokarmowego mogą zostać łatwo wprowadzone do środowiska wraz z wydalaniem kałem, a stąd przeniesione na człowieka i inne gatunki zwierząt. Uwzględniając bogatą i zróżnicowaną pulę czynników wirulencji wykazaną w trakcie przeprowadzonych badań oraz łatwość kontaminacji środowiska, wydaje się że potencjał zoonotyczny drobnoustrojów izolowanych od zwierząt wolno żyjących i egzotycznych jest stosunkowo wysoki, a zaobserwowane zjawisko potwierdza celowość prowadzonych badań.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacjach:

- **Gnat S**, Trościańczyk A, Nowakiewicz A, Majer-Dziedzic B, Ziółkowska G, Dziedzic R, Zięba P, Teodorowski O. Experimental studies of microbial populations and incidence of zoonotic pathogens in the faeces in red deer (*Cervus elaphus*). LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, 2015; 61: 446-452; doi: 10.1111/lam.12471. IF: 1,579; MNiSW: 20 pkt.

- Nowakiewicz A, Zięba P, Ziółkowska G, **Gnat S**, Muszyńska M, Tomczuk K, Dziedzic B, Ulbrych L, Trościanczyk A. Free-Living Species of Carnivorous Mammals in Poland: Red Fox, Beech Marten, and Raccoon as a Potential Reservoir of *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* spp. and Coagulase-Positive *Staphylococcus*. PLOS ONE, 2016; 11, 5: e0155533; doi: 10.1371/journal.pone.0155533. IF 2,806; MNiSW: 35 pkt.
- Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Zięba P, Dziedzic B, **Gnat S**, Wójcik M, Dziedzic R, Kostruba A. Aerobic Bacterial Microbiota Isolated from the Cloaca of the European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) in Poland. JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES, 2015; 51(1): 255-259; doi: 10.7589/2013-07-157. IF: 1,189; MNiSW: 30 pkt.

Brałem również udział w badaniach metodycznych, których celem było zaprojektowanie techniki identyfikacyjnej LAMP do rozróżniania *Nosema apis* i *N. ceranae*. Było to rozwiązanie nowatorskie, opracowane na potrzeby prowadzonych badań. Zaprojektowane zostały wtedy startery do reakcji LAMP, dodatkowe startery „pętli”, przyspieszające reakcje oraz zoptymalizowano warunki przeprowadzenia reakcji LAMP specyficznej dla *N. apis* i *N. ceranae*. Technika ta umożliwia szybkie i bardzo czułe rozróżnienie tych dwu gatunków mikrosporydiów, bez konieczności zastosowania specjalistycznego sprzętu analitycznego. Do przeprowadzenia opisanej reakcji LAMP wystarczyła zwykła łaźnia wodna utrzymująca temperaturę reakcji na stałym poziomie. Poza tym czas reakcji LAMP był bardzo krótki, wyniki otrzymano już po 30 min, przy czym, dzięki zastosowaniu zaprojektowanych w badaniach trzech par starterów, była to reakcja wysoce specyficzna i ok. 10^3 czulsza od standardowego PCR. Opracowana podczas badań metoda LAMP była dobrą alternatywą dla standardowej techniki PCR. Identyfikacja DNA *N. apis* i *N. ceranae* odbywała się z wysoką czułością i specyficznością gatunkową. Dodatkowo, niskie koszty aparatury potrzebnej do izotermicznej amplifikacji DNA (łaźnia wodna lub blok grzejny) umożliwiły szybką detekcję nosemozy nawet przez małe laboratoria, wyposażone jedynie w stopniu podstawowym w aparaturę badawczą. Dlatego udział w tych badaniach uważam za istotne osiągnięcie aplikacyjne, a uzyskane wyniki stanowią duży, nowatorski wkład w udoskonalenie warsztatu badawczego i dają możliwość oceny skutków inwazji *N. ceranae* w Europie. Szybkie rozpoznanie problemu jest pierwszym krokiem do jego rozwiązania.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacji:

- Ptaszyńska A, Borsuk G, Woźniakowski G, **Gnat S**, Małek W. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 2014; 357(1): 40-48; doi: 10.1111/1574-6968.12521. IF: 2,121; MNiSW: 20 pkt.

W moje zainteresowania naukowe wpisuje się udział w badaniach mających na celu zidentyfikowanie i oznaczenie zróżnicowania wewnątrzgatunkowego izolatów gęsiich bakterii z rodzaju *Lactobacillus* za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF, metody ITS-PCR i ITS-RFLP. Wszystkie trzy zastosowane techniki okazały się cennymi narzędziami do identyfikacji pałeczek kwasu mlekowego i dały porównywalne wyniki. Spośród 104 badanych szczepów wyodrębniliśmy 14 różnych gatunków bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Dominującym gatunkiem był *L. salivarius* (35,6%), a następnie *L. johnsonii* (18,3%), *L. ingluviei* (11,5%) i *L. agilis* (7,7%). Technika MALDI-TOF umożliwiła szybką identyfikację gatunków pałeczek kwasu mlekowego przy minimalnej obróbce wstępnej. Jednakże, więcej niż jeden wiarygodny wynik identyfikacji został wskazany dla 11,5% badanych tą metodą szczepów (głównie gatunku *L. johnsonii*). Metodą ITS-PCR zostało wyodrębnionych 12 genotypów spośród izolatów, nie udało się wykazać różnic pomiędzy gatunkami *L. amylovorus* i *L. kitasatonis* oraz *L. paracasei*, *L. rhamnosus* i *L. zaeae*. Gatunki te zostały zróżnicowane za pomocą techniki ITS-RFLP przy użyciu enzymów restrykcyjnych *TaqI* i *MseI*. Uzyskane wyniki wskazały, że testy ITS-PCR i ITS-RFLP mogą być stosowane nie tylko do identyfikowania gatunkowego, ale także do typowania wewnątrzgatunkowego.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacji:

- Dec M, Urban-Chmiel R, **Gnat S**, Puchalski A, Wernicki A. Identification of *Lactobacillus* strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. RESEARCH IN MICROBIOLOGY, 2014; 165(3): 190-201; doi: 10.1016/j.resmic.2014.02.003. IF: 2,705; MNiSW: 25 pkt.

W ramach zainteresowań wirusologicznych brałem udział w badaniu porównawczym wykorzystania różnych linii komórkowych *in vitro* do hodowli bydłowego syncytialnego wirusa układu oddechowego (BRSV). W badaniu tym zastosowano szczep BRSV375 i wymazy z nosa

otrzymane od cieląt rasy simentalskiej. Hodowlę przeprowadzano na następujących liniach komórkowych: komórkach nerki bydłowej (LLC-PK1), komórkach tchawicy bydłowej (TBTR) i pierwotnych komórkach zarodkowych kurzych (CER). Porównawcza analiza zmian została przeprowadzona przy użyciu testu aglutynacji z erytrocytami ludzkimi i erytrocytami bydła. Obecność BRSV we wszystkich liniach komórkowych potwierdzono metodą RT-PCR. Syncytialne zmiany odnotowano po 4-dniowej inkubacji. Początkowo obserwowany efekt cytopatyczny następował 24 godziny po zakażeniu. Zaobserwowano adaptację wirusa do infekcji komórek innych niż komórki tchawicy po 3 pasażach. Najwyższe miano wirusa uzyskano przy użyciu linii TBTR. Miano uzyskane w hodowlach LLC-PK1 i CER kształtowało się na poziomie statystycznie istotnie niższym.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacji:

- Urban-Chmiel R, Wernicki A, Majer-Dziedzic B, **Gnat S**, Puchalski A, Dec M. Use of different cell lines for in vitro cultures of bovine respiratory syncytial virus. *JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS*, 2014; 204: 62–64; doi: 10.1016/j.jviromet.2014.04.003. IF: 1,781; MNiSW: 20 pkt.

Temat badawczy, którym zainteresowałem się w ostatnim czasie dotyczy liczebności i składu drobnoustrojów występujących w żwaczu. Przeżuwacze to grupa zwierząt, które przetwarzają i przyswajają swoje jedzenie w wyjątkowy sposób. Funkcjonowanie ich przewodu pokarmowego jest ściśle związane z mikroorganizmami, a dodatkowo istnieją doniesienia o szczególnym ich wpływie na procesy fizjologiczne zachodzące w organizmie zwierząt i na ich ogólny stan zdrowia. Mikrobiologiczne badanie ekologii mikrobioty żwacza jest utrudnione z powodu braku selektywnych pożywek wzrostowych, a także trudności w izolowaniu bakterii *in vitro* i ich dokładnej identyfikacji. Koncepcja badań, które zaplanowałem, miała na celu ocenę wpływu spożywanego przez jelenie (*Cervus elaphus*) pokarmu na różnorodność mikroflory ich żwacza. Wybrałem dwa okresy badania, jesienny, kiedy dieta zwierząt składa się wyłącznie z naturalnie występujących roślin, a także zimowy, po wprowadzeniu żywienia uzupełniającego, w tym specjalnie przygotowanej paszy. Badanie wykazało, że u jeleni, które w okresie zimowym nie otrzymywały paszy, a ich dieta opierała się tylko na naturalnych składnikach roślinnych, obfitość flory bakteryjnej znacznie się zmniejszyła w porównaniu z florą żwacza oznaczoną jesienią. Z kolei u zwierząt, które otrzymywały w zimie paszę, której skład i wartość kaloryczna były znaczące, liczebność mikroorganizmów nie tylko się utrzymała, ale nawet statystycznie istotnie zwiększyła w

porównaniu z okresem jesiennym. Podsumowując wyniki badania, wykorzystując wysokokaloryczną, zróżnicowaną paszę w zimowym dokarmianiu jeleni, można wpływać na ekosystem ich żwacza, co bezpośrednio przyczynia się do poprawy wydajności trawienia i ogólnego stanu zdrowia zwierząt.

Wyniki opisywanych powyżej badań przedstawiono w publikacji:

- **Gnat S**, Dziedzic R, Nowakiewicz A, Zieba P, Trościańczyk A, Majer-Dziedzic B, Ziółkowska G, Beeger S, Wójcik M. Effect of balanced supplementary feeding in winter on qualitative and quantitative changes in the population of microbes colonizing the rumen of red deer. *MEDYCYNA WETERYNARYJNA- VETERINARY MEDICINE- SCIENCE AND PRACTICE*, 2018; 74(2): 119-124; doi: 10.21521/mw.6072. IF: 0,161; MNiSW: 15 pkt.

Plany naukowe na najbliższą przyszłość

Prace badawcze zaplanowane do realizacji w najbliższym czasie obejmują analizę bioróżnorodności genetycznej i właściwości determinujących patogenezę dermatofitów zoofilnych ze szczególnym uwzględnieniem *T. verrucosum* i *M. canis*, jako przedstawicieli najczęściej pojawiających się grzybic powierzchniowych o etiologii zwierzęcej u ludzi w Europie. Do badań porównawczych zamierzam włączyć izolaty pochodzące z innych krajów, przede wszystkim z Włoch i Turcji, pozyskane w ramach nawiązanej współpracy międzynarodowej.

W najbliższej przyszłości, po zakończeniu analizy uzyskanych wyników, przedstawię również pracę dotyczącą wyznaczenia zakresu gospodarza szczepów klinicznych *T. verrucosum* na podstawie aktywności keratynolitycznej. Realizacja tego zadania odbywa się w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki „MINIATURA”. Badanie to zamierzam następnie rozszerzyć na inne gatunki dermatofitów, a także podjąć próbę wskazania czynnika prognostycznego transmisji infekcji pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt i ludźmi. Ciekawym zagadnieniem do realizacji jest oznaczenie wrażliwości infekcyjnej na dermatofity zoofilne różnych ras ludzkich, grup wiekowych i płci. Podstawę do tego badania może stanowić aktywność keratynolityczna grzybów, będąca uniwersalnym czynnikiem wirulencji wszystkich dermatofitów.

Jeden z ważniejszych tematów badawczych podejmowanych w moich obecnych badaniach stanowi antybiotykooporność dermatofitów zoofilnych. Zjawisko jest coraz powszechniej obserwowane u izolatów klinicznych, a jego następstwem jest utrudnione prowadzenie i obniżona skuteczność leczenia. Problemem w doborze leków jest niska użyteczność w badaniach dermatofitów dostępnych obecnie metod wyznaczania wartości stężeń terapeutycznych MIC (ang. minimal inhibitory concentration). Z tego powodu podjąłem próbę opracowania i wystandardyzowania metody „cylinderkowej” do oznaczania wartości MIC dla szczepów klinicznych dermatofitów.

Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- autorstwo lub współautorstwo w 23 oryginalnych pracach badawczych i 1 artykule przeglądowym opublikowanych w czasopismach znajdujących w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) oraz 26 komunikatów konferencyjnych, z których 10 prezentowanych było na konferencjach międzynarodowych;
- sumaryczny *Impact Factor* (IF) wszystkich opublikowanych prac wynosi 44,328, liczba punktów według listy MNiSW to 615, a *indeks Hirscha* 6; liczba cytowań według bazy *Web of Science Core Collection* wynosi 90, a bez autocytowań 77;
- recenzje manuskryptów prac dla redakcji czasopism naukowych: *Veterinary Research* (IF: 1.99), *Microbiology Open* (IF: 2.747), *Journal of Environmental Quality* (IF: 2.987), *Current Genetics* (IF: 3.764);
- udział jako główny wykonawca lub wykonawca w dwóch zrealizowanych projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), a także kierowanie jednym projektem badawczym NCN i trzykrotnie grantem przyznany przez Prorektora UP w Lublinie d/s Nauki, Wdrożeń i Współpracy Międzynarodowej;
- przygotowanie jednej ekspertyzy na zamówienie;
- współpracę z ośrodkiem naukowym we Włoszech, w ramach której odbyłem staż naukowy na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Pizie;
- wygłoszenie wykładu konferencyjnego na zaproszenie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Stambule.

Zestawienie liczbowe dorobku naukowego z uwzględnieniem punktacji MNiSW oraz współczynnika wpływu (Impact Factor, IF)

	Liczba publikacji	Punktacja MNiSW*	Impact Factor**
Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	5	145 pkt.	11,159
Dorobek naukowy przed osiągnięciem stopnia naukowego dr	7	170 pkt.	11,762
Dorobek naukowy po osiągnięciu stopnia naukowego dr	12	300 pkt.	21,787
Łącznie	24	615 pkt.	44,708

* dla publikacji, które ukazały się w 2017 i 2018 roku przyjęto wartość punktów według aktualnej listy MNiSW ogłoszonej 9 grudnia 2016 roku

**dla publikacji, które ukazały się w 2017 i 2018 roku przyjęto wartość IF według aktualnej listy JCR z 2016 roku

c) Działalność dydaktyczna:

W trakcie zatrudnienia na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS, pomimo pracy na etacie inżyniersko-technicznym, prowadziłem zajęcia dydaktyczne z przedmiotu Mikrobiologia dla studentów I roku kierunku biotechnologia.

Obecnie prowadzę zajęcia dydaktyczne z przedmiotów:

- *mikrobiologia weterynaryjna* dla studentów II i III roku kierunku weterynaria (ćwiczenia laboratoryjne i wykłady)
- *ochrona własności intelektualnej* dla studentów I roku kierunku weterynaria (wykłady)

W 2011 roku ukończyłem studia podyplomowe: „Kształcenie kadry akademickiej do roli wykładowców przedmiotu Ochrona własności intelektualnej”. Począwszy od roku akademickiego 2013/2014 jestem osobą odpowiedzialną za przedmiot Ochrona Własności Intelektualnej na Wydziale

Medycyny Weterynaryjnej UP, do którego samodzielnie opracowałem program kształcenia i sylabus.

Pozostała działalność dydaktyczna:

- byłem opiekunem pracowni magisterskiej dla studentów kierunku biotechnologia w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS
- wielokrotnie byłem współautorem projektów prezentowanych w trakcie Lubelskiego Festiwalu Nauki (zał. 4I)
- jestem promotorem 5 prac dyplomowych, w tym dwóch magisterskich i trzech inżynierskich studentów Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie (zał. 4J), a także byłem recenzentem dwóch prac inżynierskich
- jestem promotorem pomocniczym jednego zakończonego przewodu doktorskiego oraz sprawuję opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego dwóch doktorantów realizujących prace badawcze w Instytucie Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie (zał. 4K)

d) Inna działalność:

Od początku mojej pracy w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej UP w Lublinie oprócz pracy badawczej biorę aktywny udział w diagnostyce mikrobiologicznej, stale uzupełniając i poszerzając swoją wiedzę z zakresu aktualnych metod wykorzystywanych rutynowo w laboratorium diagnostycznym i napotykanych w trakcie pracy problemów. Dzięki nawiązanej współpracy z Nadleśnictwem Kluczbork, uczestniczę w badaniach oceny występowania, w aspekcie nosicielstwa, potencjalnych patogenów u osobników jeleni importowane z innych krajów europejskich do Polski w ramach programu reintrodukcji gatunku. Realizuję także prace badawcze zlecane przez firmy farmaceutyczne, które dotyczą oceny preparatów mikrobiologicznych.

Dodatkowo, włączam się w działalność organizacyjną na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie, będąc od 2014 roku Sekretarzem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej.

Jestem również aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Od 2016 roku pełnię funkcję Przewodniczącego Komisji Rewizyjnej Oddziału Lubelskiego PTM.

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego. Szczegółowe informacje o dorobku dydaktycznym i popularyzatorskim oraz współpracy naukowej międzynarodowej i krajowej oraz innej działalności (wg Dz. U. Nr 196, poz. 1165) zebrałem i przedstawiłem w załączniku nr 4 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Lublin 28.05.2018

Sebastian Gnat