

Autoreferat w języku polskim



WYDZIAŁ
MEDYCyny
WETERYNARYJNEJ

AUTOREFERAT

Dr n. wet. Dagmara Anna Stępień-Pyśniak

**Zakład Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie**

Lublin 2018

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Dagmara Anna Stępień-Pyśniak

Obecnie zajmowane stanowisko: adiunkt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Miejsce pracy: Zakład Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2003r. - tytuł zawodowy - lekarz weterynarii; Wydział Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie

2008r. – stopień doktora nauk weterynaryjnych nadany 15 maja 2008 roku uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Ilościowa i jakościowa analiza mikroflory bakteryjnej jaj i jej aspekty epidemiologiczne”, Promotor: Prof. dr hab. Jerzy Rzedzicki

2013r. - specjalista krajowy w dziedzinie Choroby drobiu oraz ptaków ozdobnych, dyplom nr 5/362/2013 z dnia 07.12.2013r. na podstawie uchwały Komisji do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Weterynaryjne Centrum Kształcenia Podyplomowego w Puławach

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

2010 r. - do dnia dzisiejszego: adiunkt; Zakład Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

2008 – 2010 r.: asystent; Zakład Chorób Ptaków, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

2003 -2007 r.: doktorant; Zakład Chorób Ptaków, Katedra Profilaktyki Ogólnej i Chorób Ptaków, Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych, tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017r poz. 1789, z późn. zm.).

a) Tytuł osiągnięcia artystycznego/naukowego

Osiągnięciem naukowym jest tematyczny cykl publikacji objęty tytułem:

*„Zastosowanie fenotypowych i molekularnych metod w identyfikacji i charakterystyce
wybranych patogenów oportunistycznych izolowanych od ptaków”*

b) Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

1. **Stępień-Pyśniak D.**, Marek A., Banach T., Adaszek Ł., Pyzik E., Wilczyński J., Winiarczyk S. Prevalence and antibiotic resistance of strains of the genus *Enterococcus* isolated from poultry. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2016, 64 (2), 148-163, DOI10.1556/004.2016.016.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 20, IF₂₀₁₆ = 0,814

Mój wkład w autorstwo polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu badań, planowaniu zakresu badań oraz udziale w ich realizacji, współudziale w zbieraniu materiału, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, przedstawieniu danych w formie graficznej i tabelarycznej, napisaniu i redagowaniu manuskryptu, korespondencji z wydawnictwem, korekcie końcowej wersji manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów i edytora. Mój wkład w autorstwo szacuję na 80%.

2. **Stępień-Pyśniak D.**, Hauschild T., Róžański P., Marek A. MALDI-TOF mass spectrometry as a useful tool for identification of *Enterococcus* spp. from wild birds and differentiation of closely related species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(6), 1128–1137, DOI 10.4014/jmb.1612.12036.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 20, IF₂₀₁₇ = 1,65

Mój wkład w autorstwo polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu badań, planowaniu zakresu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, udziale w realizacji badań, współudziale w zbieraniu materiału, interpretacji wyników badań, przedstawieniu danych w formie tabelarycznej, napisaniu i redagowaniu manuskryptu, korespondencji z wydawnictwem, korekcie końcowej wersji manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów i edytora. Mój wkład w autorstwo szacuję na 85%.

3. **Stępień-Pyśniak D.**, Hauschild T., Nowaczek A., Marek A., Dec M. Wild birds as a potential source of known and novel multilocus sequence types of antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 2018, 54(2), 219-228, DOI 10.7589/2017-05-118.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 30, IF₂₀₁₇ = 1,247

Mój wkład w autorstwo polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu badań, planowaniu zakresu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, udziale w realizacji badań, interpretacji wyników badań, napisaniu i redagowaniu manuskryptu, korespondencji z wydawnictwem, korekcie końcowej wersji manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów i edytora. Mój wkład w autorstwo szacuję na 80%.

4. **Stępień-Pyśniak D.**, Kosikowska U., Hauschild T., Burzyński A., Wilczyński J., Kolińska A., Nowaczek A., Marek A. A loop-mediated isothermal amplification procedure targeting the *sodA* gene for rapid and specific identification of *Gallibacterium anatis*. *Poultry Science*, 2018, 97(4), 1141–1147, DOI 10.3382/ps/pex420.

Punktacja MNiSW₂₀₁₅ = 40, IF₂₀₁₇ = 2,216

Mój wkład w autorstwo polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, udziale w realizacji badań, współudziale w zbieraniu materiału, interpretacji wyników badań, przedstawieniu danych w formie graficznej i tabelarycznej, napisaniu i redagowaniu manuskryptu, korespondencji z wydawnictwem, korekcie końcowej wersji manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów i edytora. Mój wkład w autorstwo szacuję na 80%.

5. **Stępień-Pyśniak D.**, Wilczyński J., Marek A., Śmiech A., Kosikowska U., Hauschild T. *Staphylococcus simulans* associated with endocarditis in broiler chickens. *Avian Pathology*, 2017, 46, 44-51, DOI 10.1080/03079457.2016.1203392.

Punktacja MNiSW₂₀₁₄ = 40, IF₂₀₁₇ = 2,054

Mój wkład w autorstwo polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, udziale w realizacji badań, współudziale w pobieraniu materiału do badań, interpretacji wyników badań, napisaniu i redagowaniu manuskryptu, korespondencji z wydawnictwem, korekcie końcowej wersji manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów i edytora. Mój wkład w autorstwo szacuję na 80%.

Łączna punktacja 5 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji wynosi:

- 150 pkt. według punktacji MNiSW
- sumaryczny Impact Factor (IF) według bazy *Journal Citation Reports* (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania – 7,981

Dla publikacji, które ukazały się w latach 2017 i 2018 przyjęto najwyższą liczbę punktów określoną przez MNiSW w wykazie czasopism naukowych zawierający historię czasopisma z publikowanych wykazów za lata 2013-2016 (zgodnie z komunikatem wydanym przez MNiSW). Dla publikacji z roku 2016, punktacja jest zgodna z rokiem opublikowania.

Publikacje oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy zostały zamieszczone w załączniku nr 6.

c) Omówienie celu naukowego prac przedstawionych do postępowania habilitacyjnego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I. Wprowadzenie

Drobnoustroje oportunistyczne są zaliczane do grupy mikroorganizmów, mogących powodować zakażenia endogenne oraz zróżnicowane schorzenia, niejednokrotnie przewlekłe o ciężkim przebiegu, u osobników np. z zakłóconą równowagą immunologiczną, przewlekłe chorych lub po antybiotykoterapii. Bakterie oportunistyczne zwykle kolonizują organizm zwierząt (element mikrobioty) lub występują w otaczającym środowisku. Wśród najczęściej opisywanych zakażeń u ptaków wywoływanych przez drobnoustroje oportunistyczne znajdują się zakażenia powodowane przez enterokoki, gronkowce koagulazo-ujemne, a także bakterie należące do rodziny *Pasteurellaceae*, w tym *Gallibacterium anatis*.

Mikroorganizmy oportunistyczne często są pomijane w czasie diagnostyki zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Wynika to z przekonania, że w materiałach diagnostycznych stanowią one kontaminację i jako takie, nie wymagają izolacji ani identyfikacji. Rzadko są one traktowane jako czynniki etiologiczne zakażeń czy chorób infekcyjnych w organizmach eukariotycznych. Z tego względu diagnostyka bakterii oportunistycznych jest trudna i niejednokrotnie dyskusyjna, ponieważ większość znanych technik identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza nowszej generacji,

koncentruje się na patogenach ludzkich o znacznym potencjale chorobotwórczym, rzadko poruszając lub nawet pomijając problem udziału patogenów oportunistycznych w patomechanizmie zakażeń, zwłaszcza u ptaków.

Gronkowce koagulazo-ujemne (CoNS) stanowią ważną część mikrobioty saprofitycznej skóry, dróg oddechowych, przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego zwierząt. W sprzyjających warunkach, np. w efekcie oddziaływania czynników stresowych lub koinfekcji, bakterie te mogą stać się oportunistycznymi patogenami (Devriese 1990, Tate i wsp. 1993, McNamee i wsp. 1998, McNamee i Smyth 2000, Devriese i wsp. 1992, Corrand i wsp. 2012). Najczęściej izolowanymi od drobiu gronkowcami CoNS były *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus cohnii* i *Staphylococcus hyicus*. Prace, które pojawiły się w kolejnych latach, przedstawiały informacje na temat izolowania od drobiu z różnymi objawami klinicznymi również gatunku *Staphylococcus simulans* (Türkyilmaz i Kaya 2006, Marek i wsp. 2016), jednak bez wskazań na konkretne schorzenie. Ponadto *S. simulans* był często identyfikowany wśród bakterii CoNS izolowanych z subklinicznych przypadków *mastitis* u krów (Supré i wsp. 2011). Natomiast w innych badaniach (Penna i wsp. 2010) odnotowano, że gronkowiec ten wywoływał zapalenie ucha zewnętrznego u 11% badanych psów. Udział *S. simulans* został również potwierdzony w przebiegu zapalenia skóry u jeża pigmejskiego (*Erinaceus albiventris*) (Han i wsp. 2011). Gatunek ten zidentyfikowano także w ślinie 5,8% klinicznie zdrowych kotów (Lilenbaum i wsp. 1999).

Gram-dodatnie bakterie z rodzaju *Enterococcus* wchodzi w skład mikrobioty przewodu pokarmowego u zwierząt. W ostatnich latach wciąż obserwowany jest wzrost znaczenia klinicznego tych oportunistycznych patogenów zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, w tym także u ptaków. Doniesienia na temat udziału bakterii z rodzaju *Enterococcus* w patologii chorób ptaków zaczęły pojawiać się od schyłku XX w. Obecnie coraz częściej mówi się na temat tych drobnoustrojów i ich roli w patomechanizmie chorób oportunistycznych. *Enterococcus faecalis* jest przyczyną *endocarditis* u kurcząt, zmian wytwórczych w wątrobie (hepatic granuloma) u indyków, wodobrzusza u kur, nadciśnienia płucnego u brojlerów (Tankson i wsp. 2001), zespołu śmiertelności niosek w pierwszym tygodniu życia (Olsen i wsp. 2012a), artropatii amyloidowej ze współistniejącą amyloidozą układową u kur i broilerów (Stentjes i wsp. 2002), a także *arthritis* u kaczek oraz *septicaemii* u kacząt (Sandhu 1988, Bisgaard 1981). Potwierdzono również przypadki występowania *Enterococcus cecorum* w

przebiegu *arthritis*, *spondylitis*, *osteomyelitis* oraz martwicy główki kości udowej u brojlerów i w stadach rodzicielskich brojlerów (De Herdt i wsp. 2009, Devriese i wsp. 2002, Stalker i wsp. 2010, Szeleszczuk i wsp. 2013). Z kolei *Enterococcus durans* izolowano od kurcząt z bakteriemią, a także z encephalomalacją (Abe i wsp. 2006), natomiast gatunek *Enterococcus hirae* został wyosobniony z ogniskowej martwicy mózgu, *osteomyelitis* oraz *endocarditis* (Kolbjørnsen i wsp. 2011, Velkers i wsp. 2011).

Obok wymienionych ziarniaków Gram-dodatnich, przedmiotem badań własnych stała się także Gram-ujemna pałeczka *Gallibacterium anatis*, należąca do grupy wybrednych i charakteryzujących się szczególnymi wymaganiami wzrostowymi bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*. Obecność bakterii tego gatunku stwierdza się w górnych partiach układu oddechowego i dolnym odcinku układu rozrodczego ptaków nie wykazujących objawów chorobowych. Poprzednio bakteria ta sklasyfikowana była jako *Actinobacillus salpingitidis*, *Pasteurella haemolytica*-like, czy *Pasteurella anatis*. Obecnie rodzaj *Gallibacterium* obejmuje siedem gatunków, z których najczęściej *G. anatis* biovar *haemolytica* wywołuje u drobiu: zapalenie jajowodu (*salpingitis*), zapalenie jajnika (*oophoritis*), zapalenie otrzewnej (*peritonitis*), posocznicę (*septicemia*), zapalenie osierdzia (*pericarditis*), zapalenie wątroby (*hepatitis*), zapalenie jelit (*enteritis*) oraz zmiany w płucach (Neubauer i wsp. 2009, Paudel i wsp. 2013). Gatunek ten najczęściej jest izolowany od kur niosek towarowych oraz kur rodzicielskich mięsnych. Ponadto, obecność tego drobnoustroju stwierdzano również w stadach brojlerów kurzych i indyckich, a także pawie (Rzewuska i wsp. 2007).

O znaczeniu podjętych badań nad występującymi u ptaków patogenami oportunistycznymi może również świadczyć fakt jednoczesnego występowania tych bakterii u gospodarzy specyficznych (ptaki, inne zwierzęta) oraz ludzi jako gospodarzy niespecyficznych. W wielu opracowaniach odnotowywano przypadki zakażeń wywołanych przez *G. anatis* i *S. simulans* w medycynie ludzkiej (Males i wsp. 1985, Orret i Shurland 1998, Gautier i wsp. 2005, Vallianou i wsp. 2008, Mallet i wsp. 2011, Aubin i wsp. 2013). Ponadto, wykazano obecność tych samych klonów *E. faecalis* u drobiu i ludzi (Olsen i wsp. 2012b, Poulsen i wsp. 2012). Może to sugerować możliwości transmisji tych mikroorganizmów pomiędzy osobnikami różnych gatunków, w tym pomiędzy ptakami i ludźmi.

Pomimo stosowania zasad bioasekuracji i stopniowego wdrażania alternatywnych metod kontrolowania zakażeń w stadach ptaków hodowlanych, nadal powszechną strategią utrzymywania zdrowotności zwierząt, w tym drobiu, jest antybiotykoterapia.

Spośród wszystkich negatywnych skutków wywołanych wpływem antybiotyków najbardziej niepokojąca i jednocześnie najintensywniej badana jest rosnąca oporność na leki wśród mikroorganizmów. Pod wpływem antybiotyków w komórkach bakterii powstaje szereg zmian, w tym wzrasta częstość mutacji, co przyczynia się do narastania lekooporności tych mikroorganizmów. Zwiększa się także ryzyko przenoszenia genów oporności między drobnoustrojami w wyniku poziomego transferu genów za pośrednictwem mobilnych elementów genetycznych, a tym samym rozprzestrzeniania się oporności zarówno na poziomie molekularnym, jak i fenotypowym. Uważa się (Gilmore i wsp. 2013), że enterokoki są kluczowym czynnikiem nabywania i rozpowszechniania oporności na antybiotyki, co zapewnia selektywne korzyści dla ich przeżywania i rozprzestrzeniania się w środowisku. Znajduje to również odzwierciedlenie w bezpieczeństwie produkcji żywności, ponieważ ważnym czynnikiem w szerzeniu się bakterii wieloopornych pochodzenia kałowego jest zanieczyszczenie środowiska przez obornik i gnojowicę z intensywnej produkcji zwierzęcej (Radhouani i wsp. 2014).

Problem ten potęguje fakt, że dzikie ptaki zamieszkujące różne nisze ekologiczne są narażone na kontakt z tymi mikroorganizmami, jak również pozostałościami różnych środków przeciwdrobnoustrojowych i leków, i mogą stać się źródłem lub wektorem bakterii opornych pochodzenia kałowego oraz uczestniczyć w ich rozprzestrzenianiu na duże odległości (Radimersky i wsp. 2010, Oravcova i wsp. 2013, Santos i wsp. 2013).

Współczesna diagnostyka mikrobiologiczna, rozumiana jako zespół badań mających na celu identyfikację i oznaczenie lekowrażliwości patogenów i/lub drobnoustrojów oportunistycznych mających znaczenie jako potencjalnych czynników etiologicznych różnych chorób oraz dla szerzenia się zakażeń i rozprzestrzeniania genów lekooporności, musi sobie radzić z wieloma problemami. Wynikają one m.in. z narastającej liczby potwierdzonych zakażeń wywoływanych przez bakterie oportunistyczne i środowiskowe, nawet o małym potencjale inwazyjnym i niskiej wirulencji (Wang 2009, Berg i wsp. 2014).

Powszechnie wykorzystywane w identyfikacji drobnoustrojów metody diagnostyczne oparte na analizie fenotypowej drobnoustrojów m.in. hodowli czy określaniu profilu biochemicznego są nieocenione i umożliwiają diagnostykę dużej grupy najczęściej izolowanych patogenów, jednak w wielu przypadkach ich efektywność jest niewystarczająca, co dotyczy szczególnie identyfikacji patogenów rzadkich lub o nietypowych właściwościach. To z kolei prowadzi do problemów w

interpretacji uzyskanych wyników mających na celu określenie rodzaju i gatunku bakterii oraz określenie ich lekowrażliwości, a w konsekwencji utrudnia właściwe postępowanie terapeutyczne w przypadku ptaków chorych oraz ogranicza możliwości zabezpieczania ptaków hodowlanych przed niekorzystnymi zjawiskami wynikającymi z wielkości stad hodowlanych i bardzo dużej łatwości przekazywania mikroorganizmów opornych na czynniki przeciwdrobnoustrojowe, mających zdolność wywoływania oportunistycznych zakażeń. Stąd też poszukiwanie nowoczesnych rozwiązań oraz prowadzenie działań w zakresie doskonalenia i zastosowania bardziej precyzyjnych oraz niezawodnych metod diagnostycznych, przydatnych m.in. w weterynarii, jest uzasadnione.

Podjęte przeze mnie działania badawcze wpisują się w aktualne trendy związane z określeniem znaczenia mikroorganizmów oportunistycznych, zwłaszcza lekoopornych, w powstawaniu infekcji o trudnej do sprecyzowania etiologii i sprawiających problemy terapeutyczne. Podstawą działań zapobiegawczych i profilaktycznych w odniesieniu do ptaków i innych zwierząt, ale także ze względu na bezpieczeństwo ludzi, jest prawidłowa izolacja i rozpoznanie czynnika etiologicznego i określenie potencjalnych zagrożeń związanych z hodowlą zwierząt. Do tego niezbędne są wiarygodne metody diagnostyczne, w tym umożliwiające identyfikację mikroorganizmów i ocenę ich cech, takich jak np. lekooporność czy wirulencja, oraz ich znaczenia w patomechanizmie zakażeń. Do momentu podjęcia przeze mnie badań, publikacje dotyczące występowania i charakterystyki enterokoków wyizolowanych z narządów wewnętrznych (poza przewodem pokarmowym) drobiu wykazującego przyżyciowo i pośmiertnie zróżnicowane objawy, stanowiły bardzo nieznaczną część światowego piśmiennictwa, natomiast w literaturze krajowej brak było opracowań o podobnej tematyce. Ponadto, nie znalazłam informacji na temat lekoopornych, ale wankomycyno-wrażliwych szczepów *E. faecalis* pochodzących od ptaków dzikich. Nowatorskim osiągnięciem prezentowanym w cyklu publikacji przedstawionych do postępowania habilitacyjnego jest również opisany po raz pierwszy na świecie przypadek zapalenia wsierdzia w stadzie kurcząt brojlerów z udziałem *S. simulans*, a także opracowany i zastosowany test do identyfikacji drobnoustrojów *G. anatis* izolowanych od kur i indyków oparty na technice LAMP (*ang.* Loop-mediated isothermal AMPlification).

Wobec fragmentarycznej wiedzy dotyczącej mikrobioty bytującej w różnych częściach organizmu ptaków, wzrastającej liczby przypadków zakażeń oportunistycznych u drobiu oraz znanych z praktyki istotnych trudności w precyzyjnej

identyfikacji drobnoustrojów wywołujących te zakażenia, a także w świetle pojawiających się doniesień na temat kolejnych przypadków infekcji wywoływanych u ludzi przez takie same gatunki bakterii, w tym szczepy lekooporne i wielolekooporne, ważnym zagadnieniem z punktu widzenia lekarza weterynarii wydawało się poszerzenie i uzupełnienie oraz usystematyzowanie wiedzy na temat przydatności różnych metod diagnostycznych, w tym możliwych do zastosowania w rutynowej diagnostyce, w celu prawidłowego określenia czynnika etiologicznego zakażeń u ptaków hodowlanych i dzikich. Dlatego podjęcie przedstawionej w publikacjach problematyki badawczej skoncentrowanej na diagnostyce wybranych bakterii oportunistycznych z rodzaju *Enterococcus* (np. *E. faecalis*), *Staphylococcus* (np. *S. simulans*) i *Gallibacterium* (np. *G. anatis*) izolowanych z materiałów pobranych od różnych ptaków, w zakresie fenotypowej oraz genotypowej identyfikacji i oznaczeniu oporności na antybiotyki na poziomie pełnej komórki i genów, jest jak najbardziej zasadne i celowe.

II. Cel badań

Badania przedstawione w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawione do postępowania habilitacyjnego zostały wykonane na izolatach *Enterococcus* spp., *S. simulans* oraz *G. anatis* pozyskanych z narządów wewnętrznych od drobiu hodowlanego, u których przyżyciowo obserwowano różne objawy kliniczne, bądź też, w przypadku dostarczania do badań ptaków martwych, występowały różne zmiany sekcyjne. Ponadto, badania były prowadzone również na izolatach *Enterococcus* spp. wyosobnionych z wymazów pobranych z kloaki żywych ptaków dzikich nie wykazujących objawów choroby infekcyjnej, pochodzących z terenów Polski.

Celem prowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego badań było:

1. Określenie możliwości zastosowania i przydatności metod fenotypowych do identyfikacji i charakterystyki bakterii oportunistycznych izolowanych od ptaków z wykorzystaniem techniki opartej na określeniu swoistego dla mikroorganizmu profilu białkowego z użyciem spektrometrii mas (*ang.* Mass Spectrometry) typu MALDI-TOF (*ang.* Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) oraz metod biochemicznych do:
 - a/ identyfikacji odzwierzęcych drobnoustrojów oportunistycznych
 - b/ oceny częstości występowania poszczególnych gatunków enterokoków u drobiu i ptaków dzikich w Polsce
 - c/ różnicowania blisko spokrewnionych gatunków bakterii na przykładzie enterokoków

2. Określenie możliwości zastosowania i przydatności metod typowania molekularnego – PCR, PFGE oraz MLST do:
 - a/ identyfikacji i określenia pokrewieństwa genetycznego bakterii oportunistycznych izolowanych od ptaków na przykładzie *Enterococcus* spp.
 - b/ ocena roli ptaków dzikich z terenów Polski jako rezerwuaru i źródła lekoopornych klonów *E. faecalis*.
3. Ocena z użyciem metod fenotypowych i genotypowych występowania lekoopornych bakterii oportunistycznych *Enterococcus* spp. wśród izolatów pochodzących od drobiu i ptaków dzikich
4. Zaprojektowanie i walidacja testu opartego na technice LAMP do szybkiej i wiarygodnej identyfikacji *Gallibacterium anatis*
5. Charakterystyka fenotypowa *Staphylococcus simulans* jako istotny element diagnostyki zapalenia wsierdzia u kurcząt brojlerów

III. Omówienie wyników

1. Zastosowanie spektrometrii mas typu MALDI-TOF jako nowoczesnej, szybkiej, powtarzalnej i wiarygodnej metody identyfikacji odzwierzęcych drobnoustrojów oportunistycznych (**publikacje 1, 2, 4 i 5**)

Identyfikacja wybrednych lub nietypowych gatunków bakterii za pomocą rutynowych i standardowo stosowanych metod nie zawsze jest wiarygodna, szczególnie w przypadku izolatów weterynaryjnych. Ponadto charakterystyczne dla niektórych bakterii wymagania odżywcze, ich aktywność metaboliczna i występowanie atypowych cech fenotypowych u niektórych mikroorganizmów może również prowadzić do błędnej identyfikacji drobnoustrojów, co wstępnie przedstawiono w publikacjach:

- Kosikowska U., **Stępień-Pyśniak D.**, Pietras-Ożga D., Andrzejczuk S., Juda M., Malm A. Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. *Diagnostyka laboratoryjna*, 2015, 51(1), 1-8.

- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.**, Hauschild T., Banach T. Identification of strains with phenotypes similar to those of *Staphylococcus aureus* isolated from table chicken eggs using MALDI-TOF MS and genotyping methods. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2015, 59, 235-239.

Prawidłowa identyfikacja bakterii ma kluczowe znaczenie dla celów epidemiologicznych i terapeutycznych. Ponadto nowoczesna diagnostyka dąży do stosowania i rozwoju metod, które dają wiarygodne i powtarzalne wyniki w krótkim czasie jednocześnie przy niskich kosztach analiz.

Rutynowa identyfikacja bakterii opiera się na metodach fenotypowych, głównie biochemicznych, i jest najczęściej potwierdzana technikami molekularnymi, jak PCR (*ang.* Polymerase Chain Reaction), przy użyciu starterów i warunków właściwych dla różnych rodzajów lub gatunków bakterii. Jednakże zastosowanie specyficznego PCR do identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza rzadko izolowanych, jest czasochłonne oraz wymaga dużej liczby odpowiednich starterów dla poszczególnych gatunków bakterii. Zwykle, kiedy identyfikacja fenotypowa i specyficzny dla gatunku PCR są niewystarczające, stosuje się identyfikację opartą na sekwencji określonego genu. Oprócz tego, że technika ta jest pracochłonna i zbyt kosztowna w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, potrzebuje doboru odpowiedniego do sekwencjonowania genu, co wymaga zarówno adekwatnej wiedzy związanej z analizą sekwencji, jak i drogiej w utrzymaniu aparatury. Podczas gdy sekwencjonowanie genu 16S rRNA jest powszechnie akceptowane jako narzędzie do identyfikacji izolatów bakteryjnych (Srinivasan i wsp. 2015), niektóre grupy bakterii, w tym enterokoki takie jak: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum* i *Enterococcus casseliflavus* nie mogą być zróżnicowane na poziomie gatunku tą techniką (Quintela-Baluja i wsp. 2013, Splichalova i wsp. 2015). Dlatego w celu potwierdzenia poprawności identyfikacji izolowanych od ptaków bakterii z rodzaju *Enterococcus* (**publikacja 2**), *G. anatis* (**publikacja 4**) oraz *S. simulans* (**publikacja 5**) z użyciem techniki MALDI-TOF zastosowałam sekwencjonowanie z wykorzystaniem odpowiednich sekwencji genów *rpoA* (**publikacja 2**), *rpoB* (**publikacja 4 i 5**) i *dnaJ* (**publikacja 5**).

Technika spektrometrii mas typu MALDI-TOF oparta jest na analizie unikatowego, niepowtarzalnego dla każdego gatunku drobnoustroju profilu białek komórkowych, określanego jako „molekularny odcisk palca”. Identyfikacja opiera się na porównaniu widma masowego badanego izolatu (analiza rozmieszczenia, ilości i

intensywności pików) z widmami szczepów referencyjnych zamieszczonych w bazie danych. Wyniki identyfikacji uzyskiwane za pomocą programu Biotyper 3.0 są przedstawiane w postaci 10 najlepszych dopasowań (widma badanego do widm wzorcowych), z których każdemu przypisana jest odpowiednia wartość $\log(\text{score})$. Zgodnie z zaleceniami producenta (Bruker) wyniki o wartości $\log(\text{score})$ 2.300-3000 oznaczają wysoce prawdopodobną identyfikację do poziomu gatunku, te z przedziału 2.000-2.299 – pewną identyfikację do rodzaju i prawdopodobną identyfikację gatunkową, 1.700-1.999 – prawdopodobną identyfikacją do poziomu rodzaju, a wynik o $\log(\text{score})$ 0.000-1.699 oznacza identyfikację niewiarygodną.

Dane przedstawione w **publikacjach 2, 4 i 5** na temat identyfikacji bakterii izolowanych od ptaków, uzyskane z wykorzystaniem spektrometru mas typu MALDI-TOF model UltrafleXtreme (Bruker, Niemcy) oraz oprogramowania MALDI Biotyper 3.0 (Bruker, Niemcy), opartej na ekstrakcji białek z użyciem etanolu i kwasu mrówkowego wskazują jednoznacznie, że użycie tej metody zapewniło doskonałe wyniki diagnostyczne z jednoczesnym istotnym skróceniem czasu identyfikacji badanych drobnoustrojów oportunistycznych, tj. bakterii z rodzaju *Enterococcus*, oraz gatunków *G. anatis* i *S. simulans* wyizolowanych od drobiu i ptaków dzikich. Ponadto, w **publikacji 2** dowiodłam, że izolaty od ptaków dzikich mogły zostać zidentyfikowane do poziomu gatunku - jako *E. faecalis* - pomimo iż wartość $\log(\text{score})$ wynosiła <2.000 . Na podstawie analizy widm spektrometrii mas, składających się z pików, które odpowiadają charakterystycznym dla poszczególnych szczepów *E. faecalis* jonom peptydów występującym w zakresie od 2000 do 20 000 Da, stwierdziłam, że zarówno położenie pików głównych, jak i stosunek ich masy do ładunku wykazują wysoki stopień podobieństwa między izolatami, co pozwoliło na jednoznaczne ustalenie gatunku.

Na szczególne podkreślenie zasługuje nowatorskość oraz uniwersalność wykorzystywanych technik diagnostycznych. Tym bardziej, że w okresie, gdy podejmowane były badania, których wyniki zostały przedstawione w publikacjach wchodzących w cykl osiągnięcia przedstawionego do postępowania habilitacyjnego, w Polsce technika ta nie była jeszcze wykorzystywana na szeroką skalę nawet w laboratoriach zajmujących się materiałami diagnostycznymi pobieranymi od ludzi. Warto zaznaczyć, że stanowi ona alternatywę dla bardziej czasochłonných i kosztownych metod molekularnych, w tym sekwencjonowania, prezentowanego w **publikacjach 2, 4 i 5**, w czasie których wykonywano ekstrakcję DNA, amplifikację

geny, oczyszczanie produktu PCR, elektroforezę w żelu agarozowym, etapy samego sekwencjonowania oraz analizę danych.

2. Zastosowanie spektrometrii mas typu MALDI-TOF do rozróżniania blisko spokrewnionych gatunków enterokoków na podstawie ich profili białkowych

Spektrometria mas jest uniwersalną techniką analityczną znajdującą zastosowanie w wielu aspektach i dziedzinach, której podstawą jest pomiar stosunku masy danego jonu do jego ładunku elektrycznego (m/z). Jak już wspomniałam w rozdziale III.1, do identyfikacji drobnoustrojów, w tym bakterii, wykorzystuje się spektrometrię mas typu MALDI-TOF polegającą na laserowej jonizacji badanej próby z użyciem matrycy (MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) i analizie czasu przelotu jonów (TOF - *Time-of-Flight*). Podstawową zaletą MALDI-TOF jest to, że technika ta umożliwia bezpośrednią detekcję składu populacji cząsteczek o dużych masach cząsteczkowych, takich jak mieszaniny białek. Stąd też identyfikacja bakterii z zastosowaniem MALDI-TOF MS polega na analizie składu białek komórkowych, głównie tych występujących w dużych ilościach w komórce bakteryjnej, takich jak białka rybosomalne. Ostatecznym rezultatem analizy MALDI-TOF MS jest otrzymanie widma spektrometrycznego, na którym widoczne są sygnały od mas powstałych jonów oraz cząsteczki niezjonizowanej.

W **publikacji 2** wykazałam na podstawie danych przedstawionych na dendogramie uzyskanym w oparciu o profile widm masowych (MSP) charakterystycznych dla wszystkich enterokoków wyosobnionych od ptaków dzikich, że większość analizowanych gatunków *Enterococcus* spp. cechowało się zbliżonym profilem białkowym, niezależnie od gatunku ptaka, od którego został wyizolowany. Izolaty bakterii podzielone zostały na dwie główne grupy (dwa klastry). Klaster 1 zawierał 26 izolatów należących do grupy *E. faecium* (*E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus* i wszystkie, oprócz jednego izolatu, *E. faecium*). Cluster 2 składał się z 27 izolatów *E. faecalis* (grupa *E. faecalis*) i dodatkowo jednego izolatu *E. faecium* - nr 57. Ponadto, klasyfikacja filoproteomiczna wykazała podobieństwo między niektórymi gatunkami *Enterococcus* spp. takimi jak: *E. durans* (nr 37) i *E. faecium* (nr 38A), *E. durans* (nr 24) i *E. faecium* (nr 60) oraz *E. faecium* (nr 57) do grupy *E. faecalis*.

Wszystkie widma charakteryzowały się dobrą rozdzielczością, z różnymi pikami i specyficznymi profilami spektralnymi specyficznymi dla poszczególnych szczepów. Chociaż widma otrzymane z izolatów *E. faecium* miały pewne wspólne piki z widmami

pochodzącymi z izolatów *E. durans*, ujawniły one wystarczające różnice spektralne, aby umożliwić wyraźny rozdział tych gatunków bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Ponadto niektóre wspólne piki dla jednej pary *E. faecium* i *E. durans* nie wystąpiły w drugiej parze tych samych gatunków. Spowodowało to oddzielne zgrupowanie tych dwóch par w dendrogramie MSP. Podobnie, *E. faecalis* (nr 61) i *E. faecium* (nr 57) miały razem 20 pików wspólnych. Poza pikiem m/z 4428 ± 1 , żaden ze wspólnych pików dla *E. faecalis* (nr 61) i *E. faecium* (nr 57) nie występował w pozostałych izolatach *E. faecium*. Dlatego szczep nr 57 był zgrupowany razem ze szczepami *E. faecalis*. Warto zauważyć, że pik m/z 4428 ± 1 był obecny we wszystkich widmach otrzymanych dla *Enterococcus* spp., co najprawdopodobniej może go typować jako biomarker dla tego rodzaju.

Dzięki analizie filoproteomicznej profili widmowych, poprzez określenie pików m/z charakterystycznych dla izolatów pochodzących od ptaków i poddawanych analizie w **publikacji 2** wykazałam, że MALDI-TOF MS jest użytecznym narzędziem do różnicowania podobnych gatunków w obrębie rodzaju *Enterococcus*, pomimo faktu, że niektóre z nich wykazywały powiązania spektralne. Zidentyfikowałam także unikatowy biomarker białkowy dla rodzaju *Enterococcus*, co jest ważnym krokiem ułatwiającym szybką identyfikację tego rodzaju.

Na podstawie danych przedstawionych w publikacjach będących osiągnięciem naukowym można przyjąć, że spektrometria mas typu MALDI-TOF może być wykorzystywana jako wiarygodna i powtarzalna metoda do identyfikacji i wstępnego porównywania między sobą izolatów z rodzaju *Enterococcus*, stanowiąc tym samym szybszą i mniej kosztowną alternatywę dla technik genotypowych.

Charakterystyka pokrewnych szczepów z użyciem widm uzyskanych techniką MALDI-TOF MS jest pomocna w zrozumieniu dynamiki populacji mikrobiologicznych w różnych ekosystemach.

3. Opracowanie oraz zastosowanie testu opartego na technice LAMP do szybkiej i wiarygodnej identyfikacji *Gallibacterium anatis*.

Jak dotąd, w oparciu o dane dostępne w aktualnym piśmiennictwie, opracowano kilka metod identyfikacji *Gallibacterium* spp. Obejmują one identyfikację fenotypową (Dousse i wsp., 2008), fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (Bojesen i wsp., 2003), konwencjonalną metodę PCR (Bojesen i wsp. 2007) oraz ilościowy PCR oparty na obecności genu *gtxA* (Huangfu i wsp. 2012). Ponieważ jednak gatunek *G. anatis* należy do bakterii wybrednych, problematycznych do utrzymania w formie aktywnej, jest

także ubogi biochemicznie, trudno jednoznacznie go zidentyfikować za pomocą którejkolwiek z tych metod, nawet pomijając fakt, że są one kosztowne.

Analizując aktualne trendy badawcze oraz możliwość zastosowania w diagnostyce oportunistycznych chorób występujących u ptaków nowoczesnych, bardziej wydajnych, mniej czaso- i kosztochłonnych i jednocześnie bardziej wiarygodnych oraz powtarzalnych metod stwierdziłam, że techniką posiadającą wiele zalet właściwych dla metod opartych zarówno na PCR jak i na real-time PCR jest technika LAMP. Pozwala ona na powielanie i identyfikację DNA z bardzo dużą szybkością oraz bardzo wysoką wydajnością i specyficznością w warunkach stałej temperatury. Bardzo duża, nawet w porównaniu do PCR, wydajność reakcji powoduje, że produkt reakcji można zauważyć bez używania dodatkowej aparatury (tzw. „gołym okiem”), a przebieg reakcji można oceniać za pomocą analizy krzywej fluorescencji w czasie rzeczywistym. Technika LAMP umożliwia zastosowanie znacznie tańszej aparatury analitycznej (nawet z opcją zasilania akumulatorowego) lub wykorzystywanie standardowego typowego sprzętu laboratoryjnego (blok grzewczy czy łaźnia wodna) i przeprowadzanie analiz w środowisku okołoprodukcyjnym (w warunkach terenowych), co do tej pory było niemożliwe.

W publikacji 4 przedstawiłam nowatorskie, pionierskie badania na temat doboru warunków i zastosowania metody LAMP w czasie rzeczywistym (real-time LAMP) do szybkiej i bardzo specyficznej identyfikacji *G. anatis* wyizolowanych od kur i indyków. Jest to pierwsze opracowanie na ten temat nie tylko w polskiej, ale również zagranicznej literaturze naukowej w odniesieniu do bakterii *G. anatis*.

Pracę rozpoczęłam od zgromadzenia szczepów *G. anatis* pochodzących od kur niosek, kur reprodukcyjnych oraz indyków hodowanych w naszym kraju, u których obserwowano objawy kliniczne (podwyższone upadki, spadek nieśności, objawy ze strony układu oddechowego). Badania nad *G. anatis* i kolekcjonowanie izolatów prowadziłam we współpracy z krajowym weterynaryjnym laboratorium diagnostycznym, ponieważ zgodnie z założonym celem badań, istotne było pozyskiwanie tego gatunku bakterii z różnych terenów Polski. Izolację bakterii (ze zmienionych makroskopowo narządów) z terenowych przypadków klinicznych u drobiu prowadziłam w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Materiał do badań stanowiło 120 izolatów terenowych, które pozyskałam od drobiu w latach 2013–2016. Wstępną identyfikację uzyskanych izolatów przeprowadziłam przy użyciu

techniki MALDI-TOF MS, konwencjonalnej techniki PCR, a w sytuacjach wątpliwych również sekwencjonowania opartego na genie *rpoB*.

Jako kontrolę pozytywną zastosowałam szczep referencyjny *Gallibacterium anatis* ATCC 43329. Specyficzność zaprojektowanych starterów oceniałam przy użyciu szczepów referencyjnych takich jak: *Haemophilus parainfluenzae* ATCC 51505 i ATCC 33392 oraz *Aggregatibacter aphrophilus* ATCC 7901, jak również szczepów *Avibacterium endocarditis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Avibacterium paragallinarum*, *Ornithobacterium rhinotracheale* i *Escherichia coli*. Aby ocenić czułość testu LAMP, przebadalam 10-krotne seryjne rozcieńczenia DNA losowo wybranych szczepów *G. anatis* i szczepu referencyjnego. Jednocześnie jako metodę alternatywną w analizie porównawczej zastosowałam technikę ilościowego PCR.

Określenie gatunkowe z wykorzystaniem LAMP w czasie rzeczywistym wykonałam w oparciu o sekwencję genu *sodA* dla szczepu *G. anatis* (numer dostępowy: CP002667.1). W tym celu zaprojektowałam trzy pary starterów przy użyciu programu PrimerExplorer V4 (Eiken Chemical Co. Ltd., Japonia). Zastosowanie starterów wewnętrznych [FIP (F1C + F2) (*ang.* Forward Inner Primer) oraz BIP (B1c + B2) (*ang.* Backward Inner Primer)], a także zewnętrznych [LoopF (*ang.* Forward) i LoopB (*ang.* Backward)] umożliwiło szybsze wykrywanie specyficznego DNA. Warto też podkreślić, że reakcje LAMP przeprowadziłam skutecznie w 13 µl mieszanin reakcyjnych, tj. w około połowie mniejszej niż zalecana objętość reakcji (25 µl), dzięki czemu obniżone zostały koszty wykonania oznaczenia.

Reakcję LAMP prowadziłam w przenośnym aparacie Line Gene-K (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Chiny) pozwalającym na odczyt w czasie rzeczywistym na kanale FAM. W ten sposób mogłam dokonać analizy przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym na podstawie pomiaru fluorescencji i analizować profil topnienia produktu po reakcji. Wszystkie 120 izolatów terenowych *G. anatis* i szczep referencyjny *G. anatis* ATCC 43329 zostało poprawnie zidentyfikowanych za pomocą testu *G. anatis*-LAMP. W reakcji prowadzonej zgodnie z procedurą opracowaną dla *G. anatis* nie zaobserwowałam amplifikacji innych gatunków badanych bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* lub *E. coli*. Nie wykazałam także znaczących różnic między bakteriami *G. anatis* za pomocą analizy krzywej topnienia. Temperatura topnienia produktu (T_m) wynosiła około 85,5 °C ($\pm 0,5$ °C), co sugerowało występowanie ampikonów o podobnej sekwencji, a tym samym że był to jeden gatunek bakterii, czyli *G. anatis*. Ponadto, na podstawie analizy czułości testu opartego na technice LAMP wykazałam,

że reakcje z użyciem tej techniki wymagały mniejszej ilości matrycy DNA, co umożliwiło wykrycie materiału genetycznego w ilości niemal 80 razy mniejszej niż w technice ilościowej PCR.

Prezentowane w **publikacji 4** badania, poza wartością naukową, mają również aspekt praktyczny i aplikacyjny, czego rezultatem było opracowanie przez mnie bardzo czułego i specyficznego testu do identyfikacji *G. anatis* w objętości 13 µl mieszaniny reakcyjnej z użyciem techniki LAMP w czasie rzeczywistym, który jest mniej czasochłonny i mniej kosztowny niż ilościowy PCR. Efektem uzyskanych w badaniach rezultatów była również komercjalizacja opracowanego testu diagnostycznego, który aktualnie dostępny jest w ofercie firmy Novazym Polska.

4. Ocena częstości występowania poszczególnych gatunków enterokoków u drobiu i ptaków dzikich żyjących w Polsce

Technika oparta na spektrometrii mas i określeniu swoistego gatunkowo profilu białkowego okazała się użyteczna w ocenie rozpowszechnienia i znaczenia różnych gatunków *Enterococcus* spp. w etiologii chorób oportunistycznych u ptaków hodowlanych. Badania przedstawione w **publikacji 1**, włączonej w cykl stanowiący omawiane osiągnięcie naukowe, zostały wykonane na reprezentatywnej puli 911 izolatów *Enterococcus* spp. pozyskanych z 580 stad drobiu, w tym 420 stad brojlerów, 80 stad indyckich, 73 stad kur niosek i hodowlanych oraz 7 stad gęsi, które przebadano w okresie od października 2013 r. do września 2014 r. Próbkę do badań bakteriologicznych pobierane były głównie z serc (97%), a także wątroby, mózgowia, szpiku kostnego i wymazów jajowodu (3%), od drobiu różnych gatunków i typów użytkowych w wieku od 1 dnia do 60 tygodni. Badane ptaki były najczęściej w wieku do 10 dni. Wśród objawów chorobowych u ptaków poddawanych badaniom mikrobiologicznym obserwowano: zwiększoną śmiertelność, gorszy przyrost masy ciała, zmniejszoną nieśność, zapalenie jajowodów, zakażenie woreczka żółtkowego, zapalenie stawów, infekcje szpiku kostnego, zapalenie stawów kręgosłupa, martwicę głowy kości udowej i zapalenie wsierdzia.

Zgodnie z danymi przedstawionymi w **publikacji 1**, z badanych materiałów klinicznych wyizolowałam łącznie 911 izolatów *Enterococcus* spp., co stanowiło 30,7% pozytywnych wyników. Na podstawie otrzymanych danych wykazałam częste występowanie zakażeń bakteriami z rodzaju *Enterococcus* w materiale biologicznym pochodzącym od drobiu hodowanego w Polsce, wykazującego różne objawy

chorobowe. Bakterie z rodzaju *Enterococcus* najczęściej wykrywałam u brojlerów (88,1%), kur niosek (5,3%), indyków (3,9%), kur hodowlanych (2,2%) i gęsi (0,4%). Drobnoustroje te najczęściej izolowałam od ptaków w wieku 1-3 dni (87,3%), ale także 4 - 10 dni (3,2%), 2 - 4 tygodni (5,5%), 5 - 7 tygodni (1,8 %) i 12 - 60 tygodni (2,2%). Dominujące gatunki zidentyfikowałam jako *E. faecalis* (74,7%), *E. faecium* (10,1%), *E. gallinarum* (5,5%), *E. hirae* (4,6%) i *E. cecorum* (4,1%).

Otrzymane dane dotyczące częstości występowania poszczególnych gatunków enterokoków w narządach wewnętrznych pozwoliły stwierdzić, że najwyższy odsetek *E. faecalis* można powiązać z wiekiem badanych ptaków. Zgodnie z danymi literaturowymi, przewód pokarmowy piskląt jest początkowo kolonizowany przez *E. faecalis* (Fertner i wsp., 2011), ale populacja tego gatunku zmniejsza się wraz z wiekiem na korzyść *E. faecium* (Kaukas i wsp. 1987). Na tej podstawie mogłam wytłumaczyć występowanie *E. faecium* w drugiej kolejności po *E. faecalis*.

Na podstawie analizy otrzymanych przeze mnie wyników (**publikacja 1**) stwierdziłam również, że częstość występowania u drobiu innego jeszcze gatunku enterokoków, *E. cecorum*, podobnie jak *E. faecalis*, jest zależna od wieku. Najwyższy odsetek *E. cecorum* wykazałam u brojlerów w wieku 2 - 5 tygodni. Ponadto obecność tego gatunku wykazałam u kur niosek (22 - 35 tygodni), kur hodowlanych (28-37 tygodni) i gęsi (50 dni). Nie stwierdziłam obecności tego gatunku u drobiu poniżej 2 tygodnia życia. Pozostałe gatunki, tj. *E. casseliflavus* (0,8%), *E. avium* (0,1%) i *E. columbae* (0,1%) izolowałam sporadycznie. Warto podkreślić, że ostatnie dwa gatunki wyizolowałam odpowiednio z serca 23-tygodniowej kury nioski i 2-tygodniowej gęsi. Uważa się jednak, że niektóre enterokoki związane są z konkretnym gospodarzem, jak *E. columbae*, który jest specyficzny dla gołębi (Devriese i wsp., 1990).

Należy również podkreślić, że w badaniach prezentowanych przeze mnie *E. gallinarum* był trzecim najczęściej izolowanym z serca gatunkiem u młodych kurcząt brojlerów (<10 dni). Co ważniejsze, był to drugi najczęstszy gatunek *Enterococcus* spp. izolowany od indyków, chociaż enterokok ten został pierwotnie opisany u kurcząt. Tankson i wsp. (2002) zasugerowali, że serce i płuca zdrowych młodych ptaków nie mają rezydującej mikrobioty, ale raczej mogą być okresowo kolonizowane przez bakterie oportunistyczne po wykluciu. Możliwe jest, że niektóre z tych bakterii, w tym enterokoki, mogą wywoływać patologiczne zmiany, jeśli zaistnieją ku temu odpowiednie warunki. Wykazano, że rozwój zakażenia i chorobotwórcze właściwości enterokoków zależą od ich zdolności do kolonizacji, translokacji, skutecznego

wymykania się systemom obronnym gospodarza oraz możliwości przeżycia w komórkach fagocytarnych i zdolności uszkodzania tkanek w następstwie toksycznego działania enzymów wydzielanych przez te drobnoustroje (Rakita i wsp. 1999, Koch i wsp. 2004).

Zaobserwowałam również kilka typowych objawów klinicznych i/lub sekcyjnych w przebiegu zakażeń u ptaków, wywoływanych głównie przez *E. cecorum* i *E. hirae*, obejmujących zapalenie stawów kręgosłupa, zapalenie stawów i zakażenie szpiku kostnego (*E. cecorum*) oraz zapalenie wsierdzia (*E. hirae*). Niestety, większość gatunków *Enterococcus* wraz z innymi bakteriami powodowała zakażenia mieszane, więc nie można było wyciągnąć wniosków na temat ich chorobotwórczego znaczenia, pomimo iż w literaturze opisywane są konkretne schorzenia (pkt. I - Wprowadzenie) przypisywane wyizolowanym przeze mnie gatunkom.

W **publikacji 2** wykazałam natomiast, że wśród 54 izolatów *Enterococcus* spp. wyizolowanych z wymazów pobranych z kloaki od 25 gatunków ptaków dzikich, *E. faecalis* był najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem (50%). Nieco rzadziej występował *E. faecium* (33,3%), a następnie *E. hirae* (9,3%), *E. durans* (3,7%) i *E. casseliflavus* (3,7%). W dostępnej literaturze, enterokoki u zwierząt dzikich, w tym ptaków, zwykle izolowano z próbek pobranych z ich odchodów.

Podsumowując uzyskane rezultaty można przyjąć, że drobnoustroje z gatunku *Enterococcus* spp. stanowią istotny czynnik infekcyjny zależny od wieku u drobiu hodowlanego. Najbardziej rozpowszechnionymi gatunkami zarówno u ptaków hodowlanych, jak i dzikich były *E. faecalis* i *E. faecium*. Otrzymane dane potwierdzają również, że inne gatunki bakterii z rodzaju *Enterococcus* mają duże zdolności adaptacyjne i mogą kolonizować gatunki ptaków, które nie są ich naturalnymi gospodarzami.

Wykorzystanie nowoczesnej metody opartej na spektrometrii mas typu MALDI-TOF umożliwiło identyfikację zróżnicowanych gatunków *Enterococcus* spp., które mogą występować w materiale diagnostycznym pozyskiwanym z różnych narządów ptaków.

5. Określenie fenotypowej lekowrażliwości *Enterococcus* spp. u drobiu i ptaków dzikich (**publikacje 1, 3**)

Nadużywanie antybiotyków, często o szerokim spektrum działania, w wielkotowarowym chowie drobiu prowadzi do pojawiania się i rozprzestrzeniania

opornych bakterii, jak również do ujawnienia się chorobotwórczego potencjału drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobioty ptaków.

Do fenotypowej oceny wrażliwości enterokoków na antybiotyki i chemioterapeutyki używałam metody dyfuzyjno-krażkowej (**publikacja 1**) oraz metody mikrorozcieńczeń w bulionie, polegającej na określeniu wartości MIC (*ang.* Minimal Inhibitory Concentration) - minimalnego stężenia hamującego wzrost mikroorganizmów (**publikacje 1 i 3**). Do określenia lekowrażliwości enterokoków najczęściej stosowane u drobiu substancje przeciwbakteryjne wykorzystywałam metodę dyfuzyjno-krażkową (**publikacja 1**), która jest stosowana w rutynowych badaniach mających na celu określenie lekowrażliwość bakterii. Natomiast do oceny lekowrażliwości *E. faecalis* (**publikacje 1 i 3**) i *E. faecium* (**publikacja 1**), tj. gatunków o znaczącym potencjale chorobotwórczym dla ludzi, zastosowałam metodę mikrorozcieńczeń w bulionie dla wybranych substancji przeciwbakteryjnych głównie tych, zalecanych w terapii zakażeń enterokokowych u ludzi i rekomendowanych do analiz przez CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) oraz EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (**publikacje 1 i 3**).

Wyniki badań, przedstawione w publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe, wykazały powszechne występowanie szczepów antybiotykoopornych wśród enterokoków izolowanych od drobiu i ptaków dzikich w Polsce. Dodatkowo, niepokojący jest fakt występowania szczepów wieloopornych wśród izolatów pozyskanych od tych zwierząt.

Wśród izolatów pochodzących od drobiu odnotowałam wysoką oporność (>50%) na sulfametoksazol z trimetoprimem - SXT (88%), tylozynę (71,4%), enrofloksacynę (69,4%), doksyicyklinę (67,3%) i linkomycynę ze spektynomycyną (56,1%). Zauważyłam również, że pewien odsetek izolatów był średnio wrażliwy szczególnie na enrofloksacynę (6,7%), linkomycynę ze spektynomycyną (4,5%), florfenikol (3,3%), doksyicyklinę (3%) i tylozynę (2,3%). Oporność na wankomycynę (0,11%; tylko jeden izolat *E. cecorum*), amoksycylinę (4%), amoksycylinę z kwasem klawulanowym (4,5%) i florfenikol (15,7%) została sklasyfikowana jako niska (<25%). Żaden ze szczepów *E. cecorum*, *E. casseliflavus*, *E. avium* i *E. columbae* nie był oporny na amoksycylinę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym.

Ze względu na ograniczoną liczbę izolatów *E. faecium* wyosobnionych od niosek i indyków, szczegółową analizę lekowrażliwości między różnymi gatunkami drobiu przeprowadziłam na szczepach *E. faecalis* (**publikacja 1**). Większość izolatów *E.*

faecalis pochodzących od brojlerów, kur niosek i indyków wykazywała oporność lub była średniowrażliwa na gentamycynę (odpowiednio 91,7%, 82,4% i 68,2%) oraz erytromycynę – (odpowiednio 52,8%, 88,2% i 100%). Najwyższą oporność na gentamycynę (niskiego stopnia) uzyskałam wśród izolatów *E. faecalis* wyisobnionych od brojlerów (51,4%). Ponadto stwierdziłam oporność na wysokie stężenia aminoglikozydów (gentamycynę) u dwóch szczepów *E. faecalis* wyizolowanych od brojlerów (MIC = 1024 mg l⁻¹). Odsetek szczepów opornych na erytromycynę wahał się w granicach od 33,4% do 70,6%, odpowiednio dla bakterii izolowanych od brojlerów i kur niosek, do 100% u izolatów pochodzących od indyków. Nie wykazałam oporności na wankomycynę u *E. faecalis* i *E. faecium*. Natomiast 1,4% izolatów *E. faecalis* i 10,5% *E. faecium* wyisobnionych od brojlerów było średniowrażliwych na wankomycynę (MIC = 8 mg l⁻¹). Obydwa gatunki tych enterokoków cechowały się wrażliwością na ampicylinę.

Wśród analizowanych bakterii z rodzaju *Enterococcus* pochodzących od ptaków dzikich, 100% było opornych na linkomycynę, a prawie połowa szczepów (48%) na tetracyklinę i doksycyklinę. Oporność na erytromycynę i ciprofloksycynę obserwowałam odpowiednio u 44% i 22% izolatów *Enterococcus* spp. Brak oporności na wysokie stężenia gentamycyny spowodował, że rozszerzyłam analizę lekowrażliwości badanych bakterii na inne aminoglikozydy, jak streptomycynę i kanamycynę. Okazało się, że odpowiednio 18% i 14% izolatów było opornych na streptomycynę i kanamycynę. Jeden izolat wykazywał niskiego stopnia oporność na penicylinę i ampicylinę (MIC = 32 mg l⁻¹) oraz na wankomycynę (MIC = 32 mg l⁻¹). Wszystkie izolaty pochodzące od ptaków dzikich były wrażliwe na chloramfenikol.

Dzięki wykorzystaniu metody dyfuzyjno-krażkowej i metody rozcieńczeń w podłożu bulionowym do analizy lekowrażliwości *E. faecalis* i *E. faecium* wykazałam, że oznaczenie wartości MIC pozwoliło na wykrycie szczepów średniowrażliwych na wankomycynę u drobiu. Występowanie średniowrażliwych bakterii z rodzaju *Enterococcus* spp. na dany antybiotyk może tłumaczyć obserwowane niepowodzenia lub problemy terapeutyczne pomimo oznaczenia lekowrażliwości na podstawie antybiogramów metodą dyfuzyjno-krażkową, na podstawie których są one często klasyfikowane jako wrażliwe. Należy podkreślić, że otrzymane przeze mnie rezultaty w zakresie oporności badanych izolatów na wankomycynę były zbieżne z opublikowanym w zbliżonym czasie raportem Unii Europejskiej (2013 r.), który wskazywał na niską oporność na wankomycynę bakterii z gatunku *E. faecium* (0,1%) i *E. faecalis* (0,6%)

izolowanych ze stad brojlerów (EFSA/ECDC - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2015). Uzyskane w prezentowanych badaniach własnych rezultaty, jako jedne z pierwszych, charakteryzowały pochodzące z Polski izolaty tych dwóch gatunków pod względem oporności na wankomycynę. Jest to niezwykle istotne, ponieważ Polska do tej pory nie raportowała danych dotyczących lekowrażliwości enterokoków i tym samym nie była uwzględniana w sprawozdaniach EFSA/ECDC, co uniemożliwiało uzyskiwanie informacji przydatnych w celach statystycznych na ten temat z naszego kraju.

Odnosiłam również, że odporne na tylozynę izolaty *Enterococcus* spp. pochodzące od drobiu cechowały się również krzyżową opornością na erytromycynę. Dodatkowo, enterokoki odporne na makrolidy (erytromycyna, tylozyna) często charakteryzowały się opornością na linkomycynę. Ponadto, podobnie jak inni autorzy (Cauwerts i wsp. 2007), zauważyłam, że szczepy posiadające fenotyp MLS_B (makrolidy-linkozamidy-streptograminy B) były jednocześnie odporne na tetracykliny.

Niewrażliwość na ciprofloksacynę analizowanych przeze mnie enterokoków izolowanych od dzikich ptaków, jak również wśród bakterii tego rodzaju pozyskanych z mięsa drobiowego (Różańska i wsp. 2015) oraz świń (Nowakiewicz i wsp. 2017) w Polsce może wskazywać na selekcję krzyżową tych bakterii wskutek częstego stosowania enrofloksacyny u zwierząt w hodowlach wielkotowarowych. Podejrzenia te potwierdza wysoki odsetek szczepów wyizolowanych od drobiu opornych na enrofloksacynę w przeprowadzonych przeze mnie badaniach. Izolowanie lekoopornych *Enterococcus* spp. od wyżej wspomnianych zwierząt sugeruje, że mikroorganizmy te mogą występować także w żywności, co stanowi potencjalne zagrożenie dla konsumentów i może przyczyniać się do rozprzestrzeniania lekooporności wśród innych bakterii, w tym wśród patogenów ludzkich i zwierzęcych. Bakterie wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających im przekazywanie genów warunkujących to zjawisko osobnikom innych gatunków, także niespokrewnionych, m.in. z wykorzystaniem ruchomych elementów genetycznych, takich jak np. plazmidy, które stanowią główne źródło takich genów i są odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki.

Różnice w stopniu oporności na antybiotyki enterokoków pochodzących od drobiu i ptaków dzikich w Polsce i w krajach Europy (Maasjost i wsp. 2015; Radhouani i wsp. 2011, 2012; Santos i wsp. 2013; Splichalova i wsp. 2015) mogą odzwierciedlać odmienne zasady stosowania poszczególnych grup leków u zwierząt w określonych

regionach geograficznych (EFSA/ECDC, 2015; EMA - European Medicines Agency, 2016). Ważnym z punktu widzenia zagrożeń dla innych zwierząt, a pośrednio także dla człowieka jest również fakt, że dzikie ptaki, od których pobierałam materiał do badań, nie były narażone na bezpośrednią presję związaną ze stosowaniem leków przeciwbakteryjnych. Mimo to, wyizolowane przeze mnie szczepy *E. faecalis* wykazywały fenotypową oporność na wiele badanych antybiotyków. Otrzymane wyniki mogą być związane z faktem, że badane ptaki pochodziły z obszarów, gdzie działalność człowieka mogła negatywnie oddziaływać na środowisko. Były one bowiem znalezione głównie w pobliżu dużych aglomeracji.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że dane prezentowane w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, charakteryzujące lekooporność klinicznych szczepów enterokoków izolowanych od drobiu i stanowiących element mikrobioty przewodu pokarmowego u ptaków dzikich na terenie Polski były pierwszymi w naszym kraju oraz jednymi z nielicznych na świecie. Warto też podkreślić, że wykazana w czasie badań oporność na penicyliny i/lub aminoglikozydy u enterokoków prawdopodobnie radykalnie by ograniczyła lub nawet wyeliminowała możliwość stosowania skojarzonej terapii z użyciem tych grup antybiotyków w celu uzyskania synergicznego działania bakteriobójczego zarówno u zwierząt jak i u ludzi. Ponadto alarmujący jest stan, w którym szczep o takim fenotypie oporności jest jednocześnie oporny na wankomycynę, która jest antybiotykiem tzw. ostatniej szansy.

6. Analiza genotypowych profili lekowrażliwości *Enterococcus faecalis* izolowanych od ptaków dzikich oraz określenie ich pokrewieństwa genetycznego przy wykorzystaniu metod typowania molekularnego – PFGE oraz MLST oraz ocena roli ptaków dzikich w kontekście rezerwuaru i rozprzestrzeniania lekoopornych klonów *E. faecalis*.

Pomimo, że enterokoki są powszechnie uważane za bakterie komensalne, w sprzyjających warunkach mogą one również być odpowiedzialne za wywoływanie licznych chorób u ptaków. Zwiększenie częstości występowania zakażeń wywołanych przez wielooporne bakterie z rodzaju *Enterococcus* u zwierząt, zwłaszcza w hodowlach fermowych, oraz u ludzi jest również głównym problemem związanym z występowaniem i rozprzestrzenianiem się tych drobnoustrojów w środowisku, a tym samym wśród zwierząt dzikich. Istnieje niewiele danych na temat wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe enterokoków izolowanych od dzikich zwierząt na świecie (Silva i wsp. 2010, Radhouani i wsp. 2012, Santos i wsp. 2013), a zwłaszcza w Polsce

(Nowakiewicz i wsp. 2014). Jednakże ocena fenotypu bakterii, w tym ich lekowrażliwości, w badaniu epidemiologicznym uważana jest jedynie za wstępne badanie wymagające weryfikacji przy użyciu zaawansowanych metod badawczych, takich jak metody typowania molekularnego. Spośród stosowanych metod typowania molekularnego enterokoków, najczęściej wymieniane są MLST i PFGE. Metoda MLST polega na porównaniu profili allelicznych genów metabolizmu podstawowego bakterii, natomiast PFGE obejmuje analizę restrykcyjną chromosomalnego DNA połączoną z elektroforezą pulsową. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem metody MLST są powtarzalne i porównywalne między laboratoriami. Ponadto jest ona przydatna w globalnych dociekaniach epidemiologicznych. Podobnie, metoda PFGE cechuje się powtarzalnością uzyskanych wyników oraz wysokim potencjałem różnicującym analizowanych szczepów, stąd nadal uważana jest za tzw. „złoty standard” metod wykorzystywanych w typowaniu większości drobnoustrojów.

W publikacji 3 przeprowadziłam analizę genotypowych profili lekowrażliwości *Enterococcus faecalis* izolowanych od ptaków dzikich oraz określiłam ich pokrewieństwo genetyczne przy wykorzystaniu metod PFGE oraz MLST.

Antybiotykooporne szczepy *E. faecalis* badałam za pomocą PCR w celu wykrycia następujących genów oporności:

- Glikopeptydy: *vanA*, *vanB*, *vanD* – dipeptyd końcowy D-Ala-D-Lac; *vanC1*, *vanC2/C3*, *vanE*, *vanG* – dipeptyd końcowy D-Ala-D-Ser

Oporność bakterii z rodzaju *Enterococcus* spp. na wankomycynę jest wynikiem syntezy zmienionych prekursorów mureiny, D-alanino-D-mleczanu i D-alanino-D-seryny. Dipeptydy te włączane są zamiast D-alanylo-D-alaniny w łańcuch prekursora, który bierze udział w budowie ściany komórkowej, co uniemożliwia wankomycynie blokowanie syntezy peptydoglikanów.

- Penicyliny: *pbp5* – zmiany w białkach PBP (*ang.* Penicilin Binding Protein), co skutkuje zmniejszonym powinowactwem tych białek do β -laktamów; *blaZ* – gen kodujący wytwarzanie enzymów hydrolizujących pierścień β -laktamowy w cząsteczce antybiotyku

Modyfikacje w białkach PBP następują wskutek gromadzenia mutacji w genach *pbp* lub nabywania ich zmutowanych fragmentów od innych organizmów i zastępowania nimi homologicznych odcinków genów własnych.

- Aminoglikozydy: *aph(3')-IIIa* - gen kodujący fosfotransferazę APH(3')IIIa modyfikującą kanamycynę; *ant(6)-Ia* - gen kodujący nukleotydylotransferazę ANT(6)-Ia modyfikującą streptomycynę
- Tetracykliny: *tet(M)*, *tet(O)* - geny kodujące białka chroniące rybosomy przed działaniem tetracykliny; *tet(L)*, *tet(K)* - geny kodujące białka błony cytoplazmatycznej o charakterze pomp
- Makrolidy: *erm(A)*, *erm(B)* - geny kodujące enzymy modyfikujące lek o aktywności metylazy; *msr(A/B)*, *msr(C)* - geny kodujące białka z rodziny transporterów ABC odpowiedzialne za aktywne wypompowywanie leku z komórki
- Linkozamidy: *lnuA* - gen kodujący O-nukleotydylotransferazę modyfikującą antybiotyk.

Na podstawie przeprowadzonej analizy genotypowej wykazałam, że wśród izolatów *E. faecalis* pochodzących od ptaków dzikich w Polsce oporność na tetracykliny jest wynikiem obecności genów *tet(M)* i/lub *tet(L)*. Geny te wykryłam u 85% izolatów opornych na tetracykliny. Żaden z badanych izolatów bakteryjnych nie posiadał genu *tet(K)* ani *tet(O)*. Podczas analizy wzorców genetycznej oporności zauważyłam, że geny *tet(M)* i *tet(L)* występowały zwykle jednocześnie i w tym samym szczepie z genem *erm(B)*. Gen *erm(B)* jest często związany z genem *tet(M)* w wysoce mobilnym transpozonie koniugacyjnym *Tn916/Tn1545*, który dominuje w klinicznych szczepach bakterii Gram-dodatnich (De Leener i wsp. 2004).

Z kolei gen *erm(B)* wykryłam u wszystkich opornych na erytromycynę szczepów *E. faecalis*, podczas gdy dwa z nich dodatkowo zawierały gen *erm(A)*, a jeden izolat posiadał także gen *msr(A/B)*. Obecność genu *msr(C)* nie została potwierdzona w żadnym z izolatów opornych na makrolidy. Żaden z opornych na linkomycynę izolatów bakteryjnych nie posiadał genu *lnuA*. Inni autorzy odnotowali również, że oporność na makrolidy w obrębie gatunku *E. faecalis* różnego pochodzenia, w tym od dzikich ptaków, była głównie związana z genem *erm(B)* (Cauwerts i wsp. 2007, Radhouani i wsp. 2012, Santos i wsp. 2013), który nadaje oporność krzyżową na antybiotyki z grupy MLS_B (makrolidy, linkozamidy i streptograminy B).

Wykazałam także, że oporność fenotypowa na kanamycynę i streptomycynę u badanych izolatów *E. faecalis* warunkowana była obecnością odpowiednio genu *aph(3')-IIIa* i *ant(6)-Ia*. Występowanie obydwu tych genów stwierdzono również u *E. faecalis* izolowanych od myszołowów zwyczajnych (*Buteo buteo*) w Portugalii

(Radhouani i wsp. 2012). Wykazano także, że geny te znajdują się na transpozonach i dlatego mogą być łatwo przenoszone do szczepów tego samego lub nawet innych gatunków bakterii (Hegstad i wsp. 2010).

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach nie udało się wyjaśnić mechanizmu oporności *E. faecalis* na penicyliny i glikopeptydy. Izolat, który był jednocześnie oporny na penicyliny i wankomycynę, nie posiadał genów *blaZ* i *pbp5*, a także wszystkich badanych genów warunkujących oporność na glikopeptydy. Dane literaturowe przedstawiają brak analizy genów warunkujących oporność na penicyliny, chociaż niektórzy autorzy stwierdzali okazjonalnie obecność szczepów *E. faecalis* opornych na ampicylinę w populacjach ptaków dzikich (Radhouani i wsp. 2011, Santos i wsp. 2013, Splichalova i wsp. 2015). Podobnie do badań przedstawionych w **publikacji 3**, brak genów warunkujących oporność na glikopeptydy odnotowali na Słowacji także Splichalova i wsp. (2015) u dwóch szczepów *E. faecalis* średniowrażliwych na wankomycynę, otrzymanych od zimorodków zwyczajnych (*Alcedo atthis*). W przeciwieństwie do tych danych, w badaniach innych autorów (Santos i wsp. 2013) wykazano obecność genu *vanA* u jednego szczepu *E. faecalis* uzyskanego od ptaków dzikich na Azorach.

Podczas określania różnicowania genetycznego izolatów *E. faecalis* (**publikacja 3**) okazało się, że oparta na sekwencjonowaniu genów metoda MLST cechowała się nieco mnieszą siłą dyskryminującą w porównaniu do typowania metodą PFGE, co wykazałam przy pomocy indeksu Simpsona. Jednak typy sekwencyjne zostały poprawnie zdefiniowane i mogą być wykorzystane w laboratoriach na całym świecie.

We wszystkich badanych izolatach *E. faecalis* stwierdziłam 22 pulsotypy i 18 typów sekwencyjnych (ST), wśród których ustalonych zostało siedem nowych ST (ST748-ST753 i ST764). Interesujące jest to, że nowe typy sekwencyjne zaobserwowałam u ptaków dzikich znalezionych w pobliżu dużych aglomeracji miejskich.

Najczęściej występującymi typami sekwencyjnymi były ST290, ST374, ST287 oraz ST34. Pozostałe osiem ST wykryłam tylko jednokrotnie (ST81, ST175, ST753, ST165, ST16, ST21, ST35, ST232).

Na podstawie typowania opartego o metodę MLST wykazałam, że badane szczepy *E. faecalis* nie są ze sobą powiązane, z wyjątkiem trzech par izolatów, oznaczonych jako ST81 i ST752, ST175 i ST753 oraz ST165 i ST748. Analiza sekwencji wykazała, że nowo opisany u dzikich ptaków ST748 różnił się trzema

nukleotydamy od ST165, natomiast ST752 i ST753 tylko pojedynczym nukleotydem od odpowiednio ST81 i ST175. Ponadto zaobserwowałam, że izolaty pochodzące od ptaków dzikich w Polsce były bardziej zróżnicowane w typowaniu PFGE, niż szczepy *E. faecalis* należące do tych samych ST lub CC, które były nieodróżnialne lub przynajmniej blisko spokrewnione (Freitas i wsp. 2011a, Choi i Woo 2013; Oravcova i wsp. 2014). Udowodniłam także, że tylko cztery izolaty charakteryzujące się identycznym wzorcem oporności i przypisane do ST374 (CC116), wykazywały ten sam pulsotyp. Podobnie, dwa izolaty ST34 były nie do odróżnienia z wykorzystaniem techniki PFGE, jak również dwa z czterech izolatów ST290, które nie były związane z dwoma pozostałymi izolatami *E. faecalis* ST290. Pozostałe izolaty również nie były powiązane z pulsotypem, chociaż należały do tego samego ST lub różniły się jednym lub trzema allelami. Podkreśla to nie tylko plastyczność klonów enterokokowych, które są zdolne do ewolucji w wyniku transferu horyzontalnego różnych genów lub występujących mutacji, ale także potencjalne trudności w ustaleniu powiązań epidemiologicznych między szczepami w niektórych przypadkach (Freitas i wsp. 2011b).

Trzy z najczęściej występujących typów sekwencyjnych *E. faecalis* (ST290, ST374 i ST 287), izolowanych w badanej populacji ptaków dzikich, były wcześniej wykazane u świń, kurcząt, hospitalizowanych i niehospitalizowanych ludzi, a także w ściekach (Jorgensen i wsp. 2017, PubMLST 2017). Kolejne dwa szczepy przypisane do ST34, wykryto poprzednio u zimorodka zwyczajnego na Słowacji (Splichalova i wsp. 2015), ale również u hospitalizowanych ludzi i w odchodach drobiu (Freitas i wsp. 2011b, PubMLST 2017). Szczepy *E. faecalis* ST81, ST165 i ST175, wszystkie wykryte w czasie badań własnych w badanej populacji ptaków dzikich, były również związane z zakażeniami u ludzi (Kawalec i wsp. 2007, Quinones i wsp. 2009, Cai i wsp. 2015, PubMLST 2017), występowały także w przypadkach zapalenia wsierdza i posocznicy u drobiu, a także u gołębi grzywaczy (*Columba palumbus*) (PubMLST 2017).

Ponadto izolaty należące do ST35 i ST232, pochodzące od dzikich ptaków w Polsce, były już wcześniej izolowane od ludzi i zwierząt (Freitas i wsp. 2009), z mięsa drobiowego (Choi i Woo 2013) oraz hospitalizowanych i niehospitalizowanych pacjentów (PubMLST 2017).

Warto zauważyć, że dwa typy sekwencyjne (ST16 i ST21) wyizolowane od ptaków dzikich w Polsce, scharakteryzowano wcześniej jako klony epidemiczne w

polskich szpitalach (Kawalec i wsp. 2007) oraz w niektórych szpitalach europejskich (Kuch i wsp. 2012).

Występowanie szczepów *E. faecalis* przypisanych do tych samych ST u ptaków dzikich oraz w populacjach innych niż zwierzęta dzikie wskazuje, że wiele gatunków tych ptaków może stanowić źródło *E. faecalis* w przypadku zakażeń u ludzi, zwierząt domowych i zwierząt hodowlanych. Obecność licznych determinant oporności, zwłaszcza tych, które mogą być zlokalizowane na ruchomych elementach genetycznych, stanowi zagrożenie rozprzestrzeniania się lekooporności w obrębie bakterii tworzących mikrobiotę i patogenów, kolonizujących m.in. przewód pokarmowy i w środowisku, z udziałem ptaków dzikich.

7. Diagnostyka opisanego po raz pierwszy na świecie przypadku zapalenia wsierdza u kurcząt brojlerów z udziałem *Staphylococcus simulans* wraz z charakterystyką fenotypową czynnika etiologicznego (publikacja 5).

Przedmiotem badań była identyfikacja izolatów *S. simulans* w oparciu o klasyczne i nowoczesne techniki (MALDI-TOF MS, sekwencjonowanie) oraz charakterystyka fenotypowa tego gatunku bakterii w aspekcie potencjalnego zagrożenia dla zdrowia i życia ludzi.

Wiedza nabyta w czasie prowadzonych badań została wykorzystana praktycznie w celu diagnostyki zapalenia wsierdza u kurcząt brojlerów. W stadzie liczącym 35000 30-dniowych kurcząt brojlerów kurzych Ross 308 odnotowano upadki początkowo w ilości około 30 sztuk dziennie (w szczytowym okresie choroby upadki wynosiły 112 sztuk dziennie). Część padłych ptaków została znaleziona w pozycji leżącej na grzbiecie. Przed śmiercią u ptaków obserwowano także objawy kulawizny. Spośród dostarczonych do badania kurcząt, 10 sztuk poddałam diagnostyce sekcyjnej, histopatologicznej, bakteriologicznej i molekularnej oraz wykonałam fenotypową analizę wybranych cech zjadliwości. Na podstawie przeprowadzonych badań ustaliłam, że przyczyną choroby był *Staphylococcus simulans*.

U kurcząt z najbardziej zaawansowanymi zmianami anatomopatologicznymi obserwowano zaokrąglone serce, kalafiorowate włóknikowe zmiany wegetatywne na lewej zastawce przedsionkowo-komorowej, kremowe ogniska nekrotyczne o różnej wielkości w wątrobie oraz martwicę szyjki lub chrząstki kości udowej. Na powierzchni wątroby obserwowano także nitkowate strzępki włóknika. W badaniu histopatologicznym serca stwierdzono wielogniskowe konglomeraty kolonii bakterii

przylegające do endokardium zastawki. Wokół skupisk komórek bakteryjnych obserwowano strzępki włókniaka i komórki zapalne z heterofilami. Obraz mikroskopowy wskazywał na bakteryjne zapalenie zastawek z charakterystycznym wegetatywnym zapaleniem wsierdza. Na podstawie badania bakteriologicznego (liczne kolonie w czystej kulturze) oraz identyfikacji czynnika etiologicznego przy zastosowaniu komercyjnych testów diagnostycznych API ID32 Staph, technik opartych na spektrometrii mas typu MALDI-TOF oraz sekwencjonowania z wykorzystaniem genów *rpoB* i *dnaJ* wykazałam, że przyczyną opisywanych zmian były bakterie *S. simulans*. Wyzolowane szczepy odporne były na metycylinę, rifampicynę, sulfadimetoksynę i sulfatiazol. Ocena wybranych czynników wirulencji wykazała, że badane izolaty nie wytwarzały hemolizyny/cytolizyny, koagulazy i DNAzy, ale produkowały proteazy i zewnątrzkomórkowe polisacharydy (śluz).

Wytwarzanie śluzu przez gronkowce koagulazo-ujemne jest jednym z istotnych elementów w pierwszym etapie patogenezy, co pomaga bakteriom przetrwać w zakażonym organizmie, chroniąc je przed mechanizmami obronnymi gospodarza (Piette i Verschraegen 2009). W kolejnym etapie zakażenia, po uprzedniej kolonizacji, bakterie wydzielają substancje o działaniu toksycznym lub destrukcyjnym na tkanki gospodarza. W omawianej pracy wykazałam również zdolność *S. simulans* do wytwarzania proteaz.

Do wystąpienia zapalenia wsierdza przyczyniła się prawdopodobnie obniżona odporność na skutek stresu wynikającego z upalnej i burzowej pogody podczas odchowu ptaków. Uważa się, że zwierzęta są potencjalnym rezerwuarem gronkowców opornych na metycylinę (Chah i wsp. 2014, Silva i wsp. 2014). Ponadto, Vallianou i wsp. (2008) przedstawili przypadek rzeźnika, u którego wystąpiło zapalenie kości i szpiku kręgow oraz zapalenie wsierdza wywołanego przez *S. simulans* opornego na metycylinę. Autorzy spekulowali, że mógł on ulec zakażeniu podczas pracy z bydłem i owcami i że przyczyniła się do tego osłabiona odporność wywołana nadużywaniem alkoholu. Zatem analogicznie można przyjąć, że istnieje realne zagrożenie przeniesienia zakażenia *S. simulans* od drobiu na ludzi.

Należy podkreślić, że jest to pierwszy opisany zarówno w Polsce, jak i na świecie przypadek kliniczny *endocarditis* o etiologii *S. simulans* u drobiu połączony z opartą na metodach fenotypowych i genotypowych identyfikacją oraz charakterystyką czynnika etiologicznego. Uzyskane w prezentowanych badaniach rezultaty potwierdzają również możliwość wykorzystania zastosowanych metod identyfikacji i charakterystyki analizowanych drobnoustrojów w diagnostyce tego schorzenia.

Podsumowanie

Podsumowując uzyskane w przedstawionych badaniach własnych rezultaty stanowiące omawiane osiągnięcie naukowe należy podkreślić, że mają one istotne znaczenie dla rozwoju diagnostyki mikrobiologicznej oraz badań nad etiologią schorzeń wywoływanych przez drobnoustroje oportunistyczne. Na szczególne podkreślenie zasługuje możliwość wykorzystania nowoczesnych i mniej kosztownych oraz pracochłonnych metod (MALDI-TOF MS, real-time LAMP) w identyfikacji i różnicowaniu odzwierzęcych patogenów oportunistycznych izolowanych od drobiu hodowlanego oraz ptaków dzikich, stanowiących również zagrożenie dla człowieka.

Niezwykle istotnym elementem jest nowatorskość przeprowadzonych analiz w oparciu o nowoczesne metody diagnostyczne w odniesieniu do badanych drobnoustrojów, które jak dotąd były wykorzystywane w bardzo nielicznych przypadkach lub (jak potwierdzono w warunkach krajowych) nie były dotychczas stosowane.

Uzyskane w prezentowanych badaniach wyniki przedstawione w formie 5 publikacji stanowiących dzieło habilitacyjne pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków końcowych:

1. Identyfikacja i charakterystyka bakterii oportunistycznych będących potencjalnymi czynnikami etiologicznymi chorób infekcyjnych u ptaków wymaga używania zaawansowanych metod fenotypowych i genotypowych.
2. Technika spektrometrii mas typu MALDI-TOF stanowi wiarygodne narzędzie fenotypowej identyfikacji drobnoustrojów oportunistycznych pochodzenia zwierzęcego. Cechuje się ona wysoką mocą dyskryminacyjną blisko spokrewnionych gatunków bakterii oportunistycznych, w tym enterokoków, co można wykorzystać jako alternatywę do kosztownych i pracochłonnych metod genetycznych.
3. Uzyskane wyniki wskazują na zależne od gatunku i wieku oraz stanu zdrowia drobiu różnice w częstotliwości izolacji enterokoków.
4. Potwierdzony w badaniach wysoki odsetek wieloopornych enterokoków w zakażeniach drobiu wskazuje na wzrost udziału tych bakterii w awiopatologii.
5. Dzikie ptaki, pomimo braku bezpośredniego kontaktu z substancjami przeciwbakteryjnymi, stanowią źródło opornych na antybiotyki szczepów *E. faecalis*, w tym także szczepów wieloopornych dysponujących licznymi genami oporności, co może być negatywną konsekwencją oddziaływania człowieka na środowisko i stwarzać

zagrożenia związane z transmisją tych mikroorganizmów do innych organizmów wrażliwych, w tym do człowieka.

6. Analiza zróżnicowania genetycznego badanych szczepów *E. faecalis* wykazała, że wiele klonów ST, wcześniej potwierdzonych poza populacją zwierząt dzikich, może również występować w przewodzie pokarmowym ptaków dzikich, co wskazuje na brak wyraźnej swoistości gospodarza zasiedlanego przez *E. faecalis*. Współistnienie szczepów przypisanych tym samym typom sekwencyjnym u dzikich ptaków oraz zwierząt domowych i ludzi wskazuje, że wiele gatunków dzikich ptaków może stanowić dla ludzi, zwierząt domowych i zwierząt gospodarskich potencjalne źródło *E. faecalis* i innych bakterii oportunistycznych, w tym szczepów wielolekoopornych. Uwzględniając migrację ptaków w Europie, a nawet między kontynentami, ten sam czynnik etiologiczny może wystąpić w odległych miejscach, przyczyniając się także do rozprzestrzeniania lekooporności.

7. Po raz pierwszy wyizolowano, zidentyfikowano oraz scharakteryzowano *Staphylococcus simulans* jako czynnik etiologiczny rozpoznanego i opisanego przypadku *endocarditis* u kurcząt brojlerów na świecie.

8. Uzyskane z wykorzystaniem metod fenotypowych i genotypowych dane na temat bakterii oportunistycznych izolowanych od ptaków hodowlanych i dzikich mają znaczenie praktyczne i mogą być wykorzystywane w laboratoriach/gabinetach weterynaryjnych w celu opracowania procedur diagnostycznych i terapeutycznych.

9. Wykazana wysoka wrażliwość badanych izolatów bakteryjnych wyosobnionych od drobiu na amoksycylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym i florfenikol ma charakter aplikacyjny i kliniczny, i może być wykorzystana w praktyce weterynaryjnej przy zwalczaniu zakażeń powodowanych przez enterokoki.

10. Opracowana w toku badań specyficzna metoda real-time LAMP przeznaczona do identyfikacji *Gallibacterium anatis* (GA), jest pierwszym opisanym i zastosowanym praktycznie wykorzystaniem tej techniki do identyfikacji bakterii oportunistycznych o dużych wymaganiach wzrostowych.

IV. Piśmiennictwo

1. Abe Y., Nakamura K., Yamada M., Yamamoto Y. Encephalomalacia with *Enterococcus durans* infection in the brain stem and cerebral hemisphere in chicks in Japan. *Avian Diseases*, 2006, 50, 139–141.
2. Aubin G.G., Haloun A., Treilhaud M., Reynaud A., Corvec S. *Gallibacterium anatis* bacteremia in a human. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51, 3897-3899.

3. Berg G., Erlacher A., Smalla K., Krause R. Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our gut feeling? *Microbial Biotechnology*, 2014, 7, 487–495.
4. Bisgaard M. Arthritis in ducks. I. Aetiology and public health aspects. *Avian Pathology*, 1981, 10, 11–21.
5. Bojesen A.M., Christensen H., Nielsen O.L., Olsen J.E., Bisgaard M. Detection of *Gallibacterium* spp. in chickens by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41, 5167–5172.
6. Bojesen A.M., Vazquez M.E., Robles F., Gonzalez C., Soriano E.V., Olsen J.E., Christensen H. Specific identification of *Gallibacterium* by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. *Veterinary Microbiology*, 2007, 123, 262–268.
7. Cai J., Wang Y., Schwarz S., Lv H., Li Y., Liao K., Yu S., Zhao K., Gu D., Wang X., Zhang R., Shen J. Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010–2014. *Clinical Microbiology and Infection*, 2015, 21, 1095.e1–1095e4.
8. Cauwerts K., Decostere A., De Graef E.M., Haesebrouck F., Pasmans F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. *Avian Pathology*, 2007, 36, 395–399.
9. Chah K.F., Gómez-Sanz E., Nwanta J.A., Asadu B., Agbo I.C., Lozano C., Zarazaga M., Torres C. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from healthy dogs in Nsukka, Nigeria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 45, 215–220.
10. Choi J.M., Woo G.J. Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 165, 1–6.
11. Corrand L., Lucas M.N., Douet J.Y., Etienne C.L., Albaric O., Cadec A., Guérin J.L. A case of unilateral periorbital cellulitis and mandibular osteomyelitis in a turkey flock. *Avian Diseases*, 2012, 56, 427–431.
12. De Herdt P., Defoort P., Van Steelant J., Swam H., Tanghe L., Van Goethem S., Vanrobaeys M. *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2009, 78, 44–48.
13. De Leener E., Martel A., Decostere A., Haesebrouck F. Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and *Tn1545*-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microbial Drug Resistance*, 2004, 10, 341–345.
14. Devriese L.A., Cauwerts K., Hermans K., Wood A.M. *Enterococcus cecorum* septicemia as a cause of bone and joint lesions resulting in lameness in broiler chickens, *Vlaams Diergen Tijds.* 2002, 71, 219–221.
15. Devriese L.A., Ceysens K., Rodrigues U.M., Collins M.D. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 59, 247–251.
16. Devriese L.A., Uyttebroek E., Dom P., De Herdt P., Ducatelle R., Haesebrouck F. *Staphylococcus hyicus* associated with pox in chickens and in turkeys. *Avian Pathology*, 1992, 21, 529–533.

17. Dousse F., Thomann A., Brodard I., Korczak B.M., Schlatter Y., Kuhnert P., Miserez R., Frey J. Routine phenotypic identification of bacterial species of the family *Pasteurellaceae* isolated from animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2008, 20, 716-724.
18. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, 2015, 13, 4036.
19. European Medicines Agency. 2016. Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014. *6th ESVAC Report*. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, London, United Kingdom, str.175.
20. Fertner M.E., Olsen R.H., Bisgaard M., Christensen H. Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2011, 53, 56.
21. Freitas A.R., Coque T.M., Novais C., Hammerum A.M., Lester C.H., Zervos M.J., Donabedian S., Jensen L.B., Francia M.V., Baquero F., Peixe L. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011a, 49, 925-931.
22. Freitas A.R., Novais C., Correia R., Monteiro M., Coque T.M., Peixe L. Non-susceptibility to tigecycline in enterococci from hospitalised patients, food products and community sources. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011b, 38, 174-176.
23. Freitas A.R., Novais C., Garbojosa P.R., Coque T.M., Peixe L. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 63, 1104-1111.
24. Gautier A.L., Dubois D., Escande F., Avril J.L., Trieu-Cuot P., Gaillot O. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43, 2307-2314.
25. Gilmore M.S., Lebreton F., van Schaik W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16, 10-16.
26. Han J.I., Lee S.J., Jang H.J., Kim J.H., Na K.J. Isolation of *Staphylococcus simulans* from dermatitis in a captive African pygmy hedgehog. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2011, 42, 277-280.
27. Hegstad K., Mikalsen T., Coque T.M., Werner G., Sundsfjord A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology Infection*, 2010, 16, 541-554.
28. Huangfu H., Zhao J., Yang X., Chen L., Chang H., Wang X., Li Q., Yao H., Wang C. Development and preliminary application of a quantitative PCR assay for detecting gtxA-containing *Gallibacterium* species in chickens. *Avian Diseases*, 2012, 56, 315-320.
29. Jørgensen S.L., Poulsen L.L., Thorndal L., Ronaghinia A.A., Bisgaard M., Christensen H. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolated from the cloaca of “fancy breeds” and confined chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122, 1149-1158.

30. Kaukas A., Hinton M., Linton A. H. The effect of ampicillin and tylosin on the faecal enterococci of healthy young chickens. *Journal of Applied Bacteriology*, 1987, 62, 441–447.
31. Kawalec M., Pietras Z., Daniłowicz E., Jakubczak A., Gniadkowski M., Hryniewicz W., Willems R.J.L. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45, 147-153.
32. Koch S., Hufnagel M., Theilacker C., Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 2004, 22, 822-830.
33. Kolbjørnsen Ø., David B., Gilhuus M. Bacterial osteomyelitis in a 3-week-old broiler chicken associated with *Enterococcus hirae*. *Veterinary Pathology*, 2011, 48, 1134-1137.
34. Kuch A., Willems RJ, Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Sundsfjord A, Klare I, Ruiz-Garbajosa P, Simonsen GS, van Luit-Asbroek M, Hryniewicz W., Sadowy E. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67, 551-558.
35. Lilenbaum W., Esteves, A.L., Souza G.N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 28, 448–452.
36. Maasjost J., Mühldorfer K., Cortez de Jäckel S., Hafez H.M. Antimicrobial susceptibility patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from poultry flocks in Germany. *Avian Diseases*, 2015, 59, 143-148.
37. Males B.M., Bartholomew W.R., Amsterdam D. *Staphylococcus simulans* septicemia in a patient with chronic osteomyelitis and pyarthrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1985, 21, 255 – 257.
38. Mallet M., Loiez C., Melliez H., Yazdanpanah Y., Senneville E., Lemaire X. *Staphylococcus simulans* as an authentic pathogenic agent of osteoarticular infections. *Infection*, 2011, 39, 473-476.
39. Marek A., Stępień-Pyśniak D., Pyzik E., Adaszek Ł., Wilczyński J., Winiarczyk S. Occurrence and characterization of *Staphylococcus* bacteria isolated from poultry in Western Poland. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2016, 129, 3/4, 147-152.
40. McNamee P.T., McCullagh J.J., Throp B.H., Ball H.J., Graham D.G., Mc Cullough S.J., McConaghy D., Smyth, J.A. Study of leg weakness in two commercial broiler flocks. *Veterinary Record*, 1998, 143, 131-135.
41. McNamee P.T., Smyth J.A. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: a review. *Avian Pathology*, 2000, 29, 253-270.
42. Neubauer C., De Souza-Pilz M., Bojesen A.M., Bisgaard M., Hess M. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. *Avian Pathology*, 2009, 38, 1–7.
43. 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:e0171160.
44. Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Zięba P., Kostruba A. Undomesticated animals as a reservoir of multidrug-resistant *Enterococcus* in eastern Poland. *Journal of Wildlife Disease*, 2014, 50, 645-650.

45. Olsen R.H., Frantzen C., Christensen H., Bisgaard M. An investigation on first-week mortality in layers. *Avian Diseases*, 2012a, 56, 51-57.
46. Olsen R.H., Schønheyder H.C., Christensen H., Bisgaard M. *Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis*. *Zoonoses Public Health*, 2012b, 59, 256–263.
47. Oravcova V., Ghosh A., Zurek L., Bardon J., Guenther S., Cizek A., Literak I. Vancomycin-resistant enterococci in rooks (*Corvus frugilegus*) wintering throughout Europe. *Environmental Microbiology*, 2013, 15, 548-556.
48. Oravcova V., Zurek L., Townsend A., Clark A.B., Ellis J.C., Cizek A., Literak I. American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with vanA gene. *Environmental Microbiology*, 2014, 16, 939-949.
49. Orrett F.A., Shurland S.M. Significance of coagulase-negative staphylococci in urinary tract infections in a developing country. *Connecticut Medicine*, 1998, 62, 199-203.
50. Paudel S., Alispahic M., Liebhart D., Hess M., Hess C. Assessing pathogenicity of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model: the respiratory and reproductive tracts of chickens are targets for bacterial colonization. *Avian Pathology*, 2013, 42, 527-535.
51. Penna B., Vargas R., Medeiros L., Martins G.M., Martins R.R., Lilenbaum W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 2010, 21, 292–296.
52. Piette A., Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*, 2009, 134, 45–54.
53. Poulsen L.L., Bisgaard M., Son N.T., Trung N.V., An H.M., Dalsgaard A. *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18, 1096–1100.
54. PubMLST. 2017. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. *Enterococcus faecalis* MLST databases. <https://pubmlst.org/efaecalis/>. Accessed March 2017.
55. Quinones D., Kobayashi N., Nagashima S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. *Microbial Drug Resistance*, 2009, 15, 287-293.
56. Quintela-Baluja M., Bohme K., Fernandez-No I.C., Morandi S., Alnakip M.E., Caamano-Antelo S., Barros-Velázquez J., Calo-Mata P. Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 2013, 34, 2240-2250.
57. Radhouani H., Igrejas G., Pinto L., Goncalves A., Coelho C., Rodrigues J., Poeta P. Molecular characterization of antibiotic resistance in enterococci recovered from seagulls (*Larus cachinnans*) representing an environmental health problem. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13, 2227-2233.
58. Radhouani H., Poeta P., Gonçalves A., Pacheco R., Sargo R., Igrejas G. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Medical Microbiology*, 2012, 61, 837-843.

59. Radhouani H., Silva N., Poeta P., Torres C., Correia S., Igrejas G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, 23.
60. Radimersky T., Frolkova P., Janoszowska D., Dolejska M., Svec P., Roubalova E., Cikova P., Cizek A., Literak I. Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109, 1687-1695.
61. Rakita R.M., Vanek N.N., Jacques-Palaz K., Mee M., Mariscalco M.M., Dunny G.M., Snuggs M., Van Winkle W.B., Simon S.I. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infection and Immunity*, 1999, 67, 6067-6075.
62. Różańska H., Lewtak-Piłat A., Osek J. Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from meat. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2015, 59, 229-233.
63. Rzewuska M., Szeleszczuk P., Binek M. Isolation of *Gallibacterium* spp. from peacocks with respiratory tract infections. *Medycyna Weterynaryjna*, 2007, 63, 1431-1433.
64. Sandhu T.S. Fecal streptococcal infection of commercial white pekin ducklings. *Avian Diseases*, 1988, 32, 570-573.
65. Santos T., Silva N., Igrejas G., Rodrigues P., Micael J., Rodrigues T., Resendes R., Gonçalves A., Marinho C., Gonçalves D., Cunha R., Poeta P. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*, 2013, 24, 25-31.
66. Silva N., Igrejas G., Figueiredo N., Gonçalves A., Radhouani H., Rodrigues J., Poeta P. Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Sciences of the Total Environment* 2010, 408, 4871-4876.
67. Silva N.C., Guimarães F.F., de P Manzi M., Gómez-Sanz E., Gómez P., Araújo-Júnior J.P., Langoni H., Rall V.L., Torres C. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology*, 2014, 106, 227-233.
68. Splichalova P, Svec P, Ghosh A, Zurek L, Oravcova V, Radimersky T, Bohus M, Literak I. Prevalence, diversity and characterization of enterococci from three coraciiform birds. *Antonie Van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology*, 2015, 107, 1281-1289.
69. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodie E, Lynch SV. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *Plos One*, 2015, 10, e0117617.
70. Stalker M.J., Brash M.L., Weisz A., Ouckama R.M., Slavic D.: Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *J Vet Diagn Invest.* 2010, 22, 643-645.
71. Steentjes A., Veldman K.T., Mevius D.J., Landman W.J. Molecular epidemiology of unilateral amyloid arthropathy in broiler breeders associated with *Enterococcus faecalis*, *Avian Pathol.* 2002, 31, 31-39.
72. Supré K., Haesebrouck F., Zadoks R.N., Vanechoutte M., Piepers S., De Vliegher, S. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94, 2329-2340.

73. Szeleszczuk P., Dolka B., Żbikowski A., Dolka I., Peryga M. Pierwszy przypadek enterokokowego zapalenia stawów kręgosłupa u kurcząt brojlerów w Polsce. *Medycyna Weterynaryjna*, 2013, 69, 298-303.
74. Tankson J. D., Thaxton J. P., Vizzier-Thaxton Y. Bacteria in heart and lungs of young chicks. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92, 443-450.
75. Tankson J.D., Thaxton J.P., Vizzier-Thaxton Y. Pulmonary hypertension syndrome in broilers caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 2001, 69, 6318–6322.
76. Tate C.R., Mitchell W.C., Miller, R.G. *Staphylococcus hyicus* associated with turkey stifle joint osteomyelitis. *Avian Diseases*, 1993, 37, 905-907.
77. Türkyilmaz S., Kaya O. Determination of some virulence factors in *Staphylococcus* spp. isolated from various clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2006, 30, 127-132.
78. Vallianou N., Evangelopoulos A., Makri P., Zacharias G., Stefanitsi P., Karachalios A., Avgerinos P. C. Vertebral osteomyelitis and native valve endocarditis due to *Staphylococcus simulans*: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 2008, 2, 183.
79. Velkers F.C, van de Graaf-Bloois L., Wagenaar J.A., Westendorp S.T., van Bergen M.A., Dwars R.M., Landman W.J. *Enterococcus hirae*-associated endocarditis outbreaks in broiler flocks: clinical and pathological characteristics and molecular epidemiology. *Veterinary Quarterly*, 2011, 31, 3-17.
80. Wang HH. Commensal bacteria, microbial ecosystems, and horizontal gene transmission: adjusting our focus for strategic breakthroughs against antibiotic resistance. In: Jaykus L-A, Wang HH, LS Schlesinger, (eds.). *Food-borne microbes: shaping the host ecosystem*, ASM Press, Washington, DC, 2009.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy nie wchodzący w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego liczy 37 publikacji, w tym 18 prac opublikowanych w czasopismach wyszczególnionych w bazie Journal Citation Reports (JCR), 11 artykułów w czasopismach nie posiadających współczynnika wpływu (IF), 7 artykułów popularno-naukowych oraz jeden rozdział w monografii (Zał. Nr 3, IIA1, IID1 i 2). Jestem także autorką i współautorką 35 komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Zał. Nr 3, IIK). Główny zakres i kierunek badań naukowych jest częściowo kontynuacją zainteresowań, które zostały przedstawione w moim doktoracie (występowanie i charakterystyka bakterii z rodzaju *Enterococcus*) oraz nowych zainteresowań nad problematyką zakażeń u drobiu wywoływanych przez rzadziej diagnozowane jako czynnik etiologiczny bakterie oportunistyczne, w tym *G. anatis*. Istotnym elementem tych zainteresowań jest ocena, czy i w jakim zakresie bakterie oportunistyczne występujące u ptaków, zwłaszcza hodowlanych, mogą

wywoływać choroby w tej grupie pacjentów oraz czy i w jakim zakresie mogą one stanowić zagrożenie dla zdrowia lub życia ludzi.

Poza pracami stanowiącymi osiągnięcie naukowe, brałam czynny udział w realizacji innych badań naukowych prowadzonych zarówno w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków jak i we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi. Główne kierunki tych badań obejmują takie zagadnienia jak:

- problematykę diagnostyki izolowanych od ptaków i ludzi bakterii o nietypowych właściwościach biochemicznych
- epidemiologia zakażeń u drobiu oraz analiza czynników wirulencji bakterii z rodzaju *Staphylococcus*
- wykorzystanie metod fizyko-chemicznych do oceny adhezji enterokoków
- ocena lekowrażliwości wybranych bakterii kolonizujących przewód pokarmowy u ptaków
- alternatywne metody kontrolowania zakażeń u ptaków hodowlanych
- występowanie i zróżnicowanie mikrobioty układu oddechowego organizmu ludzkiego
- opis przypadków klinicznych.

Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Po ukończeniu studiów na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w 2003 roku, rozpoczęłam studia doktoranckie w Zakładzie Profilaktyki Ogólnej i Chorób Ptaków pod kierownictwem prof. dr hab. Jerzego Rzedzickiego. Pierwszy okres mojej pracy naukowo-badawczej i klinicznej obejmował zapoznanie się z technikami diagnostycznymi i terapeutycznymi wykorzystywanymi w rozpoznawaniu i leczeniu chorób drobiu oraz ptaków ozdobnych oraz ich wykorzystaniu w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Ponadto uczestniczyłam także w pracach badawczych nad zakażeniami pałeczkami *Salmonella* spp. u drobiu, które były wówczas prowadzone w Zakładzie.

Rezultatem badań wstępnych, poczynionych obserwacji oraz przeanalizowania aktualnego piśmiennictwa w tym czasie jest autorstwo dwóch publikacji przeglądowych:

- **Stępień-Pyśniak D.:** Salmonellozy drobiu – wskazania do szczepień profilaktycznych. *Magazyn Weterynaryjny*, Suplement – drób, kwiecień – maj 2004, 59-62.

- **Stępień-Pyśniak D.:** Gruźlica ptaków i jej wpływ na zdrowie człowieka. *Polskie Drobniarstwo* 2004, 12, 41-42.

i trzech doniesień:

- **Stępień-Pyśniak D.,** Kolasa A.: Występowanie i rola flory bakteryjnej w jaju oraz układzie rozrodczym ptaków. Konferencja naukowa „Patologia narządu rozrodczego ptaków– etiologia, diagnostyka i zwalczanie” Polanica Zdrój 16-18.09.2005 r., str.131.
- Kolasa A., Rzedzicki J., **Stępień-Pyśniak D.** Kolonizacja jajnika i jajowodu oraz białka i żółtka u kur zakażonych pałeczkami *Salmonella*. Konferencja naukowa „Patologia narządu rozrodczego ptaków – etiologia, diagnostyka i zwalczanie” Polanica Zdrój 16-18.09.2005 r., str.139.
- **Stępień-Pyśniak D.,** Pyzik E.: Mikroflora bakteryjna wikłająca zakażenia jaj pałeczkami *Salmonella*. XII Kongres PTNW „Nauka praktyce” Warszawa 15-17.09.2004r., str. 353.

Efektym wymiernym kończącym ten etap mojej działalności naukowej było uzyskanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych w dniu 15.05.2008 r., na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie, na podstawie dysertacji doktorskiej pt.: „Ilościowa i jakościowa analiza mikroflory bakteryjnej jaj i jej aspekty epidemiologiczne”. Promotorem mojej pracy doktorskiej był prof. dr hab. Jerzy Rzedzicki.

Dorobek naukowy po uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych wyniki badań zawarte w rozprawie doktorskiej zostały przedstawione w dwóch pracach naukowych opublikowanych w czasopiśmie znajdującym się w bazie JCR.

- **Stępień-Pyśniak D.** Occurrence of Gram-negative bacteria in hens' eggs depending on their source and storage conditions. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2010, 13(3), 507-513.
- **Stępień-Pyśniak D.,** Marek A., Rzedzicki J. Occurrence of bacteria of the genus *Staphylococcus* in table eggs, taking into account the source of the eggs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2009, vol. 12(4), 481-484.

Ponadto, efekty badań, w których uczestniczyłam podczas studiów doktoranckich opublikowano w publikacji:

- Marek A., **Stępień-Pyśniak D.**, Rzedzicki J. Analysis of the correlation between the level of anti-*Salmonella* antibodies in egg yolks and the presence of these microorganisms in egg contents following experimental infection of hens with *Salmonella* Enteritidis and after treatment with selected antibiotics. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2009, vol. 12(4), 485-490.

Problematyka diagnostyki izolowanych od ptaków i ludzi bakterii o nietypowych właściwościach biochemicznych

Jednym z moich zainteresowań naukowych jest doskonalenie metod badawczych i opracowywanie nowych technik diagnostycznych, w tym wykorzystywanych w diagnostyce chorób ptaków. Zainteresowania te rozwijam poprzez uczestnictwo w różnych szkoleniach i stażach zarówno w Polsce, jak i za granicą. Komercyjne testy diagnostyczne, zwłaszcza te oparte o analizę właściwości biochemicznych bakterii, wykorzystywane do rutynowej diagnostyki w większości przeznaczone są do identyfikacji drobnoustrojów ludzkich. Okazuje się, że rutynowo stosowane metody diagnostyczne są niewystarczające do identyfikacji drobnoustrojów o nietypowych właściwościach biochemicznych lub rzadziej występujących, w tym drobnoustrojów pochodzących od zwierząt, czy środowiskowych. Konsekwencją nieprawidłowego zidentyfikowania czynnika etiologicznego choroby może być nieodpowiednie podejmowanie działań terapeutycznych czy prewencyjnych. W publikacji:

- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.**, Hauschild T., Banach T. Identification of strains with phenotypes similar to those of *Staphylococcus aureus* isolated from table chicken eggs using MALDI-TOF MS and genotyping methods. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2015, 59, 235-239.

wykazaliśmy, że izolaty otrzymane z jaj kurzych konsumpcyjnych zidentyfikowano za pomocą testu API ID32 Staph jako *Staphylococcus aureus*, niemniej jednak zaobserwowaliśmy ich ujemną reakcję w teście na obecność wolnej koagulazy i na tej podstawie nadaliśmy im nazwę roboczą *Staphylococcus aureus*-like. Test na obecność wolnej i związanej koagulazy (*ang.* clumping factor) jest podstawą w rutynowej identyfikacji w celu rozróżnienia koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych gronkowców. Dlatego w przypadku izolatów *S. aureus* nie wytwarzających koagulazy, podjęliśmy dalszą diagnostykę, której celem było określenie przydatności spektrometrii mas typu MALDI-TOF do wstępnej i wiarygodnej identyfikacji gatunkowej tych

gronkowców z jednoczesnym zastosowaniem weryfikującej metody molekularnej opartej na sekwencjonowaniu z wykorzystaniem genu *rpoB*. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na ustalenie, że wśród badanych izolatów *Staphylococcus aureus*-like dominowały trzy gatunki *Staphylococcus*: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* i *S. chromogenes*. Jeden izolat nie został zidentyfikowany metodą genetyczną, jednakże analiza widm spektralnych tego gronkowca pozwoliła ustalić, że był to *S. chromogenes*. Przedstawione wyniki wskazały, że identyfikacja bakterii przy użyciu MALDI-TOF MS jest porównywalna z metodami diagnostycznymi opartymi na analizie genu *rpoB* stanowiącego podstawę genetycznej identyfikacji gatunkowej gronkowców, pozwalając stwierdzić, że spektrometria mas jest tym samym przydatną, wiarygodną, prostą i mało pracochłonną metodą analityczną, która z powodzeniem może być wykorzystywana do identyfikacji odzwierzęcych gronkowców.

Podobnie w publikacji:

- Kosikowska U., **Stępień-Pyśniak D.**, Pietras-Ożga D., Andrzejczuk S., Juda M., Malm A. Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. *Diagnostyka laboratoryjna*, 2015, 51(1), 1-8.

porównaliśmy identyfikację wybranych izolatów bakterii wyosobnionych od ptaków hodowlanych oraz ludzi w oparciu o rutynowo stosowane metody diagnostyczne i technikę MALDI-TOF MS. Wyizolowane bakterie rozpoznawano wstępnie na podstawie morfologii kolonii oraz mikroskopowo po wybarwieniu metodą Gramma, a w przypadku gronkowców wykonywano również test na koagulazę oraz SlidexR Staph Kit (bioMerieux, Francja). Do identyfikacji biochemicznej wykorzystywano różne mikrotesty i panele diagnostyczne bioMerieux (Francja), analizator mikrobiologiczny Vitek 2 Compact (bioMerieux, Francja) oraz STREPTOtest 24 (Erba Lachema, Czech Republic). Do identyfikacji z zastosowaniem techniki MALDI-TOF MS wstępnie prowadzono tylko ekstrakcję białek z etalolem i kwasem mrówkowym. Na podstawie uzyskanych rezultatów zaobserwowaliśmy, że największe rozbieżności, pomiędzy identyfikacją bakterii izolowanych od ptaków hodowlanych i ludzi z użyciem metod biochemicznych i techniki MALDI-TOF MS występowały wśród izolatów bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*. Uzyskane dane ponownie potwierdziły, że MALDI-TOF MS jest użyteczną metodą diagnostyczną, umożliwiającą identyfikację różnych gatunków mikroorganizmów o specyficznych wymaganiach wzrostowych, rzadko izolowanych z

materiałów diagnostycznych lub sprawiających problemy w rutynowej diagnostyce, opartej głównie na pracochłonnych i drogich metodach biochemicznych.

Zdarza się także, że istnieją trudności w identyfikacji niektórych gatunków bakterii z użyciem MALDI-TOF MS, zwłaszcza jeśli baza zawiera ograniczoną liczbę widm szczepów wzorcowych tego samego gatunku, do których porównywane są widma szczepów dzikich. Dlatego też w takich przypadkach wykorzystywaliśmy metody biologii molekularnej opartej na analizie rybosomalnego DNA (16S rDNA), polegająca na porównaniu elektroforetycznych profili restrykcyjnych ampliconów 16S rDNA (16S-ARDRA: 16S Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) izolatów terenowych lactobacilli z profilami szczepów referencyjnych. Warto tu zaznaczyć, że protokół tej identyfikacji został opracowany w naszym Zakładzie. Dzięki tej metodzie wykazaliśmy, że dziewięć gatunków *Lactobacillus* wyizolowanych od indyków, które początkowo zdiagnozowano przez MALDI-TOF MS jako *L. johnsonii*/*L. gasseri* należało do gatunku *L. johnsonii*, izolaty zidentyfikowane jako *L. crispatus*/*L. ultunensis* należały do gatunku *L. crispatus*, natomiast gatunki określane jako *L. oris*/*L. antri* należały do gatunku *L. oris*.

- Dec M., Nowaczek A., Stępień-Pyśniak D., Wawrzykowski J., Urban-Chmiel R. Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys. *BMC Microbiology*, 2018, 18:168.

Epidemiologia zakażeń u drobiu oraz analiza czynników wirulencji bakterii z rodzaju *Staphylococcus* spp.

Jak wskazałam we wstępie oraz w publikacji 5 włączonej do osiągnięcia naukowego przedstawionego do postępowania habilitacyjnego, gronkowce koagulazododatnie oraz koagulazo-ujemne wywołują różne stany patologiczne u zwierząt, w tym u drobiu. Z uwagi na fakt, iż gronkowce były często izolowane od ptaków hodowlanych (zidentyfikowaliśmy 24 gatunki, w tym najczęściej były to *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lentus*), co wykazaliśmy w pracy:

- Marek A., Stępień-Pyśniak D., Pyzik E., Adaszek Ł., Wilczyński J., Winiarczyk S. Occurrence and characterization of *Staphylococcus* bacteria isolated from poultry in Western Poland. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2016, 129, 3/4, 147-152.

istnieje wysokie ryzyko kontaminacji produktów pochodzenia zwierzęcego, a nawet niebezpieczeństwo dla ludzi pracujących z drobiem na różnych szczeblach ich produkcji. Jednym z tych zagrożeń jest wysoka oporność badanych bakterii na

antybiotyki stosowane u drobiu, które należą do tych samych grup leków wykorzystywanych w terapii ludzi. Wyniki badań własnych wykazały również, że 30,7% badanych izolatów *S. aureus* charakteryzowała oporność na kilka (pięć lub więcej) z badanych antybiotyków stosowanych u drobiu. Wśród najczęściej obserwowanych profilów oporności można wymienić: enrofloksacyne, tylozynę, doksycyklinę i amoksycylinę. W przypadku izolatów należących do gatunku *S. cohnii* i *S. lentus*, odpowiednio 49,1% i 44,4% szczepów wykazywało oporność na pięć lub więcej badanych chemioterapeutyków, takich jak: enrofloksacyna, doksycyklina, sulfametoksazol potencjalizowany trimetoprimem, linkospektin i tylozyna. W sposób szczególny należy zwrócić uwagę na obecność izolatów *S. aureus* opornych na oksacylinę (co oznacza, że szczepy takie są jednocześnie odporne na metycylinę) i noszących geny *mecA* (odpowiedzialny za oporność na metycylinę) oraz geny warunkujące wytwarzanie toksyn gronkowcowych:

- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.**, Urban-Chmiel R., Jarosz Ł. Association between the methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from slaughter poultry, their toxin gene profiles and prophage patterns. *Current Microbiology*, 2018, 75, 1256-1266.

W cytowanej powyżej publikacji odnotowaliśmy, że 30,6% badanych izolatów *S. aureus* nosiło gen *mecA*. Dodatkowo, obecność genów odpowiedzialnych za wytwarzanie stafylokokowej enterotoksyny A (SEA) wykazano u jednego z izolatów metycylinoopornych (MRSA) i dwóch izolatów wrażliwych na metycylinę (MSSA). Tylko jeden szczep MRSA i dwa szczepy MSSA wykazywały obecność genu toksyny zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1). Żaden z izolatów MRSA nie posiadał genów odpowiedzialnych za wytwarzanie eksfoliatyny A i B, a tylko jeden MSSA posiadał gen eksfoliatyny A. Obecność genu stafylokinazy (*sak*) obserwowano u 13 izolatów MRSA i 5 izolatów MSSA. Zaobserwowaliśmy również, dużą częstość występowania profagów wśród badanych izolatów *S. aureus*. U wszystkich poddanych analizie gronkowców złocistych udało się wyodrębnić 15 wzorców profagowych. Typ 11-like był dominującym wzorcem, chociaż izolaty *S. aureus* zawierały od jednego do trzech profagów, co może zwiększać zdolność wytwarzania różnych czynników wirulencji przenoszonych przez bakteriofagi. Wykorzystując do typowania izolatów MRSA pochodzących od drobiu technikę PFGE z najczęściej używanym w tym celu enzymem restrykcyjnym *SmaI*, wykazaliśmy, że analizowane izolaty są najprawdopodobniej pochodzenia zwierzęcego. Badanie z użyciem enzymu *SmaI* pozwoliło na opracowanie

i porównanie tylko tylko trzech z 26 izolatów MRSA wykazując obecność trzech pulsotypów. Zgodnie z danymi piśmiennictwa, wykazaliśmy, że aktywność enzymu *SmaI* w stosunku do szczepów pochodzących od zwierząt gospodarskich może być zablokowana z powodu metylacji miejsca restrykcyjnego w genomie bakteryjnym. W związku z tym, jako alternatywę do trawienia zastosowaliśmy enzym *ApaI*, dzięki któremu wszystkie 26 izolatów MRSA poddało się trawieniu, pozwalając na uzyskanie 16 pulsotypów. Sześć izolatów należących do pulsotypu a1 i trzy izolaty należące do pulsotypu a2 wykazywały te same wzory *ApaI*-PFGE.

Dodatkowo odnotowaliśmy, że spośród koagulazo-dodatnich gronkowców, tylko *S. aureus* izolowany od drobiu, ujawniał fenotypowo w warunkach *in vitro* zdolność do wytwarzania czterech enterotoksyn (SEA-SED, odpowiedzialnych za destrukcję tkanek i inaktywację mechanizmów obronnych gospodarza), które stwierdzane są w ogniskach zatruc pokarmowych u ludzi. Wśród wszystkich ocenianych izolatów (89 szczepów), 9% było zdolnych do produkcji toksyny A, natomiast 23,6% szczepów wytwarzało toksynę D. Enterotoksyny B i C wytwarzane były odpowiednio przez jeden i dwa szczepy, co stanowiło niewielki odsetek badanych izolatów.

➤ Marek A., Pyzik E., **Stępień-PyśniakD.**, Wilczyński J., Adaszek Ł. Phenotypic evaluation of the ability to produce enterotoxin in staphylococci isolated from broiler chickens and turkeys in Poland. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2018, 131, 53-57.

W kolejnej pracy przeprowadziliśmy izolację i charakterystykę morfologiczną umiarkowanych bakteriofagów indukowanych ze szczepów *S. aureus* uzyskanych z próbek klinicznych brojlerów kurzych i indyckich. Fagi scharakteryzowaliśmy pod względem morfologii, stabilności i aktywności bakteriolitycznej wobec izolatów MRSA i MSSA. Podjęto też próbę oceny zakresu gospodarzy dla otrzymanych bakteriofagów, wykorzystując również inne gatunki bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz bakterii należących do innych rodzajów. Otrzymaliśmy 31 fagów poprzez indukcję mitomycyną C z profagów. Ustaliliśmy, że wszystkie uzyskane bakteriofagi miały izomeryczną głowę i długi, cienki, niekurczliwy elastyczny ogon, charakterystyczny dla rodziny *Siphoviridae* z rzędu *Caudovirales*, wskazując tym samym na swoistość wobec gospodarza, ograniczoną do jednego gatunku bakterii, co można wykorzystać jako narzędzie diagnostyczne. W obrębie charakteryzowanych bakteriofagów odnotowaliśmy trzy serotypy i dwa podtypy. Najbardziej reprezentatywną grupę stanowiły fagi 77-like, wśród których wyodrębniliśmy podgrupy Fa i Fb. Mniej liczne

były natomiast bakteriofagi należące do grup 3A-like i 11-like. Pośród charakteryzowanych bakteriofagów nie stwierdziliśmy obecności grup 187 i Twort-like. Warto zaznaczyć, że metoda ta może być użyteczna w celach epidemiologicznych wykrywania szczepów profagowych *S. aureus*. Analizując materiał genetyczny badanych bakteriofagów wykazaliśmy również, że część z nich nosiła geny zjadliwości. Niestety, obecność determinant chorobotwórczości w bakteriofagach może powodować negatywne zjawisko związane z transferem horyzontalnym tych genów do innych bakterii, przez co wyklucza je do ewentualnego zastosowania w celach terapeutycznych.

- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.**, Urban-Chmiel R. Characterization of bacteriophages and their carriage in *Staphylococcus aureus* isolated from broilers in Poland. *British Poultry Science*, 2018, DOI: 10.1080/00071668.2018.1426831.

Wyniki powyższych badań zostały także przedstawione w pracach opublikowanych w czasopiśmie popularyzującym naukę, jako element edukacji społeczeństwa:

- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.**, Nowaczek A. Charakterystyka szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych od drobiu rzeźnego w Polsce. *Polskie Drobiarstwo*, 2018, 26-31.
- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.**, Nowaczek A. Bakteriofagi specyficzne dla gatunku *Staphylococcus aureus* – zagrożenia i korzyści związane z ich występowaniem. *Polskie Drobiarstwo*, 2017, 75-78.

Wykorzystanie metod fizyko-chemicznych do oceny adhezji enterokoków

Jak wykazałam w publikacji 1, uwzględnionej w wykazie publikacji będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego, *E. faecalis* był gatunkiem najczęściej izolowanym z próbek pobranych z serc kurcząt brojlerów do 10 dnia życia. Według niektórych autorów, enterokok ten, obok Gram-ujemnych pałeczek *Escherichia coli*, jest najbardziej znaczącym patogenem bakteryjnym związanym ze śmiertelnością kur niosek w pierwszym tygodniu życia. Odnotowano również przypadki *endocarditis* z udziałem *E. faecalis* u drobiu. Jednakże, inni naukowcy twierdzą, że enterokoki mogą tymczasowo rezydować w płucach i sercu ptaków bez widocznych objawów infekcji. Wykazano też, że znaczący wzrost występowania *E. faecalis* w przewodzie pokarmowym w ciągu pierwszej doby życia piskląt wiąże się z horyzontalną transmisją tych bakterii w wylęgarni.

Wspólnie z naukowcami z Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie podjęliśmy badania nad oceną wpływu fizyko-chemicznych właściwości powierzchni komórek *E. faecalis* wyizolowanych z serc jednodniowych piskląt brojlerów kurzych niewykazujących objawów klinicznych choroby na zdolność do tworzenia biofilmu z uwzględnieniem obecności genetycznych determinant zjadliwości. W badaniach wykorzystano szczep *E. faecalis* ATCC 29212, jako materiał referencyjny.

Jednym z warunków utworzenia się monowarstwy komórek bakteryjnych na danej powierzchni jest przewyższenie sił odpychania elektrostatycznego przez oddziaływania hydrofobowe o charakterze przyciągającym. Według danych literaturowych, komórki bakteryjne są zwykle obdarzone ujemnym powierzchniowym ładunkiem elektrycznym, którego wartość zależy m.in. od szczepu, budowy chemicznej i struktury powierzchni zewnętrznej komórki oraz składu chemicznego ośrodka, w którym znajdują się bakterie. Powierzchniowy ładunek elektryczny komórek rzutuje na szybkość ich ruchu w polu elektrycznym i wartość tzw. potencjału elektrokinetycznego, charakteryzującego podwójną warstwę elektryczną wokół komórki zawieszanej w cieczy. W pracy przeglądowej, przedstawionej w formie doniesienia konferencyjnego, zestawiliśmy informacje odnośnie znaczenia potencjału elektrokinetycznego w pierwszym etapie patogenezy *Enterococcus faecalis*.

- **Stępień-Pyśniak D.**, Cieśla J., Wernicki A., Bieganowski A. Rola potencjału elektrokinetycznego *Enterococcus faecalis* w patogenezie. Konferencja Naukowa „Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem chorób układu oddechowego. Wrocław 26-27.06.2014r., str. 69-79.

Wyniki kompleksowych badań właściwości fizyko-chemicznych komórek *E. faecalis* wyizolowanych z serc piskląt oraz szczepu referencyjnego pokazały, iż zdolność do tworzenia biofilmu przez bakterie była tym większa, im niższa była wartość bezwzględna ruchliwości elektroforetycznej i powierzchniowego ładunku elektrycznego komórek bakteryjnych. Źródłem powierzchniowego ładunku elektrycznego komórek enterokoków były grupy funkcyjne o charakterze silnie kwasowym. Szczepy izolowane z serca piskląt bez klinicznych objawów choroby wykazywały mniejszą zdolność do tworzenia biofilmu niż szczep referencyjny. Wszystkie szczepy były dodatnie fenotypowo pod względem wytwarzania żelatyny, ale tylko szczep referencyjny posiadał aktywność hemolityczną. Ponadto w badanych izolatach i szczepie *E. faecalis* ATCC 29212 stwierdziliśmy kombinacje genów *gelE*,

cylA oraz *efaA_{fs}*. Wykazaliśmy również, że żaden z badanych izolatów, ani szczep referencyjny nie nosiły genu *esp*. Warto zauważyć, że obecność badanych genów cechuje zwykle szczepy enterokoków izolowane z postaci klinicznych zapaleń wsierdza, również tych izolowanych od ludzi.

Analiza fizyko-chemicznych właściwości powierzchniowych komórek enterokoków w powiązaniu z badaniami genetycznymi pozwoliła na ocenę i pełniejsze zrozumienie ich zdolności adhezyjnych. Na podstawie przeprowadzonych badań interdyscyplinarnych można wnioskować, że enterokoki wyizolowane z serc piskląt brojlerów kurzych nie wykazujących objawów klinicznych choroby mogą w sprzyjających warunkach przyczynić się do rozwoju stanu patologicznego.

- Cieśla J., Stępień-Pyśniak D., Nawrocka A., Łukowska M., Hauschild T., Wernicki A., Bieganowski A. Surface properties of the *Enterococcus faecalis* cells isolated from the chickens' hearts determine their low ability to biofilm formation. *Biofouling*, 2018, 34(2), 149-161.

Ocena lekowrażliwości wybranych bakterii kolonizujących przewód pokarmowy u ptaków

W ostatnim czasie biorę czynny udział w badaniach związanych z oceną lekooporności bakterii stanowiących element mikrobioty przewodu pokarmowego ptaków hodowlanych oraz wolnożyjących, w kontekście ewentualnego zagrożenia rozwoju i rozprzestrzeniania oporności, w tym wśród bakterii patogennych zarówno dla ptaków jak i dla ludzi. Wśród tych bakterii znalazły się pałeczki kwasu mlekowego, jak również z rodzaju *Campylobacter*.

Wykazaliśmy, że gołębie sportowe oraz dziko żyjące są nosicielami głównie *C. jejuni*. Ponadto odnotowaliśmy, że izolaty te odznaczały się wysoką częstotliwością występowania oporności na makrolidy, streptomycynę, teracykliny i penicyliny, ograniczając tym samym możliwości terapeutyczne w przypadkach zakażeń tymi drobnoustrojami ludzi czy zwierząt.

- Dudzic A., Urban-Chmiel R., Stępień-Pyśniak D., Dec M., Puchalski A., Wernicki A. Isolation, identification and antibiotic resistance of *Campylobacter* strains isolated from domestic and free-living pigeons. *British Poultry Science*, 2016, 57(2), 172-178.

Nasze badania udowodniły również, że przewód pokarmowy kurcząt brojlerów i indyków stanowi źródło wieloopornych *Lactobacillus* spp. Wśród badanych pałeczek kwasu mlekowego pochodzących od kurcząt brojlerów rejestrowaliśmy często

fenotypową oporność na tiamulinę, tetracykliny i linkomycynę oraz umiarkowaną częstotliwość oporności do enrofloksacynej, makrolidy, aminoglikozydy, ampicylinę i chloramfenikol. Ponadto odnotowaliśmy, że izolaty indycze wykazywały oporność głównie na tetracyklinę, linkomycynę, ampicylinę i erytromycynę. Dodatkowo zauważyliśmy, że wysokim wartościom MIC dla ampicyliny (≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) zwykle towarzyszyły podwyższone wartości MIC dla cefalosporyn (≥ 16 $\mu\text{g/ml}$). Najczęściej stwierdzanymi genami oporności były *tet(W)*, *tet(M)* i *tet(L)* (oporność na tetracykliny), *erm(B)*, *erm(C)* i *lnuA* (oporność na makrolidy i linkozamidy). Wśród genów determinujących oporność na antybiotyki aminoglikozydowe znaleźliśmy *ant(6)-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*, *aph(2'')-Ic* i *aadE*. Natomiast zarówno część szczepów opornych jak i wrażliwych na chloramfenikol nosiła gen *cat*. Za fenotypową oporność na tiamulinę odpowiedzialne były geny *acrA* i/lub *lsaE*. Nie byliśmy jednak w stanie wyjaśnić mechanizmu oporności izolatów *Lactobacillus* na ampicylinę, jednocześnie wykazując, że nie wiąże się ona z wytwarzaniem β -laktamaz. Zauważyliśmy też, że częstotliwość występowania fenotypowej i genotypowej oporności zależała od gatunku pałeczek kwasu mlekowego, od gatunku drobiu, z którego bakterie te były pozyskane, jak również od fermy, na której hodowano ptaki.

Warto zaznaczyć, że prezentowane badania są pierwszymi doniesieniami na temat wrażliwości *Lactobacillus* spp. na tiamulinę, tj. antybiotyk powszechnie stosowany w hodowli drobiu, głównie w celu kontrolowania zakażeń wywoływanych przez mykoplazmy. Ponadto, na podstawie przeprowadzonych badań, po raz pierwszy wykazaliśmy obecność genu *lsaE* u tego rodzaju bakterii.

Wcześniej potwierdzono występowanie wielu z wykrytych u *Lactobacillus* spp. genów oporności na ruchomych elementach genetycznych, co stanowi niebezpieczeństwo rozprzestrzeniania oporności w obrębie innych bakterii zasiedlających przewód pokarmowych ptaków, ale także w danym środowisku.

- Dec M., Nowaczek A., **Stępień-Pyśniak D.**, Wawrzykowski J., Urban-Chmiel R. Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys. *BMC Microbiology*, 2018, 18:168.
- Dec M., Urban-Chmiel R., **Stępień-Pyśniak D.**, Wernicki A. Assessment of antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens. *Gut Pathogens*, 2017, 9:54.

Alternatywne metody kontrolowania zakażeń u ptaków hodowlanych

Brałam także czynny udział w badaniach skoncentrowanych na alternatywnych metodach zwalczania zakażeń u ptaków. Z uwagi na narastające obawy związane z

negatywnym wpływem antybiotyków na zdrowie konsumenta, obecne trendy w chowie zwierząt zakładają ograniczenie stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych na rzecz działań prewencyjnych. Ważną grupą środków, które mogą być pomocne w zwalczaniu niektórych drobnoustrojów patogennych dla ptaków, a pośrednio także u ludzi, są dodatki paszowe korzystnie wpływające na stan zdrowotny jelit oraz wydajność produkcji.

Jedną z najczęstszych chorób odzwierzęcych u ludzi jest kamylobakterioza, a źródłem zakażenia *Campylobacter* spp. jest zwykle mięso drobiowe. W związku z tym, że kurczęta są naturalnym gospodarzem *Campylobacter* spp., jedną ze strategii zapobiegania zakażeniom u ludzi jest eliminacja tych mikroorganizmów u drobiu. W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że 46 izolatów *Lactobacillus* spp. było w stanie wytworzyć na podłożu stałym związki aktywne o antagonistycznych właściwościach wobec *C. jejuni* i *C. coli*. Szczególnie silny antagonizm anty-*Campylobacter* wykazywały *L. salivarius* oraz *L. reuteri*. Ponadto badane bakterie *Lactobacillus* spp. cechowały się innymi cechami probiotycznymi, jak: zdolność do produkcji H₂O₂; większość izolatów miała hydrofobową powierzchnię, wykazywały tolerancję na żółć oraz doskonałą przeżywalność przy pH 2,0 lub 1,5; 50% izolatów cechowała zdolność tworzenia biofilmu. Mimo to, 80,4% izolatów było opornych na co najmniej jeden środek przeciwbakteryjny. Dlatego ostatecznie 7 izolatów spełniało wszystkie podstawowe kryteria dla probiotyków i mogłoby mieć potencjalne zastosowanie w ograniczaniu rozprzestrzeniania *Campylobacter* spp. u kurcząt, a tym samym zapobiegając infekcjom zarówno u ptaków, jak i u ludzi.

- Dec M., Nowaczek A., Urban-Chmiel R., **Stepień-Pyśniak D.**, Wernicki A. Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates of chicken origin with anti-*Campylobacter* activity. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2018, 80(8), 1195-1203.

W ramach prowadzonych w jednostce poszukiwań alternatywnych metod eliminacji czynników patogennych u ptaków, uczestniczyłam również w badaniach obejmujących izolację oraz charakterystykę bakteriofagów swoistych dla szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od drobiu. Wymiernym efektem tych badań jest zaakceptowana do druku publikacja w czasopiśmie znajdującym się w bazie JCR:

- Nowaczek A. Urban-Chmiel R., Dec M., Puchalski A., **Stepień-Pyśniak D.**, Marek A., Pyzik E. Characterization of bacteriophages specific for *Campylobacter* spp. isolated from the gut of broiler chickens. *Microbiology Open* (20p., IF 2,682).

Ponadto uczestniczę również w badaniach nad izolacją i charakterystyką bakteriofagów swoistych dla patogennych szczepów *Staphylococcus* spp. izolowanych od różnych gatunków zwierząt towarzyszących oraz drobiu. Efektem tych badań są złożone do NCN projekty badawcze oraz złożone wnioski patentowe.

Kolejnym tematem badawczym, w ramach mojej działalności naukowej, była ocena wpływu suplementacji paszy 2% i 3% Zakarpackiego zeolitem (klinoptylolitem) na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej u drobiu oraz parametry morfologiczne jelita cienkiego i aktywność enzymów trawiennych przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów. W wyniku przeprowadzonych badań, zaobserwowano statystycznie istotny wzrost wysokości kosmków w dwunastnicy, części środkowej jelita czczego oraz w jelicie biodrowym u kurcząt otrzymujących 2% dodatek zeolitu. Wykazano zmniejszenie szerokości kosmków w dwunastnicy i części dystalnej jelita czczego. Stwierdzono ponadto wzrost głębokości krypt jelitowych we wszystkich badanych odcinkach jelit u kurcząt doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatek 2% zeolitu powodował statystycznie istotny wzrost pola powierzchni kosmków jelitowych w dwunastnicy, części środkowej jelita czczego oraz w jelicie biodrowym. Dodatek 2% zeolitu do paszy przyczynił się również do znacznego zwiększenia aktywności żołądka gruczołowego (pepsyny) i trzustki (trypsyny, lipazy) w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki sugerują, że Zakarpacki zeolit może być używany jako naturalny dodatek żywieniowy do stymulowania morfologii kosmków jelitowych, a w konsekwencji funkcji jelitowych.

- Wawrzyniak A., Kapica M., **Stępień-Pyśniak D.**, Szewerniak R., Olejarska A., Jarosz Ł. Effect of feeding Transcarpathian Zeolite on gastrointestinal morphology and function in broiler chickens. *Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science*, 2017,19(4), 737-746.
- Wawrzyniak A., Kapica M., **Stępień-Pyśniak D.**, Łuszczewska-Sierakowska I., Szewerniak R., Jarosz, Ł. The effect of dietary supplementation of Transcarpathian Zeolite on intestinal morphology in female broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 2017, 26(3), 421-430.

Rezultaty uzyskane w przeprowadzonych badaniach były prezentowane także w formie doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych :

- Wawrzyniak Agata, Kapica Małgorzata, **Stępień-Pyśniak Dagmara**, Szewerniak Renata. The influence of oral administration of Transcarpathian zeolite on broiler chickens. W: International Scientific Conference: Actualities in Animal Physiology and Pathology. Programme and abstracts, Kaunas, 28-29 September 2017 s. 71.

- Wawrzyniak A., Kapica A., **Stępień-Pyśniak D.**, Łuszczewska-Sierakowska I., Szewerniak R. Gastrointestinal development and function of broiler chickens on diets supplemented with Transcarpathian zeolite. W: XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i cytochemików "Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie". Międzyzdroje, 9-12 IX 2015. Program, streszczenia 68., 2015.
- Wawrzyniak A., Kapica M., **Stępień-Pyśniak D.**, Łuszczewska-Sierakowska I., Szewerniak R. The effect of dietary supplementation of Transcarpathian zeolite on intestinal morphology in female broiler chickens. XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i cytochemików "Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie". Międzyzdroje, 9-12 IX 2015. Program, streszczenia, 68, 2015.

Ponadto, analiza wyników wpływu zeolitu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej u drobiu poprzez ocenę ekspresji cząsteczek powierzchniowych CD na limfocytach T i B oraz stężenie cytokin IL-2 i IL-10 we krwi wskazała, że dodatek 2% zeolitu do paszy jest najbardziej korzystny dla drobiu pod względem immunologicznym. Ta dawka miała także pozytywny wpływ na przyrost masy ciała u ptaków oraz zapewniała ich dobrą kondycję. Zwiększone stężenie cytokin u kurcząt otrzymujących zeolit pokazało, że wpływa on na komórki immunokompetentne, regulując intensywność odpowiedzi immunologicznej organizmu. Zastosowanie zeolitu jako suplementu diety nasiliło prezentację antygenów i spowodowało zmiany w populacji komórek T i ich funkcji, prowadząc do zwiększenia ekspresji regulatorowych komórek T oraz ich polaryzacji w kierunku Th1 i Th2.

- Jarosz Ł., **Stępień-Pyśniak D.**, Grądzki Z., Kapica M., Gacek A. The effect of feed supplementation with Zakarpaccki zeolite (clinoptilolite) on percentages of T and B lymphocytes and cytokine concentrations in poultry. *Poultry Science*, 2017, 96(7), 2091-2097.

Uzyskane rezultaty przedstawiono również w formie doniesienia na konferencji krajowej:

- Jarosz Ł., **Stępień-Pyśniak D.**, Grądzki Z., Kapica M., Wawrzyniak A. Wpływ suplementacji paszy Zakarpacckim Zeolitem (Klinoptylolit) na kształtowanie się odsetka limfocytów T i B oraz stężenie cytokin u drobiu. XV Kongres PTNW „Nauka praktyce” Lublin 22-24.09.2016r.

Tematykę alternatywnych metod ograniczania zakażeń u ptaków przedstawiono także w postaci dwóch prac przeglądowych. Zebrane dane pokazują, że białko i żółtko jaja zawierają wiele biologicznie aktywnych substancji o potencjalnych lub wykazanych już zastosowaniach terapeutycznych wykraczających poza ich właściwości odżywcze. Ponieważ zawartością jaj można manipulować różnymi metodami, w szczególności

zmianami w diecie lub immunizacji, powstała koncepcja "kury jako bioreaktora" wytwarzającej substancje o znaczeniu medycznym. Podkreślono zatem potencjalne wykorzystanie substancji biologicznie czynnych w jaju w alternatywnych metodach leczenia chorób u zwierząt i ludzi, w tym alternatywy dla antybiotykoterapii ograniczającej zjawisko powstawania lekoopornych patogenów. Zestawiono również aktualną wiedzę na temat patogenezы nekrotycznego zapalenia jelit, trudności w kontrolowaniu tej jednostki chorobowej po wprowadzeniu zakazu stosowania antybiotykowych dodatków paszowych oraz próbach immunoprofilaktyki.

- Rzedzicki J., **Stępień-Pyśniak D.** Antimicrobial defence mechanisms of chicken eggs and possibilities for their use in protecting human and animal health. *Annales UMCS, Medicina Veterinaria* 2009, VOL. LXIV (2), 1-8.
- Marek A., **Stępień-Pyśniak D.**, Pyzik E. Przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat immunoprofilaktyki martwiczego zapalenia jelit u drobiu. *Magazyn Weterynaryjny, Choroby Ptaków – Monografia*, maj 2015, str. 12-15.

Problem kontroli zakażeń *Clostridium perfringens* u drobiu został także przedstawiony w publikacji konferencyjnej oraz artykule popularno-naukowej:

- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.** Przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat patogenezы oraz kontroli zakażeń *Clostridium perfringens* u drobiu. Międzynarodowa Konferencja Naukowa pt. "Enteropatie u drobiu", 13-14 września 2013r., str. 72-85.
- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.** Patogeneza oraz profilaktyka martwiczego zapalenia jelit drobiu. *Magazyn Weterynaryjny, Choroby Ptaków – Monografia*, maj 2014, 398.

Ponadto w ramach współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, biorę udział w badaniach dotyczących poszukiwania substancji naturalnych, w tym olejków pochodzenia roślinnego, aktywnych wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz grzybów, zwłaszcza oportunistycznych i środowiskowych, w tym występujących u ptaków i zwierząt domowych. Dodatek tych składników o aktywności przeciwdrobnoustrojowej może mieć również znaczenie w opracowywaniu receptur i otrzymywaniu produktów działających ochronnie na skórę (dermoprotekcyjnych) oraz wspomagających tradycyjne leczenie. Wstępne wyniki badań związanych z tymi zagadnieniami zostały przedstawione podczas konferencji międzynarodowych:

- Mendrycka M., Kosikowska U., Ludwiczuk A., **Stępień-Pyśniak D.**, Juda M., Rój E., Malm A. Strain dependent activity of the compositions with *Oenothera Biennis* L. seed oil against skin isolates of Gram-positive bacteria. 11th International Symposium of Chromatography of Natural Products. June 4th-7th, 2018, Lublin, Poland.
- Biernasiuk A., Baj T., Szymańska J., **Stępień-Pyśniak D.**, Malm A. Chemical composition and inhibition of *Candida* spp by selected *Lamiaceae* Lindl. essential oils. 10th International Symposium on Chromatography of Natural Products. The application of analytical methods for the development of natural products. June 6th-9th, 2016, Lublin, Poland.

Występowanie i zróżnicowanie mikrobioty układu oddechowego organizmu ludzkiego

Dzięki nawiązanej współpracy międzyuczelnianej, zwłaszcza z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, uczestniczę w badaniach związanych z oceną roli drobnoustrojów zasiedlających różne ekosystemy organizmu ludzkiego i tworzących ich mikrobiotę, w tym bakterii należących do rodziny *Pasteurellaceae* oraz innych rodzin i gatunków o zróżnicowanym potencjale patogennym dla ludzi. Mikroorganizmy te, w tym pałeczki *Pasteurellaceae*, które należą do mikroorganizmów wybrednych o dużych wymaganiach wzrostowych, stanowią ważne składniki mikrobioty gospodarza. Większość badań koncentruje się na mikrobiocie oddechowej osób zdrowych i pacjentów z chorobami przewlekłymi ulegającej zmianom m.in. poprzez kolonizację przez bardzo różne gatunki mikroorganizmów, w tym pochodzące z otoczenia.

Struktura i funkcje mikrobioty mogą ulegać dynamicznym modyfikacjom pod wpływem wielu czynników, zarówno zewnętrznych (m.in. miejsce zamieszkania, nałogi, nawyki, miejsce zamieszkania, stosowanie różnych leków, w tym antybiotyków, zabiegi terapeutyczne i diagnostyczne) lub związanych z organizmem gospodarza (m.in. wiek, wykonywana praca, stan immunologiczny, w tym odporność nieswoista, choroby przewlekłe, immunosupresja, autoagresja). Poza określeniem częstości występowania wybranych gatunków bakterii w mikrobiocie oddechowej, zwłaszcza komensalnych pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae*, ocenie poddawano także cechy fenotypowe i genotypowe izolatów. Izolaty identyfikowano w oparciu o metody biochemiczne i molekularne oraz inne metody fenotypowe, w tym na podstawie profilu białkowego z wykorzystaniem spektrometrii mas. W zakresie charakterystyki fenotypowej określano również biotypy, zdolności tworzenia biofilmu oraz lekowrażliwość badanych pałeczek

głównie z rodzaju *Haemophilus*, izolowanych od ludzi w różnych grupach wiekowych, zarówno zdrowych, jak i z różnorodnymi chorobami przewlekłymi, w tym dotyczącymi układu oddechowego.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazaliśmy występowanie niższego odsetka pałeczek hemofilnych u pacjentów z wybranymi przewlekłymi czy nawracającymi chorobami układu oddechowego. W obrębie *H. influenzae* najczęściej obserwowaliśmy biotypy II i III, natomiast w przypadku *H. parainfluenzae* występowały głównie biotypy I i II niezależnie od wieku pacjenta, stanu zdrowia czy rodzaju próbki. Ponadto odnotowaliśmy różnice w zdolności tworzenia biofilmu, ważnego czynnika związanego z patomechanizmem bakterii komensalnych, przez izolaty *H. parainfluenzae* pochodzące z próbek pobranych z jamy nosowo-gardłowej od pacjentów z sarkoidozą w porównaniu do izolatów pochodzących od osób zdrowych. Zaobserwowaliśmy także znaczny odsetek pałeczek hemofilnych zasiedlających górne drogi oddechowe, zarówno u ludzi chorych jak i zdrowych, opornych na antybiotyki β -laktamowe. Może to powodować trudności w leczeniu zwłaszcza, że antybiotyki należące do tej grupy są najpowszechniej stosowanymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi podczas leczenia bakteryjnych schorzeń u ludzi.

Uzyskane dane sugerowały, że na zmiany jakościowe i ilościowe w obrębie mikrobioty oddechowej, dotyczące częstości kolonizacji, liczby izolatów *H. influenzae* w połączeniu ze zmniejszoną liczbą szczepów *H. parainfluenzae* oraz zmniejszoną liczbą izolatów *H. parainfluenzae* wytwarzających biofilm w porównaniu do zdrowych osób mogą mieć wpływ przewlekłe schorzenia układu oddechowego.

W kolejnym projekcie dotyczącym analizy mikrobioty układu oddechowego wykazaliśmy, że ludzie żyjący na terenach podmiejskich są często narażeni na obecność wielu oportunistycznych patogenów środowiskowych, które kolonizują błony śluzowe górnego układu oddechowego. Obok typowych składników mikrobioty, stwierdziliśmy obecność *Bacillus* spp. oraz *Escherichia coli*. Rutynowe metody diagnostyki mikrobiologicznej wraz z komercyjnymi testami pozwoliły na dokładną identyfikację tylko najczęściej izolowanych mikroorganizmów, jak gronkowców koagulazododatnich i koagulazo-ujemnych, czy *E. coli*. Dzięki zastosowaniu identyfikacji opartej na spektrometrii mas typu MALDI-TOF wykazaliśmy, że jamę nosowo-gardłową mogą kolonizować oportunistyczne gatunki takie jak *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis* i *B. safenis*, które według danych literaturowych coraz częściej powodują zakażenia u hospitalizowanych pacjentów.

Dotychczasowe wyniki badań nad mikrobiotą pacjentów z chorobami przewlekłymi i osób zdrowych opublikowano w czasopismach znajdujących się w wykazie A i B MNiSW:

- Kosikowska U., Rybojad P., **Stępień-Pyśniak D.**, Żbikowska A., Malm A. Changes in the prevalence and biofilm formation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* from the respiratory microbiota of patients with sarcoidosis. *BMC Infectious Diseases*, 2016, 16: 449.
- Andrzejczak S., Chwiejczak E., Kosikowska U., **Stępień-Pyśniak D.**, Malm A. Phenotypic diversity of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* isolates depending on origin and health condition. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 2017, Vol. 30, No. 2, 90-99.
- Kosikowska U., **Stępień-Pyśniak D.**, Ożga D., Wernicki A., Malm A.: Identification of *Bacillus* spp. colonizing the nasal mucosa of healthy adults living in suburban area by using the matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 2014, 27(3): 137-141.

oraz przedstawiono na konferencyjnych krajowych i międzynarodowych:

- Kosikowska U., Chudzik-Rząd B., Kiciak S., Chwiejczak E., **Stępień-Pyśniak D.**, Malm A. The differences in the respiratory microbiota composition in patients with chronic hepatitis C compared with those of healthy people. 2-nd International Conference on Pharmaceutical and Medical Sciences, Poprad-Slovakia, 21-23.09.2018, str. 89-90.
- Kosikowska U., Chwiejczak E., Dłuski D., **Stępień-Pyśniak D.**, Leszczyńska-Gorzela B., Malm A. Różnorodność gatunkowa *Staphylococcus* spp. w mikrobiocie nosogardzieli kobiet ciężarnych. III Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz 18-19.06.2018.
- Kosikowska U., Chudzik-Rząd B., Juda M., **Stępień-Pyśniak D.**, Malm A. Tworzenie biofilmu na cewnikach medycznych przez kliniczne izolaty *Haemophilus parainfluenzae*. Konferencja Nukowa Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. PTM wczoraj-dziś-jutro. Kraków 22-23.09.2017r. Str. 109, A-143.
- Kosikowska U., Andrzejczak S., Gorajek A., **Stępień-Pyśniak D.**, Malm A. Fenotypowa ocena lekooporności izolatów *Haemophilus parainfluenzae* wyosobnionych z mikrobioty oddechowej w oparciu o rekomendacje EUCAST. PTM wczoraj-dziś-jutro. Kraków 22-23.09.2017r., Str. 110, A-144.

Kierunek badań podejmowanych we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej UM w Lublinie nad wyjaśnieniem znaczenia bakterii oportunistycznych w rozprzestrzenianiu lekooporności, zaowocował także moim udziałem jako promotora pomocniczego w realizacji obronionej we wrześniu 2017 r.

pracy doktorskiej pracownika ww. Katedry, dr Sylwii Andrzejczuk (promotor dr hab. Urszula Kosikowska).

Opis przypadków klinicznych

Dodatkowo w ramach prowadzonej diagnostyki związanej z działalnością lekarsko-weterynaryjną w przykładowym gabinecie, jestem autorką opisów przypadków klinicznych nie tylko u drobiu, ale także u ptaków ozdobnych. W pracy opublikowanej w czasopiśmie znajdującym się w bazie JCR:

- **Stępień-Pyśniak D.**, Puk K., Guz L., Wawrzyniak A., Marek A., Kosikowska U. Avian mycobacteriosis caused by *Mycobacterium avium* subspecies *avium* in four ornamental birds and in vitro drug sensitivity testing of isolates. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2016, 129, 1/2, 61-65.

wykazaliśmy, że przyczyną gruźlicy u czterech padłych ptaków ozdobnych był prątek *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, co potwierdziliśmy stosując technikę sekwencjonowania z wykorzystaniem genów *hsp65* i *IS901*. Udokumentowaliśmy występowanie rozsianych gruzełków w nietypowych lokalizacjach dla gruźlicy ptaków jak: tchawicy, płucach, jądrach, czy nerkach. Wykonaliśmy także lekowrażliwość wyizolowanych prątków wykazując, że były one odporne na leki pierwszego rzutu powszechnie stosowane w medycynie ludzkiej przeciwko gruźlicy (ethambutol, izoniazyd i ryfampicyna) oraz leki drugiego rzutu, w tym etionamid, kapreomycynę i ofloksacynę, zwracając tym samym uwagę na zagrożenia dla ludzi wynikające z kontaktu z chorymi ptakami i środowiskiem ich utrzymania. Ponadto w gospodarstwie, gdzie znajdowały się woliery z ptakami, u których stwierdziliśmy gruźlicę, utrzymywane były również alpaki. W związku z tym, że na przestrzeni czasu odnotowywano u nich nietypowe objawy chorobowe, które obserwowano u tego gatunku zwierząt przez innych autorów w przebiegu paratuberkulozy, przebadaliśmy 40 próbek kału od tych zwierząt, a także 60 próbek kałomoczu od pozostałych ptaków. Okazało się, że alpaki były wolne od zakażenia prątkami, ale w kałomoczu dwóch ptaków nie wykazujących objawów choroby w chwili badania, stwierdziliśmy odpowiednio obecność *Mycobacterium chelonae* i *Mycobacterium avium* subspecies *avium*. Warto podkreślić, że ocenę lekowrażliwości *Mycobacterium avium* subspecies *avium* przed nami wykonał tylko zespół ze Stanów Zjednoczonych i Australii, który

zajmował się prątkami tego gatunku wyizolowanymi od cukrówek (*Streptopelia risoria*).

Opisaliśmy także problematykę diagnostyki i leczenia w Polsce zatrucia ołowiem oraz w przebiegu makrorabdozy u ptaków ozdobnych:

- **Stępień-Pyśniak D.**, Marek A., Dębiak P., Łopuszyński W., Kosikowska U. Zatrucie ołowiem papugi nimfy (*Nymphicus hollandicus*). *Magazyn Weterynaryjny*, 2015, 24 (216), 405-408.
- **Stępień-Pyśniak D.**, Marek A., Pyzik E. Makrorabdoza – drożdżycza żołądka ptaków. *Magazyn Weterynaryjny*, Choroby Ptaków – Monografia, maj 2013, 365-368.

Usystematyzowaliśmy również wiedzę obejmującą zakażenia wywołane grzybami z rodzaju *Aspergillus* oraz inwazje z udziałem *Syngamus trachea* w publikacjach popularno-naukowych:

- Marek A., Pyzik E., **Stępień-Pyśniak D.** Aspergiloza – najczęściej występująca systemomykoza u ptaków gospodarskich i domowych. *Magazyn Weterynaryjny*, Choroby Ptaków – Monografia, maj 2013, 359-364.
- Marek A., **Stępień-Pyśniak D.** Parazytoza górnego odcinka układu oddechowego – syngamoza drobiu. *Magazyn Weterynaryjny*, Choroby Ptaków – Monografia, maj 2010, 414-417.

Realizowane projekty badawcze

Podczas prowadzonej działalności naukowo-badawczej byłam kierownikiem zakończonych już projektu finansowanego przez NCN w ramach konkursu Miniatura 1 nr 2017/01/X/NZ6/00430 pt. „Struktura klonalna oraz analiza czynników zjadliwości i antybiotykooporności szczepów *Enterococcus faecalis* wyizolowanych z woreczków żółtkowych piskląt brojlerów kurzych”.

Byłam również kierownikiem i wykonawcą badań wykonywanych w ramach projektu nr WZC/MN/6 w 2013r. dla młodych naukowców pt. „Charakterystyka bakterii z rodzaju *Enterococcus* spp. izolowanych od różnych typów użytkowych kur”.

Byłam także głównym wykonawcą zadania badawczego pt.: „Analiza fenotypowa i genotypowa lekooporności i wybranych czynników zjadliwości określonych typów sekwencyjnych *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* izolowanych od ptaków dzikich zasiedlających różne nisze ekologiczne” realizowanego w ramach tematu badawczego z działalności statutowej WCZ/DS/8.

Wyniki badań dotyczących *E. faecalis* zostały już opublikowane w publikacji nr 3 uwzględnionej w cyklu prac przedstawionych do postępowania habilitacyjnego.

Ponadto dwa manuskrypty, w których przedstawiono wyniki pracy badawczej dotyczącej lekooporności i chorobotwórczości izolatów *E. faecium* oraz innych gatunków enterokoków i ich zróżnicowania z uwzględnieniem metod typowania genetycznego w kontekście zagrożeń dla ludzi i zwierząt są na etapie recenzji edytorskich w czasopismach znajdujących się w bazie JCR:

- **Stępień-Pyśniak D.**, Hauschild T, Dec M., Marek A., Urban-Chmiel R. Clonal structure and antibiotic resistance of *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, and *Enterococcus casseliflavus* from wild birds in Poland. (*Microbial Drug Resistance*, 25 pts, IF = 2.344).
- **Stępień-Pyśniak D.**, Hauschild T, Kosikowska U., Dec M., Urban-Chmiel R. Biofilm formation capacity and its connection with potential phenotypic and genotypic virulence factors among gut enterococcal isolates from wild birds. (*Scientific Reports*, pkt. 40, IF = 4,12).

Działalność aplikacyjna oraz współpraca naukowa

Moje badania z zakresu charakterystyki bakteriofagów swoistych dla wybranych drobnoustrojów izolowanych od zwierząt towarzyszących mają również charakter aplikacyjny, co potwierdza współdziałanie w przygotowanych w roku 2018 dwóch wnioskach patentowych zgłoszonych do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej. Należy podkreślić, że badania naukowe prowadzone są we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie:

- Wernicki A. i wsp. „Sposób otrzymywania preparatu do leczenia bakteryjnego zapalenia spojówek” (Nr zgłoszenia P.427797)
- Wernicki A. i wsp. „Sposób otrzymywania kompozycji do leczenia bakteryjnego zapalenia spojówek” (Nr zgłoszenia P.427798)

W ramach swojej działalności naukowej prowadzę również badania we współpracy z Katedrą Nauk Weterynaryjnych Uniwersytetu w Pizie (Włochy) dotyczącego oceny występowania oraz charakterystyki fenotypowej i genotypowej bakterii z rodzaju *Enterococcus* izolowanych od zwierząt dziko żyjących (wilki, łasicowate, muflony, listy, dziki, borsuki) w Parku Aupan Alps. Manuskrypt zawierający wyniki tych badań jest w końcowej fazie przygotowania.

Aktualnie prowadzę także współpracę z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie w zakresie lekooporności drobnoustrojów saprofitycznych i komensalnych, pochodzących z mikrobioty różnych układów makroorganizmu, rzadziej będących czynnikami etiologicznymi chorób, w tym chorób infekcyjnych, izolowanych zarówno

od ludzi w różnym wieku i stanie zdrowia, jak i od zwierząt, w tym ptaków, a także z otoczenia człowieka (środowisko wodne).

Udział w kongresach i konferencjach naukowych

W ramach prowadzonej działalności naukowej uczestniczyłam czynnie w kongresach oraz konferencjach naukowych obejmujących zagadnienia z zakresu chorób ptaków, czego potwierdzeniem jest współautorstwo w 35 zgłoszeniach konferencyjnych, które prezentowane były w formie prezentacji ustnej bądź postera podczas 27 krajowych oraz 8 międzynarodowych kongresach i konferencjach naukowych (Zał. Nr 3, IIK).

Działalność organizacyjna i popularyzująca naukę

Recenzowałam manuskrypty dla czasopism międzynarodowych znajdujących się w bazie JCR (Avian Pathology, Journal of Wildlife Diseases, Environmental Microbiology), kilkakrotnie dla czasopisma krajowego znajdującego się w wykazie B MNiSW (Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences) oraz rozdziału w monografii dla Fundacji na rzecz promocji nauki i rozwoju Tygiel.

W ramach prowadzonej działalności popularyzującej naukę byłam również współautorem siedmiu publikacji o tematyce związanej z patologią drobiu (Zał. nr 3, IID3).

Kształcenie kadry naukowej

Byłam promotorem jednej pracy inżynierskiej Kamila Jaworskiego pt. „Znaczenie bakterii z rodzaju *Enterococcus*” na kierunku Biotechnologia Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie (Zał. Nr 4, J).

Sprawowałam także opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego pracy doktorskiej dr Sylwii Andrzejczuk pt. „Fenotypowa i genotypowa ocena oporności na beta-laktamy szczepów *Haemophilus* spp. izolowanych z mikrobioty układu oddechowego” realizowanej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (Zał. Nr 4, K1). Ponadto obecnie sprawuję opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego pracy doktorskiej lek. wet. Jarosława Wilczyńskiego pt. „Charakterystyka molekularna czynników wirulencji oraz lekowrażliwość szczepów *Escherichia coli* (APEC) izolowanych od drobiu na terenie Polski zachodniej” realizowanej w Zakładzie

Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie (Zał. Nr 4, K2).

Działalność dydaktyczna

Od 2003 r. do chwili obecnej prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów V roku kierunku Weternaria z przedmiotów „Choroby ptaków” oraz „Choroby ptaków- staż”.

Uczestniczę również w prowadzeniu przedmiotów fakultatywnych „Choroby ptaków ozdobnych” oraz „Chów i choroby ptaków bezgrzebieniowych”.

Jestem osobą odpowiedzialną za przygotowanie oraz realizację przedmiotu „Choroby ptaków ozdobnych” dla VI roku Medycyny Weterynaryjnej

W ramach programu Erasmus prowadziłam wykłady pt. „Mechanisms of bacteria resistance to antibiotics. Types of intrinsic and acquired antibiotics resistance in *Enterococcus*” w języku angielskim dla słuchaczy studiów podyplomowych w Uniwersytecie w Pizie (Włochy) (Zał. Nr 4, I).

Jest członkiem minimum kadrowego nowego kierunku „Analityka weterynaryjna” powstałego na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Ponadto, jestem odpowiedzialna za przedmiot „Procedury laboratoryjne w diagnostyce chorób ptaków” na nowym kierunku Analityka Weterynaryjna na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Jestem także autorem sylabusów z przedmiotu „Procedury laboratoryjne w diagnostyce chorób ptaków”.

Staż naukowe krajowe i zagraniczne oraz szkolenia

- Staże krajowe:

Odbyłam 4-tygodniowy staż naukowy w Laboratorium Zastosowań Optycznych Technik Pomiarowych Zakładu Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego Instytutu Agrofizyki Państwowej Akademii Nauk w Lublinie (Zał. Nr 4, L1a).

Odbyłam tygodniowy staż naukowy w Zakładzie Immunologii Katedry Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Zał. Nr 4, L1b).

- Staże zagraniczne:

Odbyłam dwa tygodniowe, zagraniczne staże naukowe w:

- University of Ondokuz Mayis w Samsun (Turcja, 2015) (Zał. Nr 4, L2a),

- University of Copenhagen w Kopenhadze (Dania, 2016) (Zał. Nr 4, L2b).

- Szkolenia:

Uczestniczyłam w trzech krajowych szkoleniach doskonalących techniki molekularne w:

- Blirt S.A. - DNA Gdańsk w Gdańsku (2012) (Zał. Nr 4, Q1a),
- Novazym Polska s.c. w Poznaniu (2018) (Zał. Nr 4, Q1b),
- MBS – Szkolenia, Konferencje, Usługi Sp. z o.o. w Warszawie (2018) (Zał. Nr 4, Q1c),

oraz jednym szkoleniu zagranicznym w zakresie diagnostyki wykonywanej u drobiu:

- AniCon Labor GmbH w Höltinghausen, Niemcy (2018) (Zał. Nr 4, Q1d),

Odbyłam również szkolenie dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych lub edukacyjnych uzyskując certyfikat nr 244/2015 z dnia 22.12.2015r. (Lublin, 2015) (Zał. Nr 4, Q1e).

Plany naukowe na przyszłość

W przyszłości planuję kontynuację aktualnie prowadzonych badań dotyczących enterokoków oraz *Gallibacterium anatis*. W zakresie tych badań będzie charakterystyka fenotypowa i genotypowa *Enterococcus hirae*, z próbą wskazania czynników biorących udział w patogenezie zapalenia wsierdza. W tym celu zgromadziłam już ponad 50 izolatów tego gatunku. Przedmiotem badań będą także enterokoki, głównie *E. faecalis*, wyizolowane od indyków odmiany ciężkiej. Aktualnie zgromadziłam ponad 60 izolatów tego gatunku.

Dodatkowo planuję analizę lekowrażliwości, cech zjadliwości oraz zróżnicowania genetycznego zgromadzonych izolatów *G. anatis* uzyskanych z klicznych przypadków zakażeń od drobiu. Planowane badania mają także na celu poszukiwanie alternatywnych metod w kontrolowaniu zakażeń tymi drobnoustrojami.

Będę uczestniczyć również w badaniach dotyczących izolacji bakteriofagów dla zróżnicowanych drobnoustrojów izolowanych od zwierząt gospodarskich, jak też w badaniach nad możliwością wykorzystania fagów w alternatywnym dla antybiotyków zwalczaniu zakażeń u zwierząt i ludzi (jestem wykonawcą w projektach złożonych w 2018r. w ramach konkursów finansowanych przez MNiSW: Dialog 2018r. Nr DIALOG 0321/2018 oraz NCN Nr 423631).

Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- współautorstwo 42 publikacji, w tym 23 prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, 18 artykułów w czasopismach spoza tej listy, jednym rozdziale w monografii; w 15 publikacjach jestem pierwszym autorem (Zał. Nr 3, IB, IIA, IID),
- współautorstwo 35 komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Zał. Nr 3, Ka i Kb); aktywny udział w 10 konferencjach naukowych (Zał. Nr 3, K.1),
- sumaryczny Impact Factor wszystkich opublikowanych prac wynosi 30,834, a liczba punktów wg MNiSW 649; wg bazy Web of Science (na dzień 10.12.2018r.) indeks Hirscha = 4; liczba cytowań wynosi 60, bez autocytowań wynosi 43; wg bazy Scopus (na dzień 10.12.2018r.) indeks Hirscha = 5; liczba cytowań wynosi 72,
- dwukrotna opieka w charakterze promotora pomocniczego pracy doktorskiej; promotorstwo jednej pracy inżynierskiej (Zał. Nr 4, K1 i K2),
- kierowanie jednym projektem badawczym NCN (w ramach konkursu Miniatura 1) i jednym projektem w ramach dotacji dla młodych naukowców (Zał. Nr 3, II.I),
- odbyłam 4-tygodniowy staż naukowy w Państwowej Akademii Nauk w Lublinie (Polska, 2017) oraz jeden krajowy i dwa zagraniczne staże tygodniowe: w Samsun – Ondokuz Mayıs University (Turcja, 2015), w Kopenhadze - University of Copenhagen (Dania, 2016), w Poznaniu – Uniwersytet Medyczny (Polska, 2016) (Zał. Nr 4, L1 i L2),
- odbyłam trzy krajowe szkolenia doskonalące techniki molekularne w Gdańsku (2011), Poznaniu (2018) i Warszawie (2018), jedno szkolenie zagraniczne w zakresie diagnostyki wykonywanej u drobiu (Niemcy, 2018) oraz jedno szkolenie dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych lub edukacyjnych (Zał. Nr 4, Q1 i Q2),
- wykonałam recenzje manuskryptów dla redakcji czasopism naukowych z listy A i B MNiSW oraz recenzję rozdziału w monografii dla Fundacji na rzecz promocji nauki i rozwoju Tygiel (Zał. Nr 4, P i M),
- współpraca naukowa:
 - a) międzyzakładowa w obrębie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie – Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Zakład Histologii i Embriologii, Zakład Fizjologii Zwierząt, Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej, Zakład Chorób Ryb, Katedra Biochemii; Zakład Farmakologii, Toksykologii i Ochrony

Środowiska; Pracownia Radiologii i Ultrasonografii, Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt;

- b)** międzywydziałowa - Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki UP w Lublinie;
- c)** międzyuczelniana - Uniwersytet w Białymstoku (Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny); Uniwersytet Medyczny w Lublinie (Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych - Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej; Zakład Farmakologii - Wydział Nauk o Zdrowiu; Zakład Zintegrowanej Stomatologii Wieku Rozwojowego, Katedra Stomatologii Wieku Rozwojowego - I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym; Katedra i Klinika Położnictwa i Perinatologii - II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym; Klinika Położnictwa i Perinatologii; Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej - Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 4 w Lublinie); Państwowa Akademia Nauk w Lublinie (Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego z Laboratorium Zastosowań Optycznych Techniki Pomiarowych; Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych z Laboratorium Oceny Jakości Surowców Zbożowych i Oleistych; Zakład Fizykochemii Materiałów Porowatych - Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego); Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (Katedra Technologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności); Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. Kazimierza Pułaskiego w Radomiu (Zakład Chemii i Technologii Polimerów - Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa); Instytut Nowych Syntez Chemicznych, Puławy (Zakład Ekstrakcji Nadkrytycznej);
- d)** międzynarodowa – Uniwersytet w Pizie (Katedra Nauk Weterynaryjnych);
co potwierdzają afiliacje w publikacjach i/lub przebyte staże.

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

	Przed uzyskaniem stopnia doktora			Po uzyskaniu stopnia doktora		
	Liczba publikacji	IF	Punkty MNiSW	Liczba publikacji	IF	Punkty MNiSW
Czasopisma z listy JCR Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	-	-	-	5	7,981	150
Czasopisma z listy JCR Publikacje oryginalne	-	-	-	18	22,853	455
Pozostałe czasopisma Prace oryginalne	-	-	-	6	-	32
Pozostałe czasopisma Prace przeglądowe	-	-	-	5	-	12
Rozdziały w monografiach	-	-	-	1	-	-
Publikacja popularnonaukowe	2	-	-	5	-	-
Razem	2	-	-	40	30,834	649
Łączna liczba publikacji	42					
Łączny IF	30,834					
Łączna liczba pkt MNiSW	649					
Komunikaty zjazdowe Konferencje krajowe	3			24		
Komunikaty zjazdowe Konferencje międzynarodowe	-			8		
Razem	3			32		
Łącznie liczba komunikatów	35					

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie publikacji naukowych znajduje się w Załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Szczegółowe informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy z instytucjami naukowymi, odbytych stażach naukowych i szkoleniach, działalności popularyzującej naukę przedstawiłam w Załączniku nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Lublin, dn. 11.12.2018r.

Dagmara Stępień-Pyśniak