

Załącznik nr 2 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr Aneta Małgorzata Nowakiewicz

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2017

1. Imię i Nazwisko.

Aneta Małgorzata Nowakiewicz

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

- stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, specjalność – mikrobiologia weterynaryjna, nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w dniu 20 września 2005 roku; tytuł rozprawy doktorskiej: „Współczesne metody różnicowania diagnostycznego szczepów z rodzaju *Malassezia* izolowanych z przypadków klinicznych” (promotor prof. dr hab. Grażyna Ziółkowska)

- tytuł: lekarz weterynarii (dyplom lekarza weterynarii nr 30290 z dnia 1 marca 2001 roku wydany przez Akademię Rolniczą w Lublinie)

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

Od 2006 roku do dnia dzisiejszego: Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej,
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób
Zwierząt, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w
Lublinie (do 2008 roku Akademia Rolnicza
w Lublinie); adiunkt

Od 2005 do 2006: Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej,
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób
Zwierząt, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, AR w Lublinie; asystent

Od 2000 do 2005: Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej,
Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, AR w
Lublinie; doktorant

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

a) osiągnięciem naukowym jest tematyczny cykl publikacji objęty tytułem:
Fenotypowa i genotypowa analiza oporności szczepów *Enterococcus* spp. w aspekcie gatunku drobnoustroju i źródła pochodzenia

b) publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

1. **Nowakiewicz A.,** Ziółkowska G., Zięba P., Kostruba A.: Undomesticated animals as a reservoir of multidrug resistant *Enterococcus* in Eastern Europe. JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES. 2014; 50(3): 645-650. IF (2014): 1,355, punkty MNiSW (2014): 30
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu większości oznaczeń fenotypowych szczepów, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%
2. **Nowakiewicz A;** Ziółkowska, G; Zięba, P; Trościańczyk, A; Banach, T; Kowalski, C.: Modified 16S-23S rRNA intergenic region restriction endonuclease analysis for species identification of *Enterococcus* strains isolated from pigs, compared with identification using classical methods and matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry. JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY. 2015; 64: 217-223. IF (2015): 2,269, punkty MNiSW (2015): 25
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu oznaczeń biochemicznych, wystandaryzowaniu i przeprowadzeniu identyfikacji metodą analizy restrykcyjnej 16S-23S ITS, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 80%
3. **Nowakiewicz A.,** Ziółkowska G., Trościańczyk A., Zięba P., Gnat S.: Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. POULTRY SCIENCE (po raz pierwszy opublikowany online 4 października 2016) doi.:10.3382/ps/pew365. IF (2016): 1,685, punkty MNiSW (2016): 35
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu kolekcji szczepów bakteryjnych, wykonaniu większości oznaczeń fenotypowych i genotypowych szczepów, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%
4. **Nowakiewicz A.,** Ziółkowska G., Trościańczyk A., Zięba P, Gnat S.: Determination of antimicrobial resistance of *Enterococcus* strains isolated from pigs and their genotypic characterization by method of amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (the ADSRRS-fingerprinting). JOURNAL OF MEDICAL

MICROBIOLOGY (po raz pierwszy opublikowany online 28 listopada 2016) doi.: 10.1099/jmm.0.000400. IF (2016): 2,269, punkty MNiSW (2016): 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań,, przeprowadzeniu analizy fenotypowej oporności szczepów, standaryzacji i oznaczeniu szczepów metodą ADSRRS-fingerprinting, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%

5. **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. PLoSOne 12(1): e0171160. doi:10.1371/journal.pone.0171160 IF (2016): 3,057, punkty MNiSW (2016): 35

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań,, analizie fenotypowej oporności szczepów, wykonaniu większości oznaczeń genotypowych szczepów (profil genowy szczepów oraz ADSRRS-fingerprinting), analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji:

- według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **145pkt.**

- łączny *impact factor* według listy JCR: **10,635**

Dla publikacji nr 3 i 4 (opublikowanych w wersji online w 2016 roku) i nr 5 (opublikowanej w 2017 roku) podano aktualne dane z roku 2016

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

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* należą do ubikwitalnych, gram dodatnich, kulistych lub owalnych drobnoustrojów; większość gatunków nie wytwarza rzęsek oraz typowych otoczek. Występują one powszechnie w środowisku, a także mogą kolonizować przewód pokarmowy ssaków, gadów, ptaków oraz bezkręgowców [9].

Komensalny charakter tych bakterii ulegał systematycznej zmianie w ostatnich kilkudziesięciu latach. Obecnie bakterie z rodzaju *Enterococcus* ze względu na wysoki udział w infekcjach szpitalnych oraz co raz częstsze zachorowania u zwierząt (głównie bydła, świń i drobiu) [23,33] stanowią poważne zagrożenie zdrowia publicznego.

Przyczyny zmiany statusu epidemiologicznego tych drobnoustrojów są złożone; wydaje się, że do najbardziej istotnych obok czynników wirulencji, zaliczyć należy naturalną oporność na szerokie spektrum substancji przeciwbakteryjnych

(min. obniżona wrażliwość na β -laktamy i aminoglikozydy) [10], łatwość nabywania i przekazywania determinant lekooporności oraz wysoka oporność na niesprzyjające warunki środowiska (min. promieniowanie UV, metale ciężkie, alkohole, detergenty, zdolność do wzrostu niektórych gatunków nawet w temperaturze do 45°C)

Spośród znanych obecnie 55 gatunków *Enterococcus*, znaczenie epidemiologiczne mają przede wszystkim *E. faecium* i *E. faecalis* (wymieniane jako trzecia i czwarta przyczyna infekcji szpitalnych na świecie) [9], szczególnie szczepy wielolekooporne i/lub odporne na glikopeptydy (VAN+), wysokie stężenie aminoglikozydów (HLAR+) oraz streptograminy (*E. faecium*) [9,21].

Zjawisko narastania i rozprzestrzeniania się oporności drobnoustrojów stanowi obecnie jeden z najistotniejszych ogólnoswiatowych problemów terapeutycznych, a według danych publikowanych w ciągu ostatnich dwóch dekad, obejmujących analizę wielolekoopornych szczepów izolowanych zarówno od ludzi jak i zwierząt, znaczący udział w tym procesie mają również bakterie należące do gatunku *E. faecium* i *E. faecalis*.

Cyrkulacja i rozprzestrzenianie się tych drobnoustrojów jest stosunkowo złożonym zjawiskiem zachodzącym nie tylko na drodze bezpośredniego kontaktu pomiędzy człowiekiem a zwierzęciem hodowlanym/ domowym, ale w proces ten mogą być włączone również populacje zwierząt wolno żyjących, szczególnie gatunków, które cechuje wysoki współczynnik synantropizacji. Poprzez kontakt ze środowiskami zantropogenizowanymi, mogą one nabywać klony szczepów wysoce opornych i stanowić pośrednie ogniwo w łańcuchu rozprzestrzeniania się zjawiska oporności.

Istotnym elementem odpowiedzialnym za znaczenie i udział szczepów *Enterococcus* w rezerwuarze oporności jest łatwość nabywania i przekazywania drogą horyzontalną, mobilnych determinant oporności połączonych często z genami wirulencji (plazmidy, transpozony etc.). Co istotne, transfer może odbywać się nie tylko pomiędzy szczepami tego samego gatunku i rodzaju ale również może obejmować patogeny należące do innych taksonów, jak np. *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Listeria* [39].

Zróznicowany poziom lekooporności w populacji szczepów *Enterococcus* izolowanych od człowieka i różnych gatunków zwierząt, a nawet grup produkcyjnych w obrębie tego samego gatunku jest zjawiskiem dynamicznym dlatego obok wieloletnich programów monitoringowych mających na celu globalną ocenę trendów kształtowania się oporności, niezbędne są również krótkoterminowe badania o zasięgu lokalnym umożliwiające analizę i ocenę

stopnia rozprzestrzeniania się szczepów wywołujących lokalne epidemie oraz poziom oporności w odniesieniu do poszczególnych leków (ocena możliwości terapeutycznych).

Prowadzony od szeregu lat monitoringowy program globalnej oceny poziomu oporności drobnoustrojów zoonotycznych i wskaźnikowych u zwierząt hodowlanych w krajach europejskich, od dwóch lat nie obejmuje danych odnośnie oporności *Enterococcus* spp [7,8]. Do chwili obecnej również Polska nie uczestniczy w programach monitoringu oporności *Enterococcus* u zwierząt [6], a dane z tego zakresu dotyczące naszego kraju są fragmentaryczne i nieregularne [30,36].

Pomimo prowadzonych intensywnych badań, analiza lekooporności *Enterococcus* w aspekcie molekularnego typowania epidemiologicznego, odzwierciedlającego rozprzestrzenianie się klonów o specyficznych profilach oporności, nadal wymaga opracowania specyficznych, powtarzalnych i łatwych do zastosowania narzędzi.

Celem prowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego badań było:

- opracowanie prostej, powtarzalnej i wiarygodnej metody identyfikacji gatunków *Enterococcus* najczęściej izolowanych od zwierząt z uwzględnieniem gatunków najbardziej istotnych epidemiologicznie
- określenie zróżnicowania gatunkowego i oporności fenotypowej szczepów *Enterococcus*
- analiza geno-profilu oporności i wirulencji u szczepów izolowanych od drobiu i trzody chlewnej
- dobór i standaryzacja warunków molekularnej metody typowania lekoopornych szczepów *Enterococcus*; analiza i ocena korelacji fenotypowych profili oporności z genotypami (uzyskanymi metodą ADSRRS-fingerprinting) i profilami proteomicznymi (uzyskanymi metodą MALDI-TOF MS)

Izolacja i identyfikacja gatunkowa szczepów *Enterococcus* u zwierząt wolno żyjących, egzotycznych i hodowlanych (świń, drobiu i bydła)

(praca nr 1, 2, 3, 4, 5)

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* stanowią ważny element fizjologicznej bioty przewodu pokarmowego ludzi zwierząt. Profil gatunkowy tych bakterii jest zróżnicowany i zależy w dużym stopniu od gatunku gospodarza, przy czym dominuje na ogół *E. faecalis*, *E. faecium* i *E. hirae*). W obecnych badaniach przeanalizowałam ponad 350 próbek od kilkunastu różnych gatunków zwierząt, wśród których największy udział miały: *Gallus gallus domesticus* oraz *Sus scrofa domestica*, *Vulpes vulpes*, *Testudo horsfieldii* i *Bos taurus*. Mając na

względnie precyzyjnie prowadzonych badań, zmodyfikowałam procedurę izolacji w przypadku prób pochodzących od drobiu i świń; tzn. z każdej próbki typowałam do dalszych badań nie jedną a 4 lub 5 kolonii, fenotypowo klasyfikowanych jako *Enterococcus* spp. Taka strategia pozwoliła ocenić zróżnicowanie gatunkowe szczepów *Enterococcus*, nie tylko w obrębie poszczególnych gatunków zwierząt lub stad, a le również u pojedynczych osobników. Jest to niezwykle pracochłonna i kosztochłonna procedura, szczególnie w przypadku badań przesiewowych ale umożliwia precyzyjną ocenę dystrybucji poszczególnych gatunków bakterii w obrębie puli badanych zwierząt, a w konsekwencji ustalenie prawidłowych profili ich lekooporności. Przykładowo, w pracy nr 4 wykazałam 32.6% próbek heterogennych pod względem izolowanych gatunków, tj. od jednego zwierzęcia uzyskiwałam 2 lub 3 odrębne gatunki *Enterococcus*, a w przypadku puli zwierząt badanych w pracy nr 3, wartość ta wynosiła 27%.

Fenotypowa i genotypowa identyfikacja gatunkowa szczepów *Enterococcus* spp. jest trudna i pomimo szerokiego panelu dostępnych metod nie zawsze pozwala na uzyskanie jednoznacznych wyników.

Dostępne testy komercyjne typu API (ang. analytical profile index) zastosowane do analizy porównawczej metod identyfikacji w pracy nr 2 (zastosowano dwa testy komercyjne firmy Erba Lachema obejmujące 8 i 24 cechy biochemiczne) nie pozwoliły na wiarygodną identyfikację fenotypową na poziomie gatunku (w zależności od testu uzyskano miarodajną identyfikację jedynie 19% lub 57% badanych szczepów). Dlatego wydaje się, że mogą być one stosowane jedynie jako badanie potwierdzające wiarygodne rozpoznanie na poziomie rodzaju bakterii.

Molekularna identyfikacja gatunkowa *Enterococcus* w oparciu o analizę polimorfizmu genów min. genu *ddl* kodującego ligazę D-Ala-D-Ala [4] oraz genu *sodA* kodującego dysmutazę nadutlenkową [16] pozwoliła na uzyskanie wiarygodnego wyniku, ale w przypadku genu *ddl* uzyskałam identyfikację jedynie dwóch gatunków (*E. faecium* i *E. faecalis*) (praca nr 2), natomiast analiza polimorfizmu genu *sodA* wymagała użycia kilkunastu odrębnych par starterów specyficznych gatunkowo i przeprowadzenia siedmiu różnych reakcji multiplex-PCR, co znacznie wydłużyło czas i podniosło koszty oznaczenia (dane niepublikowane).

Przeprowadzając analizę gatunkową stosunkowo dużej puli szczepów *Enterococcus* wypracowałam własną metodykę identyfikacji gatunkowej opartą o analizę restrykcyjną regionu zlokalizowanego pomiędzy genami *rrs* i *rsl* (ang.

ITS – Internal Transcribed Spacer) należącego do genów kodujących rybosomalne RNA (rRNA) znajdujących się w operonach *rrn*. W genomie bakteryjnym może znajdować się od kilku do kilkunastu kopii tego operonu. W każdym operonie region polimorficzny może cechować się różną długością oraz sekwencją. Ze względu na duży polimorfizm, fragmenty DNA powstałe w wyniku amplifikacji, po rozdziale elektroforetycznym dają charakterystyczny dla danego rodzaju/gatunku profil prążków.

Opracowana procedura identyfikacji gatunkowej cechuje się wysoką wiarygodnością i powtarzalnością, a także jest prosta w wykonaniu: całość badania składa się jedynie z klasycznej reakcji PCR oraz analizy restrykcyjnej polimorfizmu jej produktów; co ważne enzymy do analizy restrykcyjnej zostały dobrane w taki sposób aby można było przeprowadzić wizualizację w 2% żelu agarozowym. Identyfikacja gatunkowa *Enterococcus* w oparciu o ITS PCR opisywana wcześniej przez innych autorów, wymagała wizualizacji za pomocą żelu poliakrylamidowego ze względu na niewielkie różnice w wielkości produktów [37]. Rozwiązanie zaproponowane przeze mnie znacznie skróciło czas przeprowadzenia identyfikacji (do 4 godzin), a także pozwoliło na zwiększenie bezpieczeństwa procedury (eliminacja toksycznego akrylamidu). Istotną zaletą opracowanego rozwiązania jest również możliwość identyfikacji dziewięciu gatunków *Enterococcus* najczęściej izolowanych od zwierząt (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. columbae*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. thailandicus*) w tym również tych, które stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Dystrybucja szczepów *Enterococcus* spp. u zwierząt (praca nr 1,3,4)

W przeprowadzonych badaniach wyizolowałam i określiłam przynależność gatunkową ponad 1100 szczepów z rodzaju *Enterococcus* spp. Badania koncentrowały się przede wszystkim na gatunkach *E. faecium* i *E. faecalis* ze względu na ich znaczenie epidemiologiczne. W przypadku trzody chlewnej gatunkiem dominującym był *E. faecalis*, przy czym odsetek izolowanych szczepów był zróżnicowany (od 80% do 4%), w zależności od źródła pochodzenia zwierząt (farmy o zróżnicowanych sposobach żywienia oraz odmiennych panelach stosowanych leków przeciwbakteryjnych) (praca nr 4). Ze względu na odmienny profil gatunkowy szczepów *Enterococcus* izolowanych z kału bydła, tj. głównie *E. casseliflavus*, *E. mundtii* i *E. hirae*, które mają niewielkie znaczenie epidemiologiczne i cechują się zwykle wysoką wrażliwością na preparaty przeciwbakteryjne (dane niepublikowane), do badań

porównawczych wytypowałam wyłącznie próbki mleka. W tym przypadku u zdrowych klinicznie krów wykazałam przede wszystkim obecność *E. faecalis* (100%) (praca nr 1). Przewód pokarmowy drobiu był z kolei głównie kolonizowany przez *E. faecium* (72,9%) (praca nr 3). Wynik taki był dużym zaskoczeniem, ponieważ w większości opracowań naukowych, u drobiu odnotowuje się przewagę *E. faecalis* lub wartości dla obu gatunków są na zbliżonym poziomie [2,33]. Notowana rozbieżność może być następstwem odmiennego sposobu żywienia i/lub stosowanej terapii ale może również wynikać z odmiennej procedury izolacji bakterii zastosowanej w badaniach (analiza 4 izolatów od pojedynczego osobnika)

W przypadku zwierząt wolno żyjących (głównie lisy i kuny) i egzotycznych (żółwie stepowe) wykazano również wysoki odsetek izolacji *E. faecalis* (odpowiednio 42,8% i 82,3%), co w połączeniu z odnotowanym w kolejnym etapie badań, wysokim poziomem oporności tych szczepów może wskazywać na potencjalny udział tych grup zwierząt w tworzeniu rezerwuaru opornych i wielolekoopornych szczepów *Enterococcus*. Należy zaznaczyć, że analiza dystrybucji szczepów *Enterococcus* w grupie zwierząt wolno żyjących i egzotycznych jest pierwszym takim doniesieniem z Polski.

Analiza fenotypowych profili oporności szczepów *Enterococcus* (praca nr 1,3,4,5)

Analizę fenotypowych profili oporności szczepów *Enterococcus* spp. przeprowadziłam ze szczególnym uwzględnieniem gatunków *E. faecalis* i *E. faecium* (najważniejsze gatunki pod względem epidemiologicznym i klinicznym). Oznaczenie poziomu oporności i interpretacja uzyskanych wyników dotyczyła przede wszystkim oporności nabytej, związanej z horyzontalnym przekazywaniem genów lub sporadycznymi mutacjami. Nie uwzględniłam natomiast oporności naturalnej, cechującej większość gatunków *Enterococcus* (niskie stężenie antybiotyków beta laktamowych, aminoglikozydów, linkozamidów) lub tylko pojedyncze gatunki (*E. faecalis* na chinupristinę –dalfopristinę oraz obniżona wrażliwość szczepów *E. casseliflavus* i *E. gallinarum* na wankomycynę). W początkowym etapie badań do fenotypowej analizy oporności u zwierząt wolno żyjących i egzotycznych oraz izolatów od bydła, wykorzystałam metodę dyfuzyjno-krążkową, wystarczającą do standardowej analizy, tj. w przypadku izolacji pojedynczego szczepu od każdego osobnika (praca nr 1). Jednakże w przypadku izolacji i analizy więcej niż jednego szczepu od tego samego osobnika (szczególnie

szczepów należących do tego samego gatunku *Enterococcus*), niezbędne jest bardziej precyzyjne określenie i porównanie poziomu oporności. W pracy nr 3,4 i 5 wykorzystałam zatem metodę mikrorozcieńczeń, określając minimalne stężenie hamujące MIC (ang. minimal inhibitory concentration).

Fenotypowe profile oporności badanych szczepów cechowały się bardzo dużym zróżnicowaniem; obejmowały oporność na kilka do kilkunastu substancji przeciwbakteryjnych w zależności od gatunku i zróżnicowania badanej grupy zwierząt.

Wykazałam, że w przypadku drobiu, świń i bydła, najczęściej notowanym typem oporności jest oporność na erytromycynę i tetracyklinę oraz wysokie stężenie kanamycyny i streptomycyny (ang. HLKR i HLSR) (praca nr 3, 4 i 5). U zwierząt wolno żyjących i egzotycznych dominowały natomiast szczepy odporne na fluorochinolony i rifampicynę (praca nr 1).

Wykazałam również, że izolaty odporne na tylozynę (pochodzące od świń) cechowały się w każdym przypadku krzyżową opornością na erytromycynę, a z kolei oporności na enrofloksacynę towarzyszyła niewrażliwość na ciprofloksacynę. Obserwacje te potwierdzają pogląd, że w przypadku stosowania u ludzi i zwierząt różnych substancji przeciwbakteryjnych ale należących do tej samej klasy leków, istnieje wysokie prawdopodobieństwo koselekcji szczepów cechujących się opornością krzyżową [15].

Z kolei brak oporności na wankomycynę w badanej puli szczepów pochodzących od zwierząt domowych związany jest prawdopodobnie z zakazem stosowania w krajach Unii Europejskiej awoparcyny jako promotora wzrostu u zwierząt [1], natomiast obecność niewrażliwych na wankomycynę szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* wykazana we wcześniejszych badaniach u zwierząt wolno żyjących, egzotycznych oraz pojedynczych izolatów u bydła stanowi kolejne potwierdzenie tego zjawiska (praca 1).

Analizując poziom oporności badanych szczepów na wysokie stężenie aminoglikozydów, wykorzystałam kryteria interpretacji rekomendowane przez CLSI (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute), odpowiednio dla gentamycyny $\geq 512 \mu\text{l ml}^{-1}$ i streptomycyny $\geq 1024 \mu\text{l ml}^{-1}$ oraz NARMS (ang. National Antimicrobial Resistance Monitoring System Animal Isolates) dla kanamycyny ≥ 1024 (ponieważ CLSI nie definiuje wartości MIC dla tego antybiotyku) Kliniczne wartości odcięcia proponowane przez EUCAST (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) są nieco niższe dla gentamycyny ($> 128 \mu\text{l ml}^{-1}$) ale w toku prowadzonych badań stwierdziłam, że różnica ta nie wpłynęła na interpretację wyników, ponieważ wartości MIC

badanych przez mnie szczepów opornych na wysokie stężenie gentamycyny (HLGR) i szczepów wrażliwych były wyraźnie zróżnicowane (odpowiednio $\geq 512 \mu\text{l ml}^{-1}$ i $< 32 \mu\text{l ml}^{-1}$) co wykluczało potencjalną możliwość błędu oszacowania. Decydując się na rozszerzenie panelu badanych antybiotyków aminoglikozydowych (na ogół zalecana jest analiza oporności na gentamycynę i streptomycynę), kierowałam się argumentem, że fenotypowa oporność na aminoglikozydy determinowana jest przez bardzo szeroki panel enzymów, kodowanych przez wiele różnorodnych genów i jak wykazałam w dalszym etapie badań genotypowych (praca nr 3,4 i 5) zróżnicowanie wysokiego poziomu oporności na trzy wytypowane aminoglikozydy miało ogromny wpływ na profil genetyczny izolatu.

Wykazany w obecnych badaniach wysoki odsetek szczepów HLAR izolowanych od różnych gatunków zwierząt (od 5,3% HLGR do 34,2% HLSR) stanowi uzupełnienie bardzo istotnych danych, ponieważ doniesienia z naszego kraju obejmują w większości prace prezentujące poziom i zakres oporności szczepów izolowanych od ludzi, natomiast istnieją jedynie fragmentaryczne informacje dotyczące izolacji szczepów o fenotypie HLAR od zwierząt [30,36]. Co więcej, poziom i zakres oporności na aminoglikozydy w opublikowanych przeze mnie pracach jest bardzo zbliżony do fenotypu oporności szczepów statystycznie najczęściej izolowanych z przypadków infekcji szpitalnych w Polsce [8,35]. Zaobserwowane zjawisko wydaje się bardzo niepokojące ze względu na fakt, że wystąpienie oporności typu HLAR niweluje synergistyczną aktywność aminoglikozydów stosowanych w kombinacji z antybiotykami działającymi na ścianę komórkową bakterii (np. β -laktamowych), które stanowią istotny element terapii wysokoopornych infekcji na tle *Enterococcus*, np. *endocarditis* u ludzi.

Pulę badanych szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* niezależnie od źródła ich pochodzenia (gatunek zwierząt), charakteryzował wysoki odsetek izolatów wielolekoopornych (ang. multi drug resistant MDR) i wynosił on odpowiednio 84% i 42% u świń; 58,6% i 56,8% u drobiu; 57% u bydła; 46% u zwierząt wolno żyjących oraz 59% u zwierząt egzotycznych. Ze względu na zaskakująco wysoki odsetek szczepów MDR wykazany u zwierząt wolno żyjących, badania w zakresie oporności szczepów *Enterococcus* zostały przeprowadzone ponownie ale na znacznie większej puli zwierząt (około 350 osobników) [28]. Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze dane (około 45% wszystkich izolatów cechowało się fenotypem MDR), wskazując z jednej strony na

prawidłowość przeprowadzonych analiz, z drugiej zaś na znaczenie tej grupy zwierząt jako potencjalnego rezerwuaru szczepów MDR.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że prezentowane w powyższych pracach dane uzupełniają w sposób istotny charakterystykę rezerwuaru lekooporności na terenie Polski.

Analiza genetycznych profili oporności i wirulencji szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* (praca nr 3 i 5)

Molekularna analiza oporności szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* została przeprowadzona dla szczepów izolowanych od drobiu (praca nr 4), świń (praca nr 5) oraz zwierząt wolno żyjących (dane niepublikowane prezentowane na konferencji),[28].

Ze względu na złożony proces i mechanizmy kształtowania się oporności *Enterococcus*, strategię identyfikacji genów oporności przeprowadziłam według schematu uwzględniającego następujące typy oporności:

- aminoglikozydy – 10 genów [*aac*(6')-Ie-*aph* (2'')-Ia, *aph*(3')-IIIa, *ant*(6)-Ia, *aph*(2'')-Ib , *aph*(2'')-Ic, *aph*(2'')-Id, *aadA*, *ant*(4')-Ia, *ant*(9)-Ia]
- makrolidy – 6 genów (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*, *mefA*, *msrA*) oraz linkozamidy (*lnuB*, *lnuF*)
- tetracykliny – 5 genów (*tetM*, *tetK*, *tetO*, *tetL*, *tetS*)
- fenikole – geny z grupy *cat* (*catA*-7, *catA*-8 i *catA*-9) oraz geny *cfr*, *fexA*
- streptograminy (*E. faecium*) - geny *vatD* i *vatE*.
- miedź (izolaty pochodzące od świń) – gen *tcrB*

Dobry profil genów oporności okazał się specyficzny oraz stosunkowo precyzyjny; oporność fenotypowa na poszczególne substancje przeciwbakteryjne została potwierdzona obecnością co najmniej jednego genu w materiale genetycznym wszystkich izolatów *E. faecium* i *E. faecalis* pochodzących od drobiu i świń (praca nr 4 i 5). W przypadku izolatów pochodzących od zwierząt wolno żyjących [28] 98% szczepów opornych, było nosicielami co najmniej jednego badanego genu kodującego specyficzny typ oporności.

Porównując profile genowe we wszystkich badanych grupach zwierząt, stwierdziłam że bez względu na gatunek zwierząt od których pochodziły izolaty, oporność na poszczególne antybiotyki była determinowana przez bardzo podobny panel genów, a ich procentowy udział był zbliżony. U 99% szczepów opornych na tetracyklinę i/lub makrolidy oporność była determinowana przez gen *tetM* i *ermB*, przy czym u znacznego odsetka szczepów

tetracyklinoopornych wykazałam współobecność *tetL* lub *tetO* (ten ostatni tylko u szczepów izolowanych od drobiu). Wartym podkreślenia wydaje się fakt, że obecność u tego samego szczepu genów *tetM* i *tetL* (determinanty kodujące dwa odrębne mechanizmy oporności) znacząco podnosiła wartość MIC dla tetracykliny w porównaniu do tetracyklinoopornych szczepów cechujących się obecnością pojedynczych genów *tet* (praca nr 5). Gen *ermB* wykazany u szczepów opornych na makrolidy na ogół występował pojedynczo. Jedynie u szczepów pochodzących od świń stwierdziłam jednoczesną obecność genu *ermF*, prawdopodobnie ściśle związanego z opornością szczepów izolowanych od tego gatunku gospodarza [12,31].

Pomimo zastosowania szerokiego panelu badanych genów oporności na aminoglikozydy wykazałam, że genami dominującymi wśród polskich szczepów odzwierzęcych są: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa* i *ant(6)-Ia* oraz *ant(9)-Ia* (wśród izolatów pochodzących od drobiu). Co ważne, u wysokiego odsetka badanych szczepów HLAR (szczególnie u szczepów izolowanych od świń) geny te występowały jednocześnie (dwa lub trzy) u tego samego szczepu. Jest to szczególnie istotne w przypadku szczepów HLKR, u których oporność na kanamycynę może być determinowana jednocześnie przez dwa geny, tj. *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* i *aph(3')-IIIa* (zjawisko to zaobserwowałam u wszystkich szczepów HLKR izolowanych od świń), natomiast prawidłowość ta nie wpływa na poziom wartości MIC.

Oporność na chloramfenikol występowała jedynie u szczepów izolowanych od świń i zwierząt wolnożyjących. Warunkowana była ona głównie obecnością genów kodujących acetylotransferazy z grupy A-8 i A-9 (*catA*-8 i 9). W żadnym przypadku nie wykazałam obecności genu *cat* z grupy A-7, która jak dotąd uznawana była za najczęściej wykazywaną determinantę odpowiedzialną za oporność na chloramfenikol wśród szczepów *Enterococcus* izolowanych od zwierząt [2]. Zastosowanie w obecnych badaniach rozszerzonego panelu genów *catA* umożliwiło nie tylko molekularne potwierdzenie oporności fenotypowej ale pozwoliło również na wykazanie odrębności genetycznej badanych szczepów. Zaobserwowana przeze mnie odmienność wydaje się dodatkowo potwierdzać zjawisko horyzontalnej wymiany genów oporności pomiędzy odrębnymi rodzajami bakterii [32]. Obecność genów *catA*-9 oraz *fexA* u niewielkiego odsetka szczepów opornych na chloramfenikol (praca nr 5) może sugerować ich horyzontalny transfer ze szczepami *Staphylococcus* spp, które były pierwotnie głównymi nosicielami tych genów [32].

Przeprowadzone badania wykazały potwierdzoną statystycznie, zgodność fenotypowych i genotypowych profili oporności badanych szczepów *Enterococcus*, wskazując równocześnie na prawidłowy dobór stosowanych metod i procedury ich przeprowadzenia (praca nr 5). Na podkreślenie zasługuje również fakt, że są to według dostępnej literatury, pierwsze w Polsce, w tak szerokim aspekcie przeprowadzone badania, obejmujące równoczesną analizę fenotypowej i genotypowej oporności izolatów *Enterococcus* pochodzących od drobiu, świń i zwierząt wolno żyjących.

Analiza genetycznych profili wirulencji badanych szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* stanowiła kolejny etap mający na celu weryfikację poziomu zróżnicowania genomów badanych szczepów. Do badań wytypowałam następujący panel genów wirulencji: gen kodujący żelatynazę (*gelE*), hialuronidazę (*hly*), hemolizyny (*cylA*, B i M), specyficzne gatunkowo adhezyny ściany komórkowej (*efaA_{fm/fs}*), czynnik agregacyjny (*agg*), ochronne białko związane ze ścianą komórkową (*esp*) oraz tzw. feromony ułatwiające proces koniugacji (*cpd*, *cob* i *ccf*). Genetyczne profile wirulencji badanych szczepów cechowały się znacznie większą i bardziej zróżnicowaną pulą genów w przypadku szczepów należących do gatunku *E. faecalis* (profil obejmował od 5 do 9 determinant) aniżeli szczepów *E. faecium*. Wszystkie szczepy *E. faecium* izolowane od drobiu cechowała homogenność przejawiająca się obecnością w genomie jedynie dwu genów: *efaA_{fm}* kodującego specyficzną gatunkowo adhezynę, oraz genu *ccf* związanego z ułatwianiem procesu koniugacji bakterii.

Niezależnie od źródła pochodzenia szczepu (gatunek zwierząt) wszystkie badane szczepy *E. faecalis* posiadały gen *efaA_{fs}* oraz geny *cpd*, *cob* i *ccf*; u większości występowały również *gelE* i *agg*, w nieco mniejszym zakresie gen *esp*, natomiast jedynie u części szczepów izolowanych od trzody chlewnej wykazałam geny kodujące hemolizyny (*cylA*, B i M).

Wieloskładnikowy geno-profil wirulencji szczepów *E. faecalis* zawierający również geny *cpd*, *cob* i *ccf* oraz *agg* świadczy nie tylko o ich wysokim potencjale wirulencji ale również o zdolności tych szczepów do transferu tzw. feromono-wrażliwych plazmidów o szerokim (*E. faecalis*) lub wąskim spektrum (*E. faecium*) gospodarza, będących nośnikami min. cech oporności i wirulencji [13].

W swoich pracach analizowałam również obecność genów związanych z innymi mechanizmami horyzontalnego przekazywania genów oporności. Wskazówką do prowadzenia dalszych badań był stosunkowo wysoki odsetek szczepów jednocześnie opornych na tetracykliny, makrolidy i aminoglikozydy. Obecność

genu kodującego integrazę (*Tn-Int*) charakterystyczną dla *Tn1545*-like transpozonów u izolatów pochodzących zarówno od świń i drobiu, pośrednio potwierdza zdolność szczepów do jednoczesnego horyzontalnego transferu genów *tetM*, *ermB*, i *aph(3')-IIIa* często wspólnie zlokalizowanych na tej mobilnej determinancie genetycznej. Biorąc pod uwagę fakt, że genetyczne profile oporności szczepów izolowanych od różnych gatunków zwierząt były do siebie zbliżone, słusznym wydaje się spostrzeżenie iż istnieje wiele genetycznych powiązań pomiędzy genami oporności, a wysoki odsetek szczepów wielolekoopornych stwierdzony również w obecnych badaniach jest raczej efektem regularnej i skonsolidowanej wymiany aniżeli przypadkowego przekazywania pojedynczych genów [11].

**Analiza fenotypowych i genotypowych profili oporności szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* w kontekście molekularnych metod typowania.
(praca nr 3, 4, 5)**

Wysoka oporność na substancje przeciwbakteryjne szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* jest zjawiskiem szeroko analizowanym i opisywanym na całym świecie szczególnie w aspekcie zmian zachodzących w genomie wraz ze zmieniającym się profilem oporności fenotypowej [13,39]. Wydaje się, że w przypadku szczepów należących do tego rodzaju, profil genetycznych determinant oporności oraz czynników wirulencji odgrywa bardzo ważną rolę w procesie różnicowania poszczególnych izolatów. Jednakże ze względu na ogromną różnorodność genów i zjawisk (np. zmian zachodzących na drodze mutacji), biorących udział w kształtowaniu obu tych cech, nie zawsze możliwe jest zróżnicowanie szczepów jedynie na tej podstawie. Dlatego też wybierając metodę typowania przydatną w dywersyfikacji szczepów *Enterococcus* brałam pod uwagę przede wszystkim stopień korelacji pomiędzy fenotypowymi profilami oporności, które stanowiły pierwsze kryterium różnicowania, genotypowymi profilami obejmującymi zarówno geny oporności jak i wirulencji a profilami uzyskanymi za pomocą wybranej metody typowania molekularnego. Aby uzyskać pożądaną wynik musiałam również przeanalizować potencjał dyskryminacyjny i powtarzalność metody, a w dalszej kolejności także stopień trudności oraz czaso- i kosztochłonność poszczególnych procedur z uwzględnieniem aktualnych metod, najczęściej wykorzystywanych w molekularnym typowaniu drobnoustrojów. Spośród stosowanych i cytowanych w piśmiennictwie międzynarodowym metod, najczęściej wymieniane są: wielolokusowa analiza sekwencji genów (ang. MLST), analiza restrykcyjna

chromosomalnego DNA połączona z elektroforezą pulsową (ang. PFGE) oraz stale rozwijająca się spektrometria mas (ang. MS)

Metoda MLST stanowi doskonałe narzędzie do zakrojonych na szeroką skalę analiz populacyjnych, natomiast ze względu na procedurę badawczą ograniczoną jedynie do analizy sekwencji genów metabolizmu podstawowego (w przypadku *Enterococcus* wymagana jest amplifikacja i analiza sekwencji 7 różnych genów dla każdego badanego szczepu) posiada zbyt niski potencjał dyskryminacyjny umożliwiający zróżnicowanie blisko spokrewnionych szczepów lub szczepów o odmiennych profilach oporności [38]. Co więcej geny metabolizmu podstawowego są wysoce konserwatywne i rzadko ulegają mutacjom oraz presji selektywnej, w przeciwieństwie do determinant oporności. Zaletą gwarantującą powtarzalność wyników są doskonale opracowane i ogólnie dostępne procedury, z drugiej jednak strony technika ta w porównaniu z innymi jest bardzo kosztowna i pracochłonna.

Metoda PFGE ze względu na powtarzalność oraz wysoki potencjał dyskryminacji wciąż uważana jest za tzw. „złoty standard” metod wykorzystywanych w typowaniu większości drobnoustrojów [18]. Jednakże sporym problemem, podnoszonym przez wielu badaczy są z jednej strony bardzo czasochłonne i wymagające przeprowadzenia przez wykwalifikowany i doświadczony personel procedury, z drugiej zaś wymagane jest spore doświadczenie osoby interpretującej wyniki [38]. W oparciu o przeprowadzone badania [19,20] oraz własne doświadczenia badawcze [3,27] podjęłam próbę zastosowania alternatywnej do PFGE metody, opracowanej przez Krawczyk i wsp. [19]. Jest to jedna z technik opartych na ligacji adaptorów oligonukleotydowych, tj. amplifikacja fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne (ang. ADSRRS-fingerprinting).

Decydując się na wykorzystanie metody ADSRRS-fingerprinting kierowałam się przede wszystkim wysokim potencjałem dyskryminacyjnym porównywalnym do metody PFGE [19] oraz powtarzalnością oznaczeń, którą oceniałam również w badaniach własnych poprzez trzykrotne powtórzenie pełnej procedury analizy tego samego szczepu ale uzyskanego z trzech odrębnych, przesuniętych w czasie kultur hodowlanych (praca nr 3,4 i 5). Dodatkowymi czynnikami determinującymi wybór metody jest brak konieczności znajomości sekwencji genomowego DNA, łatwość przeprowadzenia poszczególnych procedur oraz stosunkowo krótki w porównaniu do PFGE czas analizy (około 7 godzin łącznie z etapem elektroforezy). Jednakże najistotniejszą wykazaną i potwierdzoną w obecnych badaniach zaletą, jest bardzo wysoki stopień korelacji

fenotypowych i genotypowych profili oporności badanych szczepów, z profilami uzyskanymi za pomocą ADSRRS-fingerprinting (praca nr 3,4 i 5). Analizy prowadzone na puli szczepów należących do gatunku *E. faecium* i *E. faecalis* izolowanych od drobiu i trzody chlewnej wskazują na duży udział genetycznych determinant oporności i wirulencji w kształtowaniu genotypów uzyskanych tą metodą. Dodatkowym potwierdzeniem wysokiej precyzji i potencjału dyskryminacyjnego zastosowanej metody, było wykazanie więcej niż jednego profilu ADSRRS w przypadku części szczepów należących do tego samego gatunku i cechujących się tym samym fenotypem oporności oraz panelem genów wirulencji. Jak wykazały badania przeprowadzone w pracy nr 3 i 5, heterogenność profili ADSRRS związana była przede wszystkim z odmiennymi mechanizmami oporności bakterii na ten sam antybiotyk (różne panele genów).

Analiza uzyskanych wyników wskazuje również w sposób pośredni na możliwość przenoszenia się określonych klonów opornych i wielolekoopornych szczepów *Enterococcus* pomiędzy sąsiednimi gospodarstwami. Stwierdziłam obecność homogennych genotypów ADSRRS u zwierząt pochodzących z różnych farm (odpowiednio z trzech farm świń i siedmiu farm drobiu). Typowanie przy użyciu metody ADSRRS-fingerprinting umożliwiło również wykazanie i potwierdzenie nosicielstwa szczepów należących do tego samego gatunku ale zróżnicowanych pod względem genotypu u tego samego osobnika. W połączeniu z wprowadzoną i zmodyfikowaną przeze mnie strategią analizy prób opisaną powyżej, wykazałam, że bardzo duży odsetek zwierząt (szczególnie wśród drobiu) cechuje nie tylko nosicielstwo więcej niż jednego gatunku *Enterococcus* (nawet do 27% zwierząt) ale również, że pojedynczy osobnik może być źródłem dwóch lub trzech odrębnych klonów szczepów *E. faecium* lub *E. faecalis* zróżnicowanych zarówno pod względem oporności jak i profilu genotypowego (praca nr 3,4 i 5).

Kolejną techniką typowania zastosowaną w obecnych badaniach była spektrometria mas (MS). MS obejmuje różne techniki jonizacji oraz analizatory masy; w identyfikacji i typowaniu drobnoustrojów najczęściej wykorzystywana jest desorpcja laserowa z udziałem matrycy oraz analizator czasu przelotu (ang. MALDI-TOF MS). Technika ta z powodzeniem stosowana jest w identyfikacji gatunkowej szerokiego panelu drobnoustrojów, w tym również z rodzaju *Enterococcus*, co potwierdziły również wyniki obecnych badań zaprezentowane w pracy nr 2 i 5.

Jednocześnie podejmowane są również liczne próby wykorzystania tej techniki do analizy porównawczej i typowania drobnoustrojów należących do tego samego gatunku. Pomimo, intensywnych badań prowadzonych w ostatnich latach na zróżnicowanej gatunkowo puli badanych drobnoustrojów, nie uzyskano jak dotąd jednoznacznych wyników w zakresie przydatności metody MALDI-TOF MS do typowania drobnoustrojów, w tym również bakterii *E. faecalis* i *E. faecium* [14,17,22,26]. Ze względu na dużą precyzyjność i dostępność metody, a jednocześnie wręcz sprzeczne wyniki innych autorów dotyczące typowania zróżnicowanych pod względem oporności szczepów *Enterococcus* [22,25], podjęłam próbę analizy przydatności metody MALDI-TOF MS w wewnątrzgatunkowym typowaniu blisko spokrewnionych wielolekoopornych szczepów *E. faecalis* (praca nr 5). W pierwszym etapie profile proteomiczne uzyskane dla poszczególnych szczepów zostały poddane analizie porównawczej, która wykazała obecność wspólnych specyficznych rodzajowo i gatunkowo białek tzw. markerów, co potwierdziło znakomitą identyfikację taksonów w obrębie *Enterococcus* [29]. W kolejnym etapie profile proteomiczne zostały poddane analizie porównawczej, mającej na celu określenie stopnia korelacji pomiędzy specyficznym fenotypem i genotypem oporności szczepu a profilem białkowym (praca nr 5).

Najważniejsza i podsumowująca część analizy objęła statystyczne porównanie odwzorowania poszczególnych dendrogramów uzyskanych na podstawie fenotypowego zróżnicowania oporności, profili genów, profili ADSRRS-fingerprinting oraz profili proteomicznych. W badaniu tym zastosowałam odpowiednio dobrane współczynniki : index Simpsona (ang. Simpson's index of diversity, SID) w celu porównania siły dyskryminacyjnej poszczególnych metod oraz współczynnik Rand i współczynnik Wallace celem określenia zgodności pomiędzy grupowaniem szczepów różnymi technikami.

W przeprowadzonych badaniach metoda MALDI-TOF MS wykazała minimalnie wyższą siłę dyskryminacji wielolekoopornych szczepów *E. faecalis*, niż metoda ADSRRS-fingerprinting (0.941 vs. 0.884, odpowiednio), aczkolwiek, co ważniejsze, technika ADSRRS pozwoliła rzetelnie odwzorować grupowanie izolatów uzyskane technikami fenotypowej analizy oporności i profili genów oporności i wirulencji. Prawidłowość tą potwierdziły również wyniki wcześniejszych badań. (praca nr 3 i 4). Ponadto wartość współczynnika Rand wykazana w przeprowadzonej analizie wskazuje na jednolity sposób grupowania szczepów metodą ADSRRS-fingerprinting co statystycznie eliminuje wręcz potrzebę stosowania fenotypowych testów oporności oraz

analizę profilu determinant genowych. Z drugiej jednak strony fenotypowy profil oporności ma kluczowe znaczenie jako element standardowych procedur diagnostycznych (determinuje potencjalny sukces terapeutyczny) i badawczych ponieważ stanowi na ogół pierwotne kryterium wykrywania i różnicowania szczepów MDR dlatego też nie może zostać pominięty.

Analiza statystyczna wykazała również, że uzyskane różnice wartości indeksu Simpsona pomiędzy wynikami grupowania za pomocą MALDI-TOF MS i ADSRRS-fingerprinting nie posiadają istotności statystycznej, a zgodność wyników dla ostatniej metody znajduje się na wyższym poziomie (50-90%) aniżeli w przypadku MALDI-TOF MS (40-85%). Rozbieżności te prawdopodobnie wynikają z faktu, że oba narzędzia bazują na zupełnie odmiennych podstawach metodycznych: metoda ADSRRS-fingerprinting analizuje zróżnicowanie całkowitego, genomowego DNA w oparciu o polimorfizm miejsc restrykcyjnych, natomiast widma uzyskane za pomocą MALDI-TOF MS obejmują raczej białka rybosomalne i w dużej mierze białka konserwatywne, dlatego też sposób grupowania za pomocą tej ostatniej metody będzie raczej bardziej zgodny z wynikami typowania metodą MLST [22,24,26,34]. Ze względu jednak na wysoki potencjał dyskryminacyjny, wydaje się, że metoda MALDI-TOF MS może stanowić cenne uzupełnienie metod typowania i różnicowania opornych szczepów *Enterococcus*. Jednak, co ważniejsze, jest ona doskonałym i szybkim narzędziem do identyfikacji gatunkowej, której wysoka jakość i precyzja decyduje o prawidłowości dalszych analiz.

Podsumowanie

Reasumując prezentację i omówienie prowadzonych przeze mnie badań chciałabym wskazać na najważniejsze uzyskane osiągnięcia i wnioski.

- w oparciu o analizę restrykcyjną regionu 16S-23S rRNA ITS opracowałam i wystandaryzowałam szybką i powtarzalną metodę identyfikacji gatunkowej, pozwalającą na prawidłowe określenie przynależności badanych szczepów do 9 różnych gatunków *Enterococcus* najczęściej izolowanych od zwierząt. Metoda ta może być stosowana z powodzeniem we wszystkich analizach wymagających szybkiej i prostej identyfikacji gatunkowej izolatów *Enterococcus* (całość procedury zajmuje jedynie 4 godziny i wymaga znajomości podstawowych procedur badań molekularnych)
- przeprowadziłam analizę dystrybucji gatunków *Enterococcus* i określiłam procentowy udział szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* (dwóch najistotniejszych z epidemiologicznego punktu widzenia gatunków *Enterococcus*) w bioście

przewodu pokarmowego zwierząt hodowlanych, wolno żyjących oraz egzotycznych; w przypadku dwóch ostatnich grup zwierząt było to pierwsze tego typu doniesienie z Polski.

- przeprowadziłam analizę fenotypowego poziomu i zróżnicowania oporności szczepów *Enterococcus* na antybiotyki i chemioterapeutyki należące do siedmiu różnych klas substancji przeciwdrobnoustrojowych. Badania poziomu oporności szczepów *Enterococcus* izolowanych od zwierząt wolno żyjących i egzotycznych stanowią pierwszą tego typu analizę w Polsce, natomiast biorąc pod uwagę fakt, że Polska nie uczestniczy w programach monitoringu oporności *Enterococcus* u zwierząt, dane odnośnie szczepów izolowanych od zwierząt hodowlanych stanowią obszerne uzupełnienie fragmentarycznych doniesień dostępnych do tej pory.

- we wszystkich badanych grupach zwierząt wykazałam porównywalny zakres i stosunkowo wysoki poziom oporności na zbliżony panel substancji przeciwbakteryjnych, w tym również antybiotyków i chemioterapeutyków stosowanych wyłącznie w medycynie człowieka. Co więcej, wykazałam również znacząco wysoki odsetek szczepów klasyfikowanych jako wielolekooporne, również w puli szczepów izolowanych od zwierząt wolno żyjących; uzyskane przez mnie wyniki sugerują znaczący udział tej grupy zwierząt jako potencjalnego rezerwuaru oporności dla człowieka i zwierząt domowych, a także dają realną przesłankę do objęcia w przyszłości zwierząt wolno żyjących regularnym badaniem monitorującym poziom i zakres oporności

- wykazany w obecnych badaniach typ i zakres oporności fenotypowej szczepów został potwierdzony molekularnie (z wyjątkiem oporności będącej efektem mutacji w genie docelowym, tj. oporności na rifampicynę i fluorochinolony) obecnością przynajmniej jednego specyficznego genu determinującego określony typ oporności. Bez względu na gatunek zwierząt, wśród najczęściej wykrywanych genów, *gros* stanowiły molekularne determinanty obecne również u wysoce opornych szczepów izolowanych z przypadków infekcji szpitalnych zarówno w Polsce jak i na świecie, co wskazuje na istotny udział wszystkich badanych grup zwierząt w rozprzestrzenianiu się oporności, przede wszystkim na drodze horyzontalnej wymiany. Zjawisko to potwierdziła również obecność u znacznego odsetka badanych szczepów genów charakterystycznych dla specyficznych traspozonów

niosących zwykle kilka determinant oporności jednocześnie, co zwiększa prawdopodobieństwo regularnej i powiązanej wymiany genów między szczepami

- odzwierzęce szczepy *E. faecium* i *E. faecalis* cechował również bogaty i zróżnicowany panel genów wirulencji, szczególnie w przypadku ostatniego gatunku, co sugeruje potencjalnie wysoką patogenność tych szczepów i zdolność do wywoływania infekcji. Obecność genów ułatwiających proces koniugacji u większości badanych szczepów *E. faecalis* izolowanych u świń i drobiu wskazuje również na wysokie prawdopodobieństwo wymiany i transferu plazmidów niosących zarówno geny oporności jak i wirulencji

- po raz pierwszy wykazałam również wysoki stopień korelacji fenotypowych profili oporności badanych szczepów z ich genotypowymi profilami uzyskanymi metodą ADSRRS-fingerprinting co potwierdza przydatność wyżej wymienionej metody w epidemiologicznych, krótkoterminowych analizach porównawczych wielolekoopornych szczepów *Enterococcus*. Powtarzalność i wysoka precyzja metody pozwoliła również na analizę stopnia rozprzestrzeniania się poszczególnych klonów, w tym również wielolekoopornych, zarówno pomiędzy zwierzętami tego samego stada jak i pomiędzy odrębnymi stadami zwierząt

- wprowadzenie niestandardowej strategii polegającej na analizie więcej niż jednego reprezentanta *Enterococcus* od każdego badanego zwierzęcia umożliwiło uzyskanie bardzo precyzyjnych wyników, obejmujących zarówno gatunkową dystrybucję szczepów jak i analizę poziomu oporności. W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że poszczególne osobniki mogą być nosicielami kilku odrębnych klonów należących do tego samego gatunku *Enterococcus*, zróżnicowanych pod względem oporności, w tym również dwóch- lub trzech różnych klonów szczepów wielolekoopornych. Z tego względu wydaje się że w przypadku szczegółowych badań dotyczących analizy zakresu i poziomu oporności taka procedura powinna zostać rozważona.

- potwierdziłam również, że technika MALDI-TOF MS stanowi znakomite i wiarygodne narzędzie identyfikacji gatunkowej szczepów *Enterococcus*. Jako metoda typowania opornych szczepów *E. faecalis* w znacznie mniejszym stopniu koreluje natomiast z wynikami grupowania szczepów w oparciu o analizę oporności w porównaniu do metody ADSRRS-fingerprinting. Niemniej metoda ta cechuje się wysokim potencjałem dyskryminacyjnym i z tego względu może stanowić uzupełnienie innych metod typowania lekoopornych szczepów *Enterococcus*.

Piśmiennictwo:

1. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 2054-2059.
2. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; 37: 127-137
3. Brzówska A. *Malassezia pachydermatis*- próby określenia markerów patogenności szczepów. Praca magisterska. Lublin 2011.
4. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin Microbiol*. 1995; 33: 24-27
5. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*. 2016; 14: 4380, 207 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4380
6. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (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, 178 pp., doi:10.2903/j.efsa.2015.4036
7. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal*. 2014; 12: 3590, 336 pp., doi:10.2903/j.efsa.2014.3590
8. Gawryszewska I, Żabicka D, Bojarska K, Malinowska K, Hryniewicz W, Sadowy E. Invasive enterococcal infections in Poland: the current epidemiological situation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016; 35: 847-856.
9. Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJL. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front. Microbiol*. 2016; 7:788. doi: 10.3389/fmicb.2016.00788
10. Hammerum AM. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18: 619-625
11. Hidano A, Yamamoto T, Hayama Y, Muroga N, Kobayashi S, Nishida T, Tsutsui T. Unraveling antimicrobial resistance genes and phenotype patterns among *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken products in Japan. *PloSOne*. 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0121189
12. Hoang TTT, Soupir ML, Liu P, Bhandari A. Occurrence of tylosin-resistant enterococci in swine manure and tile drainage systems under no-till management. *Water Air Soil Pollut*. 2013; 224: 1754. doi:10.1007/s11270-013-1754-3
13. Hollenbeck BL, Rice BL. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 2012; 3: 421-433
14. Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26: 103-114. doi: 10.1128/CMR.00058-12.
15. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Ladely SR. Effects of tylosin use on erythromycin resistance in enterococci isolated from swine. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70: 4205-4210

16. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J. Clin Microbiol.* 2004; 42: 3558–3565
17. Josten M, Reif M, Szekat C, Al-Sabti N, Roemer T, Sparbier K. et al. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 1809-1817.
18. Krawczyk B, Kur J. Diagnostyka molekularna w mikrobiologii. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2008
19. Krawczyk, B., K. Lewandowski, M. Bronk, A. Samet, P. Myjak and J. Kur. 2003b. Evaluation of a novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Microbiol. Meth.* 52: 341-351.
20. Krutkiewicz, A. and D. Klimuszko. 2010. Genotyping and PCR detection of potential virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources in Poland. *Folia Microbiol.* 55: 167.
21. Kühn, I, A. Iversen, M. Finn, C. Greko, L. G. Burman, A. R. Blanch, X. Vilanova, A. Manero, H. Taylor, J. Caplin, L. Domínguez, I. A. Herrero, M. A. Moreno and R. Möllby. 2005. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans and the environment in different European regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5383–5390.
22. Lasch P, Fleige C, Stämmler M, Layer F, Nübel U, Witte W. et al. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbiol Methods.* 2014; 100: 58-69. doi: 10.1016/j.mimet.2014.02.015.
23. Maasjost, J, K. Mühlendorfer, S. Cortez de Jäckel and H. M. Hafez. 2015. Antimicrobial susceptibility patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from poultry flocks in Germany. *Avian Dis.* 59: 143-148.
24. Nagy E, Urbán E, Becker S, Kostrzewa M, Vörös A, Hunyadkúrti J. et al. MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe* 2013; 20: 20e26
25. Nakano S, Matsumura Y, Kato K, Yunoki T, Hotta G, Noguchi T. et al. Differentiation of vanA-positive *Enterococcus faecium* from vanA-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 44: 256-259. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.05.006.
26. Novais A, Sousa C, de Dios Caballero J, Fernandez-Olmos A, Lopes J, Ramos H. et al. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 1391-1399. doi: 10.1007/s10096-014-2071-5.
27. Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Zięba P, Gnat S, Wojtanowicz-Markiewicz K, Trościańczyk A. Coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from wildlife: identification, molecular characterization and evaluation of resistance profiles with focus on a methicillin-resistant strain. *Comp Immunol Microb.* 2016; 44: 21–28.
28. Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Zięba P, Gnat S, Trościańczyk A, Kostruba A, Waśko D, Wąsala Z, Glazer B, Majer-Dziedzic B. Free-living animals as a reservoir of drug-resistant and multidrug-resistant bacterial isolates: an analysis of phenotypic and genotypic resistance profiles of *Enterococcus* spp., *E. coli* and

coagulase-positive *Staphylococcus* species XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin, 22-24 września 2016 str. 595

29. Quintela-Baluja M, Bohme K, Fernandez-No IC, Morandi S, Alnakip ME, Caamano-Antelo S. et al. Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. Electrophoresis 2013; 34: 2240–2250

30. Różańska H, Lewtak-Piłat A, Osek J. Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from meat. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 2015; 59: 229-233.

31. Sapkota AR, Ojo KK, Roberts MC, Schwab KJ. Antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterococcus* spp. and *Streptococcus* spp. recovered from the indoor air of a large-scale swine-feeding operation. Lett Appl Microbiol. 2006; 43: 534-540

32. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev. 2004; 28: 519-42.

33. Seputiene V, Bogdaite A, Ruzauskas M, Suziedeliene E. Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals: pigs, cattle and poultry. Pol J Vet Sci. 2012; 15: 431-438.

34. Shin HB, Yoon J, Lee Y, Kim MS, Lee K. Comparison of MALDI-TOF MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. Yonsei Med J. 2015; 56 :550-555.

35. Sieńko A, Wieczorek P, Wieczorek A, Sacha P, Majewski P, Ojdana D, Michalska A. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance (HLAR) among *Enterococcus* species strains. Prog Health Sci. 2014; 4: 179-187.

36. Stępień-Pyśniak D, Marek A, Banach T, Adaszek Ł, Pyzik E, Wilczyński J, Winiarczyk S. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* strains isolated from poultry. Acta Vet Hung. 2016; 64: 148–163.

37. Tyrrell GJ, Bethune RN, Willey B, Low DE. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1054–1060.

38. Werner G. Molecular typing of enterococci/VRE. J. Bacteriol. Parasitol. 2013; 5 <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.S5-001>

39. Werner G, Coque TM, Franz CM, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, van Schaik W, Weaver K. Antibiotic resistant enterococci-tales of a drug resistance gene trafficker. Int J Med Microbiol. 2013; 303: 360- 379.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

A) Aktywność naukowa

Mój dorobek naukowy nie wchodzący w skład głównego osiągnięcia naukowego obejmuje 32 publikacje, w tym 14 oryginalnych prac znajdujących się w bazie JCR. Jestem również współautorką 14 doniesień zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych. Główne kierunki badań realizowanych przeze mnie w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej, obejmują zagadnienia związane przede wszystkim z identyfikacją drobnoustrojów bakteryjnych i grzybiczych, problematyką infekcji oportunistycznych oraz szeroko pojętą analizą zjawiska oporności drobnoustrojów odzwierzęcych. Jednym z ważniejszych zagadnień realizowanym przeze mnie w ciągu ostatnich czterech lat, były badania mające

na celu określenie udziału zróżnicowanych populacji zwierząt wolno żyjących i egzotycznych jako wektorów drobnoustrojów stanowiących potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Szczegółowa tematyka zagadnień przedstawiona zgodnie z chronologicznym porządkiem rozpoczęcia ich realizacji:

1. Grzyby z rodzaju *Malassezia* jako przyczyna infekcji oportunistycznych:
 - a. analiza problemów diagnostycznych oraz opracowanie metod identyfikacji gatunkowej
 - b. *Malassezia pachydermatis* jako komensal i patogen – analiza potencjalnych markerów patogenności
 2. Alternatywne metody terapii: analiza aktywności przeciwdrobnoustrojowej antywitamin, antymetabolitów i ekstraktów roślinnych w stosunku do wybranych gatunków grzybów drożdżopodobnych i bakterii
 3. Zjawisko oporności drobnoustrojów:
 - a. aktualne problemy związane z określaniem wrażliwości grzybów pleśniowych na preparaty przeciwgrzybicze
 - b. analiza oporności fenotypowej i genotypowej bakterii z rodzaju *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp. , *E. coli*, *Aeromonas* spp. ze szczególnym uwzględnieniem szczepów izolowanych od zwierząt wolno żyjących
 4. Zwierzęta wolno żyjące i egzotyczne jako potencjalny rezerwuár drobnoustrojów stanowiących zagrożenie zdrowia publicznego
 5. Dermatofity: diagnostyka i problematyka związana z identyfikacją gatunkową w aspekcie fenotypu i genomu.
- 1)** Infekcje oportunistyczne wywoływane przez grzyby z rodzaju *Malassezia* stanowią wciąż aktualny problem zdrowotny i terapeutyczny. Moje zainteresowania badawcze tą grupą drobnoustrojów związane były z wysokim odsetkiem izolacji szczepów *Malassezia* z przypadków klinicznych zapalenia zewnętrznego kanału słuchowego i skóry u psów opisywanym w literaturze światowej. Ze względu na fakt, że schorzenia te stanowią znaczny odsetek chorób dermatologicznych u zwierząt towarzyszących istniała potrzeba poszerzenia wiedzy z zakresu charakterystyki zarazka oraz analizy czynników potencjalnie predysponujących do zmiany statusu klinicznego drobnoustroju i jego konwersji w formę patogenną. Analiza występowania grzybów z rodzaju *Malassezia* w zewnętrznym kanale słuchowym u psów stanowiła pierwszy etap badania, pozwalający na ocenę skali problemu u zwierząt pochodzących z

regionu południowo-wschodniej Polski. Efekty mojej pracy zostały przedstawione w formie następującej publikacji:

- Ziółkowska G., **Nowakiewicz A.** : Występowanie grzybów z rodzaju *Malassezia* w zewnętrznym kanale słuchowym u psów. Medycyna Weterynaryjna, 60, 310-313, 2004.

Uzyskany w prezentowanej pracy wysoki odsetek izolatów pochodzący zarówno od zwierząt z objawami *otitis externa* jak i zdrowych klinicznie (odpowiednio 36,7% i 81,7%) ukierunkował moje badania na próbę określenia czynników determinujących konwersję formy komensalicznej drobnoustroju do formy odpowiedzialnej za objawy *otitis externa*. Podjęte przeze mnie w ówczesnym czasie badania obejmowały pierwsze tego typu analizy przeprowadzone w Polsce. Charakterystyka izolatów *Malassezia pachydermatis* w aspekcie patogenności stała się również tematem mojej pracy doktorskiej pt. „Współczesne metody różnicowania diagnostycznego szczepów z rodzaju *Malassezia* izolowanych z przypadków klinicznych” prowadzonej pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Ziółkowskiej w latach 2001-2005. Celem pracy było przeprowadzenie fenotypowej charakterystyki szczepów *M. pachydermatis* ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych cech odpowiedzialnych za wirulencję. Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej objęły analizę porównawczą morfologii, właściwości biochemicznych, ekspresji zewnątrzkomórkowych hydrolaz oraz analizę profili proteomicznych szczepów metodą SDS-PAGE. Analiza uwzględniająca morfologię i właściwości biochemiczne wykazała zróżnicowanie badanych szczepów i pozwoliła na wygenerowanie 6 różnych biotypów, które korelowały ze źródłem pochodzenia szczepu (zwierzęta zdrowe klinicznie i z objawami *otitis externa*). Co więcej szczepy wyizolowane z przypadków chorobowych cechowała ogólna wyższa aktywność fosfataz i enzymów lipolitycznych (głównie fosfolipazy), które biorąc udział w degradacji powierzchniowych lipidów skóry ułatwiają min. proces adherencji drożdżaków do komórek gospodarza. Różnicowanie szczepów komensalicznych i patogennych przeprowadziłam również w oparciu o analizę profili białkowych. Nasz zespół badawczy jako jeden z pierwszych w ówczesnym czasie przeprowadził standaryzację warunków uzyskiwania profili białkowych izolatów *M. pachydermatis*, metodą SDS-PAGE, dobierając wiek hodowli oraz warunki inkubacji drobnoustrojów. Przeprowadzone badania wykazały, że szczepy izolowane z przypadków klinicznych cechowały się znacznie bogatszym i silniej wyrażonym profilem proteomicznym, cechowała je również w większości przypadków obecność białek o specyficznej masie, które nie występowały w

przypadku izolatów komensalicznych. Analiza statystyczna elektroforegramów dodatkowo potwierdziła zaobserwowane różnice i pozwoliła na wygenerowanie dendrogramu grupującego badane szczepy do dwu odrębnych klasterów. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w formie następujących prac:

- Ziółkowska G., **Nowakiewicz A.**: Protein profiles of antigenic preparations obtained from *Malassezia pachydermatis* strains freshly isolated from dogs. Central European J. Immun., 27, suppl. I, 148, 2002.
- Ziółkowska G., **Nowakiewicz A.**, Puchalski A.: Profile białkowe preparatów antygenowych uzyskiwanych ze szczepów *Malassezia pachydermatis*. Medycyna Weterynaryjna 60, 1118-1123, 2004.
- **Nowakiewicz A.**, Ziółkowska G.: Fenotypowy profil patogenności szczepów *Malassezia pachydermatis* Medycyna Weterynaryjna 2007, 63,6, 721-726
- **Nowakiewicz A.**, Ziółkowska G.: Fenotypowa charakterystyka szczepów *Malassezia pachydermatis* Medycyna Weterynaryjna 2007, 63,4, 448-454
- Ziółkowska G., **Nowakiewicz A.**: Profile białkowe antygenów powierzchniowych *Malassezia pachydermatis* Mikologia Lekarska 2007, 14,4, 221-226
- **Nowakiewicz A.**, Ziółkowska G.: Comparative analysis of protein profiles of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa . Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy ,2013, 57, 41–46

oraz publikacjach konferencyjnych: zał. nr 3, pkt. B.1, 3 i 5

W trakcie realizacji badań wykazałam, że gatunkiem dominującym w etiologii grzybiczych schorzeń skóry i zewnętrznego przewodu słuchowego u psów jest *M. pachydermatis*, niemniej nie jest to jedyny gatunek *Malassezia* izolowany od zwierząt towarzyszących, co zostało potwierdzone w trakcie badań przesiewowych puli zwierząt towarzyszących (psy i koty). Wykazałam, że udział lipidozależnych gatunków w procesie zapalnym zewnętrznego kanału słuchowego psów wynosił odpowiednio 2,6% i 28%. Ponadto po raz pierwszy wykazałam szczepy lipidozależne, należące do gatunku *M. pachydermatis* wśród odzwierzęcych izolatów. Uzyskane w badaniach wyniki sugerują wprowadzenie podłóż z suplementacją lipidów do rutynowej diagnostyki schorzeń na tle *Malassezia*. Wyniki badań zostały opublikowane w następującej pracy:

- Ziółkowska G., **Nowakiewicz A.**: Izolacja lipidozależnych szczepów *Malassezia* od psów i kotów. Medycyna Weterynaryjna 2006, 62, 913-916

Analiza dużej puli zróżnicowanych izolatów *Malassezia* wymagała również zastosowania techniki umożliwiającej precyzyjną identyfikację gatunkową zarazka. Identyfikacja gatunkowa szczepów z rodzaju *Malassezia* wciąż narażona jest na wiele trudności ze względu na wysoki stopień podobieństwa

fenotypowego szczepów lipidozależnych, a badania w zakresie identyfikacji molekularnej prowadzone w ówczesnym czasie były bardzo unikatowe. Aby uzyskać wiarygodny wynik identyfikacji niezbędne było zastosowanie zróżnicowanej metodyki obejmującej zarówno cechy fenotypowe jak i analizę genomowego DNA drobnoustroju. Ze względu na złożoną budowę ściany komórkowej dodatkowe wyzwanie stanowi również dobór odpowiedniej metody pozwalającej na uzyskanie materiału genetycznego do analiz molekularnych. Adaptacja oraz standaryzacja techniki umożliwiającej łatwą i powtarzalną identyfikację gatunkową stanowiła również część tematyki badawczej opracowywanej w trakcie pracy doktorskiej. Badania dotyczące molekularnej identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Malassezia* zostały zrealizowane w ramach grantu promotorskiego pt. „*Malassezia species*, jako potencjalne zagrożenie chorobami odzwierzęcymi, w świetle współczesnych metod diagnostycznych” kierowanego przez prof. dr hab. Grażynę Ziółkowską. W swoich badaniach przeanalizowałam i porównałam cztery niezależne metody uzyskiwania genomowego DNA z komórek *Malassezia* (metodą enzymatyczną, termiczną, chemiczną i mechaniczną). W trakcie prowadzonych badań potwierdziłam przydatność metody mechanicznej do uzyskiwania wysokojakościowego, stężonego DNA, wykorzystywanego zarówno do prostych analiz molekularnych jak i w metodach genotypowania wymagających minimum 200 ng czystego materiału genetycznego. Zaprojektowany przeze mnie w dalszych badaniach model molekularnej identyfikacji gatunkowej szczepów *Malassezia* został z powodzeniem zastosowany w badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w następującej pracy:

- **Nowakiewicz A.**, Ziółkowska G.: Wewnątrzgatunkowe różnicowanie szczepów *Malassezia pachydermatis* z wykorzystaniem PCR-REA. Medycyna Weterynaryjna. 2008,64(6), 822-827

oraz w publikacji konferencyjnej: zał.nr3, pkt. B.2

Metodyka identyfikacji gatunkowej opracowana w trakcie pracy doktorskiej została również wykorzystana w kolejnych badaniach z zakresu diagnostyki *Malassezia* u innych gatunków zwierząt i analizy potencjalnych markerów wirulencji szczepów *M. pachydermatis* izolowanych od psów. Efektem badań były dwie prace oryginalne oraz praca magisterska zrealizowana pod moim kierunkiem pt. „*Malassezia pachydermatis*- próby określenia markerów patogenności szczepów”(zał. nr 4, pkt. J.1). W pracy tej po raz pierwszy zastosowałam metodę ADSRRS-fingerpinting do różnicowania komesalicznych i patogennych szczepów *M. pachydermatis*, pozwalającą na wyraźne

zgrupowanie szczepów do dwu odrębnych klasterów w zależności od źródła pochodzenia.

- Ziółkowska G., Budziwojska M., **Nowakiewicz A.**, Zięba P.: Mikrobiota grzybicza powłok zewnętrznych zwierząt wolno żyjących. Medycyna Weterynaryjna. 2009, 65 (10), 715-718.

- Czyżewska, U; Siemieniuk, M; Pyrkowska, A; **Nowakiewicz, A**; Biegańska, M; Dąbrowska, I; Bartoszewicz, M; Dobrzym, P; Tylicki, A.: Comparison of lipid profiles of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with otitis externa and without clinical symptoms of disease. Mycoses 2016 59, 20–279

oraz w publikacjach konferencyjnych: zał. nr 3, pkt. B.4 i 9

2) Problematyka infekcji bakteryjnych i grzybiczych związana jest nie tylko z prawidłowym rozpoznaniem i identyfikacją potencjalnych czynników odpowiedzialnych za patogenezę infekcji ale również z właściwym i skutecznym postępowaniem terapeutycznym. Dlatego też naturalną konsekwencją moich badań była analiza możliwości terapeutycznych w stosunku do grzybów drożdżopodobnych wywołujących infekcje oportunistyczne u ludzi i zwierząt. Wraz z zespołem badawczym pod kierunkiem dr hab. Adama Tylickiego z Uniwersytetu w Białymstoku współuczestniczyłam w badaniach mających na celu analizę wybranych elementów metabolizmu komórkowego *Candida albicans*, *M. pachydermatis* i *S. cerevisiae* odpowiedzialnych między innymi za biochemiczną adaptację tych grzybów do bytowania i wywoływania infekcji w organizmie gospodarza. Mając na uwadze fakt, że różnice metaboliczne w aktywności dwóch najistotniejszych metabolitów, tj. dehydrogenazy jabłczanu (MDH) i dekarboksylazy pirogronianowej (PDC) u badanych gatunków drobnoustrojów stanowią kluczowy element determinujący zdolność interferowania grzybów z komórkami gospodarza, analizowano wpływ oksytiaminy na metabolizm tych związków. Wykazano, że stanowi ona aktywny inhibitor szlaków metabolicznych zarówno fermentatywnych jak i oksydacyjnych u grzybów należących do gatunku *M. pachydermatis*, dzięki czemu skutecznie hamuje ich wzrost *in vitro* i pośrednio ogranicza zdolność do wywoływania infekcji oportunistycznych.

Kolejnym projektem, w którym brałam udział była analiza aktywności przeciwgrzybiczej syntetyzowanych *de novo* heterocyklicznych pochodnych oksymu. Prace prowadzone pod kierunkiem dr Tomasza Kosmalskiego z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy obejmowały ewaluację aktywności przeciwgrzybiczej *in vitro*, ośmiu różnych związków w stosunku do *M. pachydermatis* i *C. albicans*. Przeprowadzone badania wykazały aktywność inhibicyjną wyselekcjonowanych związków w stosunku do analizowanych

szczepów, niemniej ze względu na wysokie stężenia konieczne do zahamowania wzrostu, badania te wymagają kontynuacji

Efektom przeprowadzonych dotychczas analiz były następujące prace:

- Tylicki A., Ziolkowska G., Bolkun A., Siemieniuk M., Czerniecki J., **Nowakiewicz A.**: Comparative study of the activity and kinetic properties of malate dehydrogenase and pyruvate decarboxylase from *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Canadian Journal of Microbiology 2008,54(9), 734-741
- Kosmański, T; Kutkowska, J; Gzella, A, K; **Nowakiewicz, A.** : New heterocyclic oxime-ethers of 1-(benzofuran-2-yl)ethan 1-one and their antimicrobial activity. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research 2015, 72(2): 289-295

oraz doniesienie zjazdowe z konferencji międzynarodowej, opublikowane w czasopiśmie z listy JCR (zał. nr 3, pkt.A.2.1)

W ostatnim czasie zostały również podjęte badania pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Majer Dziedzic, mające na celu określenie aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów roślinnych. Wyniki przeprowadzonych wstępnie analiz dla dziewięciu ekstraktów roślinnych wykazały obiecujące rezultaty w stosunku do kilku istotnych klinicznie gatunków bakterii, tj. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*. Wyniki zostały przedstawione w publikacji konferencyjnej (zał. nr 4, pkt B.15)

3) Szeroko pojęta analiza mechanizmów determinujących oporność drobnoustrojów stanowi jeden z głównych tematów badawczych realizowanych w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej. Od kilku lat jestem aktywnym uczestnikiem i wykonawcą projektów realizowanych w ramach tego tematu nie tylko ze względu na tematykę publikacji wchodzących w skład osiągnięcia, ale również biorę czynny udział w opracowywaniu i standaryzacji metodyki oznaczeń wrażliwości *in vitro* innych grup drobnoustrojów, min. *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Salmonella* oraz grzybów pleśniowych, grzybów drożdżopodobnych i dermatofitów.

a. Pomimo istniejących procedur opracowanych przez CLSI dla metody mikrorozcieńczeń i metody dyfuzyjno-krażkowej nadal potrzebna jest dalsza standaryzacja warunków wykonania metody i interpretacji wyników, przede wszystkim w odniesieniu do komercyjnych zestawów (E-testy) najczęściej wykorzystywanych w standardowej diagnostyce grzybów. Duży problem stanowią również nie do końca określone wartości definiujące oporność poszczególnych gatunków grzybów pleśniowych oraz konieczność oznaczania tych wartości dla pojawiających się na rynku weterynaryjnym nowych substancji o działaniu przeciwgrzybiczym. W przypadku grzybów pleśniowych jednym z elementów decydujących o poprawności przeprowadzonych oznaczeń

i interpretacji wyników jest właściwa standaryzacja inokulum grzyba. W trakcie przeprowadzonych analiz określono odpowiedni czas wzrostu i rodzaj hodowli, metodę zbierania materiału oraz właściwą gęstość zarodników. Ze względu na duże znaczenie kliniczne grzybów z rodzaju *Aspergillus* spp., szczególnie izolowanych z przypadków aspergilozy u drobiu oraz brak danych dotyczących oporności odzwierzęcych izolatów grzybów pleśniowych z obszaru naszego kraju, podjęto badania mające na celu określenie zakresu i poziomu oporności szczepów w puli zwierząt hodowlanych oraz porównanie i wyselekcjonowanie najbardziej wiarygodnej metody oznaczania oporności *A. fumigatus* i *A. niger*. Wykazano statystycznie wyższy poziom oporności u szczepów izolowanych z przypadków klinicznych aniżeli szczepów tego samego gatunku pochodzących ze środowiska. Ponadto w przypadku szczepów *A. fumigatus* zanotowano wysoki poziom oporności na amfoterycynę B, stosowaną generalnie w medycynie człowieka, co sugeruje, że odzwierzęce szczepy mogą stanowić potencjalny rezerwuuar amfoterycynoopornych szczepów dla człowieka. Należy również podkreślić, że badania dotyczące oporności grzybów należących do gatunku *A. niger* były pierwszym tego typu opracowaniem w Polsce. Wyniki badań zostały opublikowane w następujących pracach:

- Ziółkowska G., Tokarzewski S., **Nowakiewicz A.**: Leki przeciwgrzybiczne i ich zastosowanie w terapii infekcji grzybiczych u ptaków. Magazyn Weterynaryjny suplement Choroby Ptaków, 2010, 457-462
- Tokarzewski S., Ziółkowska G., **Nowakiewicz A.** Susceptibility testing *Aspergillus niger* strains isolated from poultry to antifungal drugs- a comparative study of the disk diffusion, broth microdilution (M38-A) and E-test methods. Polish Journal of Veterinary Sciences 2012 , 15.1, 125-133
- Ziółkowska G., Tokarzewski S., **Nowakiewicz A.** Grzyby z rodzaju *Aspergillus*- różnicowanie gatunkowe a wrażliwość na preparaty antygrzybicze. Mikologia Lekarska. 2010, 17(2), 97-102.
- Ziółkowska G., Tokarzewski S., **Nowakiewicz A.**: Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland. Poultry Science, 2014, 93(5), 1106-1112.

b. Problematyka oporności klinicznej szczepów bakteryjnych izolowanych od zwierząt obejmuje niezwykle szeroką tematykę badawczą. Ze względu na duże prawdopodobieństwo bezpośredniego kontaktu i przenoszenia opornych szczepów pomiędzy zwierzętami hodowlanymi a człowiekiem, stały się one najlepiej przebadanym w Europie i w Polsce rezerwuarem oporności zarówno pod względem drobnoustrojów wskaźnikowych jak i zoonotycznych. Wyjątek stanowią dane dotyczące oporności szczepów należących do rodzaju *Enterococcus*. Dlatego też analiza zakresu i poziomu oporności oraz

mechanizmów determinujących to zjawisko wśród odzwierzęcych szczepów *Enterococcus* (głównie *E. faecium* i *E. faecalis*) stała się przedmiotem badań, których wyniki zostały opublikowane w pracach stanowiących osiągnięcie naukowe (zał. nr 2, pkt B.1,3,4,5).

Zagadnienie związane z występowaniem zjawiska oporności szczepów izolowanych od zwierząt wolno żyjących jest stosunkowo mało poznany problem; jak dotąd notowane są jedynie pojedyncze doniesienia z Polski dotyczące izolacji opornych szczepów *Salmonella* i *E. coli* opornych na cefalosporyny.

Z tego względu, analizując próbki uzyskane od zwierząt wolno żyjących w kierunku opornych szczepów *Enterococcus*, poszerzyłam strategię badawczą o izolaty należące do koagulazo dodatnich gatunków *Staphylococcus* oraz bakterie z gatunku *E. coli*. Badania dotyczące szczepów z rodzaju *Staphylococcus* miały na celu przede wszystkim wyodrębnić metycylinoopornych szczepów *S. aureus* i *S. pseudintermedius* (MRSA i MRSP) jako potencjalnie najbardziej niebezpiecznych oraz określenie ogólnego poziomu oporności wśród koagulazo dodatnich szczepów *Staphylococcus* obejmujących przede wszystkim *S. aureus* oraz izolaty należące do SIG (ang. *Staphylococcus intermedius* group). Drugi kierunek badań obejmował izolację i identyfikację opornych na cefalosporyny szczepów *E. coli* i *Klebsiella spp.* (ESBL i AmpC) jako gatunków cechujących się plazmidowym transferem oporności.

Wytypowane przeze mnie izolaty o specyficznych typach oporności stanowią obecnie jedno z ważniejszych przyczyn niepowodzeń terapeutycznych w medycynie człowieka ze względu na fakt, że metycylinooporne szczepy *S. aureus* lub *S. pseudintermedius* posiadają gen *mec*, kodujący zmienione białko wiążące penicyliny, które ma niskie powinowactwo do antybiotyków beta laktamowych, ponadto szczepy MRSA/MRSP cechuje również zwykłe wielolekooporność. Plazmidowa oporność na cefalosporyny III i IV generacji wśród szczepów *E. coli* to również narastający problem ponieważ beta laktamy są jedną z najczęściej stosowanych grup leków zarówno w medycynie jak i weterynarii.

Celem podjętych badań było określenie znaczenia epidemiologicznego innych potencjalnych rezerwuarów oporności, jakimi mogą być populacje zwierząt wolno żyjących. Wyniki badań potwierdziły wstępne przypuszczenia dotyczące nosicielstwa szczepów o fenotypie MRSA oraz ESBL u lisów i kun oraz stosunkowo wysoki odsetek (10%) wielolekoopornych szczepów *E. coli* (przede wszystkim na tetracyklinę, chloramfenikol i kanamycynę) i znacznie

niższy (3%) koagulazododatnich gatunków *Staphylococcus*, głównie *S. aureus* i *S. pseudintermedius*. Ze względu na stały dostęp do prób pochodzących od zwierząt wolno żyjących (współpraca z Zakładami Higieny Weterynaryjnej) oraz znaczenie uzyskanych wyników badań wstępnych, prace w tym zakresie są nadal kontynuowane i poszerzane o wykrywanie kolejnych istotnych klinicznie fenotypów oporności. Obecnie przygotowywana jest praca dotycząca analizy porównawczej poziomu oporności na tetracykliny drobnoustrojów wskaźnikowych izolowanych od lisów i obecności tetracykliny w szlifach kostnych, będącej wskaźnikiem skuteczności szczepień przeciwko wściekliznie (szczepionka zawiera tetracyklinę jako marker). Dotychczas uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy nr 1 wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego oraz w następującej publikacji:

- **Nowakiewicz A**, Ziółkowska G, Zięba P, Gnat S, Wojtanowicz-Markiewicz K, Trościańczyk A: Coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from wildlife: Identification, molecular characterization and evaluation of resistance profiles with focus on a methicillin-resistant strain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 44, 21–28 (2016)

Część wyników została również przedstawiona w formie publikacji konferencyjnych (zał. nr 4, pkt. B.10 i 12)

4) Zwierzęta wolno żyjące, a szczególnie gatunki drapieżne, stanowią istotne ogniwo łańcucha epidemiologicznego większości zoonoz, głównie jako rezerwuuar czynników patogennych dla człowieka i zwierząt domowych.

W Polsce kompleksowe badania dotyczące tego zagadnienia zostały przeprowadzone jedynie fragmentaryczne i jedynym usankcjonowanym prawnie badaniem monitoringowym jest wykrywanie wirusa wścieklizny.

Problematyka prowadzonych badań objęła kilka odrębnych rezerwuuarów nosicieli, dla których określono wstępnie grupę badanych drobnoustrojów stanowiących potencjalne zagrożenie zoonotyczne. Największą badaną grupę stanowiły mięsożerne zwierzęta wolno żyjące obejmujące najliczniej występujące w Polsce gatunki (lis rudy, kuna leśna i kuna domowa oraz szop praczy), cechujące się jednocześnie wysokim potencjałem migracyjnym (aktywne rozprzestrzenianie drobnoustrojów). Grupa ta została kompleksowo przeanalizowana w kierunku nosicielstwa bakterii z rodzaju *Salmonella* spp, *Yersinia* spp, *Listeria* spp i koagulazo dodatnich gatunków *Staphylococcus* ze szczególnym uwzględnieniem czynników wirulencji determinujących patogenność poszczególnych szczepów. Drugą grupę badaną ograniczoną do jednego gatunku stanowiły dzikie przeżuwacze (jelenń szlachetny), które zostały

ocenione w aspekcie nosicielstwa przede wszystkim enterokrwotocznych i enteropatogennych patotypów *E. coli* oraz drobnoustrojów należących do rodzaju *Yersinia* spp. i *Listeria* spp. Kolejną specyficzną grupę badanych zwierząt stanowiły dwa gatunki żółwi (żółw stepowy – gatunek egzotyczny, powszechny w hodowli terrariowej i żółw błotny – jedyny gatunek żółwi naturalnie występujący w Polsce) analizowane przede wszystkim w aspekcie nosicielstwa pałeczek *Salmonella* będących przyczyną jednej z ważniejszych zoonoz w Polsce. Podobnie jak w innych krajach również w Polsce, badane zwierzęta bez względu na gatunek okazały się nosicielami potencjalnie patogennych bakterii. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoki udział gadów w nosicielstwie pałeczek *Salmonella* (18,8%- 11,7% w zależności od gatunku) ale wykazano również że mięsożerne zwierzęta wolno żyjące stanowią równie istotny rezerwuuar, będąc od 2,8% do 9,2% nosicielami *Salmonella* w zależności od gatunku. We wszystkich badanych grupach zwierząt wykazano również obecność *Listeria* spp., w tym *L. monocytogenes*, którą wyizolowano od 4,5% - 6,6% badanych zwierząt; w podobnej ilości izolowano również bakterie z gatunku *Yersinia enterocolitica*, która stanowi przyczynę 96% przypadków jersiniozy u ludzi. Jednakże najliczniejszą grupę drobnoustrojów mogących stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego stanowiły drobnoustroje z gatunku *S. aureus*, które miały najwyższy, 12% udział w biocie przewodu pokarmowego zwierząt mięsożernych i co najważniejsze cechował je bardzo zróżnicowany i bogaty panel czynników wirulencji, w tym genów kodujących enterotoksyny i toksynę szoku toksycznego. Co ważne, w przypadku wszystkich grup zwierząt materiał badawczy stanowiły wymazy z prostnicy, lub kloaki oraz próbki kału. Wykazane w nich drobnoustroje patogenne zasiedlając końcowy odcinek przewodu pokarmowego mogą zostać łatwo wprowadzone do środowiska wraz z wydalaniem kałem, a stąd przeniesione na człowieka i inne gatunki zwierząt.

Uwzględniając bogatą i zróżnicowaną pulę czynników wirulencji wykazaną w trakcie przeprowadzonych badań oraz łatwość kontaminacji środowiska, wydaje się że potencjał zoonotyczny drobnoustrojów izolowanych od zwierząt wolno żyjących i egzotycznych jest stosunkowo wysoki, a zaobserwowane zjawisko potwierdza celowość prowadzonych badań.

Ze względu na znaczenie zoonotyczne wyizolowanych gatunków drobnoustrojów, badania w tym zakresie są nadal kontynuowane i poszerzane o kolejne gatunki i grupy badanych zwierząt. Efektem dotychczas przeprowadzonej analizy są następujące publikacje naukowe:

- **Nowakiewicz A.**, Ziółkowska G., Zięba P., Stępniewska K., Tokarzewski S. Russian tortoises (*Agriemys horsfieldi*) as potential reservoir for *Salmonella* spp. Research in Veterinary Science 2012, 92, 187-190
- **Nowakiewicz A.**, Ziółkowska G., Zięba P., Majer Dziedzic B., Gnat S., Wójcik M., Dziedzic R., Kostruba A.: Aerobic Bacterial microbiota isolated from the cloaca of the European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) in Poland. Journal of Wildlife Diseases. 2015 51(1):255-259 .doi: 10.7589/2013-07-157.
- Gnat, S; Trościańczyk, A; **Nowakiewicz, A**; Majer-Dziedzic, B; Ziółkowska, G; Dziedzic, R; Zięba, P; Teodorowski, O. Experimental studies of microbial populations and incidence of zoonotic pathogens in the faeces in red deer (*Cervus elaphus*). Letters in Applied Microbiology 2015 61: 446-452
- **Nowakiewicz A.**, Zięba P., Ziółkowska G., Gnat S., Muszyńska M., Tomczuk K., Majer Dziedzic B., Ulbrych Ł., Trościańczyk A.: Free-living species of carnivorous mammals in Poland: red fox, beech marten, and raccoon as a potential reservoir of *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* spp. and coagulase-positive *Staphylococcus*. PLoSOne, DOI:10.1371/journal.pone.0155533

oraz doniesienia zjazdowe z konferencji (zał. nr 4, pkt B.8, 10, 12)

Efektom badań była również praca magisterska pt. “Fenotypowa i genotypowa charakterystyka bakterii z rodzaju *Staphylococcus* izolowanych od zwierząt wolno żyjących” realizowana pod moim kierunkiem

5) Zagadnienie dotyczące diagnostyki i patogenezы dermatofitoz u zwierząt jest jednym z wieloletnich tematów badawczych realizowanych w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej. Główna problematyka tego zagadnienia dotyczy heterogennej grupy grzybów *Trichophyton mentagrophytes* (ang. *Trichophyton mentagrophytes* complex), które stanowią drugi po *T. rubrum* complex czynnik etiologiczny dermatofitoz u ludzi i zwierząt. Ze względu na duże zróżnicowanie w obrębie taksonu, prawidłowa diagnostyka i identyfikacja drobnoustroju wciąż nastręcza wiele trudności. Techniki badawcze bazujące do tej pory na właściwościach morfologicznych i fizjologicznych badanych szczepów okazały się niewystarczające do prawidłowej identyfikacji i różnicowania, dlatego też badania naszego zespołu skoncentrowały się na opracowaniu testów molekularnych umożliwiających typowanie szczepów. Przeanalizowaliśmy kilkadziesiąt szczepów pochodzących zarówno od człowieka jak i różnych gatunków zwierząt. W naszych badaniach skonfrontowaliśmy metody fenotypowe i molekularne (ITS-RFLP) z metodą uznawaną za “złoty standard” w identyfikacji dermatofitów (analiza sekwencji ITS). Uzyskane wyniki pozwoliły na wykazanie 6 różnych genotypów korespondujących z odpowiednimi taksonami wchodzącymi w skład *Trichophyton mentagrophytes* complex. Ze względu na potwierdzoną przydatność zastosowanej techniki molekularnej, badania w zakresie typowania są obecnie kontynuowane na

szerszej puli gatunkowej dermatofitów, obejmującej również *Trichophyton verrucosum* i *Microsporum canis* jako gatunki mające główny udział w dermatofitozach bydła i zwierząt towarzyszących.

Efektem dotychczas przeprowadzonej analizy jest następująca publikacja:

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

oraz doniesienie zjazdowe z konferencji (zał. nr 4, pkt B6 i 7)

Efektem badań była również praca magisterska pt. „Fenotypowe i genotypowe różnicowanie szczepów *Trichophyton mentagrophytes*.” realizowana pod moim kierunkiem

B) Działalność dydaktyczna

Począwszy od 2002 roku do chwili obecnej prowadzę zajęcia dydaktyczne z przedmiotu Mikrobiologia weterynaryjna dla studentów II i III roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

W latach 2006-2008 prowadziłam również zajęcia z przedmiotu Mikrobiologia dla studentów Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, kierunek Biologia

W latach 2006-2010 realizowałam zajęcia dla słuchaczy podyplomowego studium „Analityka laboratoryjna w ochronie środowiska” z następujących przedmiotów:

- w latach 2006-2010: Mikologia
- w latach 2007-2008: Zatrucia i zakażenia pokarmowe pochodzenia bakteryjnego

Wielokrotnie byłam współautorem lub kierownikiem projektów prezentowanych w trakcie Lubelskiego Festiwalu Nauki (zał. 4I)

Jestem promotorem 4 prac dyplomowych, w tym trzech magisterskich i jednej inżynierskiej (zał. 4J) studentów wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii i Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt UP w Lublinie

Sprawuję również opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego dwóch doktorantów realizujących prace badawcze w Instytucie Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie (zał. 4K)

Brałam aktywny udział w wykładach specjalistycznych i warsztatach szkoleniowych z zakresu wdrażania nowych środków dydaktycznych – e-learning „Novice Summerschool 2011” (zał. 4L)

D) Inna działalność

Od początku mojej pracy w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej biorę aktywny udział w pracach badawczych oraz diagnostyce i analizie drobnoustrojów izolowanych od zwierząt domowych. Stale uzupełniam swoją wiedzę zakresu aktualnych problemów diagnostycznych dotyczących patologii i terapii zwierząt, biorąc aktywny udział w diagnozowaniu i analizie rzadkich przypadków klinicznych, czego efektem są liczne prace kazuistyczne (zał. nr 3, pkt. 3.4.5.6.13.14). Dzięki nawiązanej współpracy z Zakładami Higieny Weterynaryjnej w Lublinie, Krośnie i Białymstoku, oraz aktywnej kooperacji z Poleskim Parkiem Narodowym oraz Parkiem Narodowym „Ujście Warty”, mam również sposobność pracy z materiałem pochodzącym od zwierząt wolno żyjących, w aspekcie patogenów stanowiących nie tylko potencjalne zagrożenie zdrowia publicznego ale również drobnoustrojów stanowiących potencjalne zagrożenie dla samych populacji zwierząt wolno żyjących. Ponadto badając poziom lekowrażliwości izolatów pochodzących ze środowisk słabo zantropogenizowanych analizuję dane nie tylko w aspekcie zagrożenia jakie stanowią zwierzęta wolno żyjące jako rezerwuuar oporności dla człowieka i zwierząt domowych ale również uzyskane informacje mogą być wykorzystane jako wskazówka do tworzenia ewentualnych procedur terapeutycznych stosowanych w populacjach dzikich zwierząt.

Oprócz analizy mikrobiologicznej materiału odzwierzęcego prowadzę również aktywną współpracę z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie, min. realizując zagadnienia projektu z zakresu oceny czystości mikrobiologicznej narzędzi stomatologicznych w zależności od procedury sterylizacji oraz projektu mającego na celu analizę zróżnicowania mikrobioty przewodu pokarmowego pacjentów cierpiących na anoreksję

Działalność organizacyjna na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie:

- Członek Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej 2006/07 lipiec-wrzesień
- Sekretarz Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej 2007/08 lipiec-wrzesień
- Koordynator ds. ERASMUS+ na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej od 2016 roku

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Szczegółowe informacje o dorobku dydaktycznym i popularyzatorskim oraz współpracy naukowej międzynarodowej i krajowej oraz innej działalności (wg DzU. Nr 196, poz 1165) zebrałam i przedstawiłam w załączniku nr 4 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Lublin, dn. 31.01.2017

Ameto Nowalucwicz