

Puławy, 2022-12-20

Dr hab. Grzegorz Tomczyk, prof. Instytutu
Państwowego Instytut Weterynaryjny
- Państwowy Instytut Badawczy
Al. Partyzantów 57
24-100 Puławy

Ocena

**osiągnięć naukowo – badawczych, dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego
oraz współpracy międzynarodowej
dr nauk. wet. Anny Barbary Woźniak-Biel, ORCID:0000- 0002-7120-3919 ubiegającej
się o nadanie stopnia doktora habilitowanego
nauk weterynaryjnych,**

**przygotowana w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia naukowego
doktora habilitowanego na podstawie wniosku do Rady Doskonałości Naukowej z dnia
13.10.2022 r. Nr DRKN.Z4.400.31.2022 o wszczęcie postępowania habilitacyjnego
w dziedzinie Nauki Rolniczych w Dyscyplinie Weterynaria i powołaniem mnie na
Recenzenta Komisji Habilitacyjnej**

Ocena formalna

Otrzymane materiały dokumentują dorobek i osiągnięcia Kandydatki **Pani dr Anny Barbary Woźniak-Biel** do stopnia naukowego doktora habilitowanego w stopniu wystarczającym do wykonania analizy do celów postępowania w przewodzie habilitacyjnym. Spełniają wymogi formalne określone w Ustawie z dn. 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. Z 2022 r. poz. 574 ze zmianami).

Informacje ogólne (wykształcenie i przebieg pracy zawodowej)

Doktor nauk weterynaryjnych Anna Barbara Woźniak-Biel uzyskała dyplom lekarza weterynarii na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej we Wrocławiu w 2005 roku.

Bezpośrednio po odbyciu studiów rozpoczęła studia doktoranckie (2005-2010) a następnie pracę w Katedrze Epizootiologii Zakładzie z Kliniką Ptaków i Zwierząt

Egzotycznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu gdzie pracuje do dnia dzisiejszego. Począwszy od 2010 r. po uzyskaniu stopnia dr nauk wet. na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „*Ocena wrażliwości na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne szczepów *Campylobacter* ssp. wyizolowanych od drobiu i ludzi oraz analiza ich genetycznego zróżnicowania*”, pracuje jako adiunkt. Dodatkowo rozszerzyła swoją edukację zawodową uzyskując tytuł Specjalisty: wpięrow po odbyciu stosownego szkolenia; Specjalisty chorób drobiu oraz ptaków ozdobnych (2010 r.) a także; Specjalisty chorób zwierząt futerkowych w roku 2014.

Należy zaznaczyć, że zagadnienia związane z patogenezą, diagnostyką i zwalczaniem chorób bakteryjnych ale również niezwykle obecnie istotne problemy antybiotykoodporności stanowią szeroki zakres zainteresowań Habilitantki już od 2005 roku w tym zakażeń wywołanych przez pałeczki *Campylobacter* spp. u drobiu a następnie zakażeń *Enterococcus* spp. (od 2019) oraz jako kolejnym obszarem związanym z problematyką lekooporności szczepów bakterii *E.coli* w roku 2021. Habilitantka swoją uwagę skupia zarówno na epidemiologii zakażeń tymi bakteriami z precyzyjną identyfikacją gatunkową oraz ich wrażliwości na chemioterapeutyki z eksponowanym w jej badaniach problemem oporności bakterii izolowanych od drobiu co może mieć także istotne znaczenie w ratowaniu życia ludzkiego z użyciem wybranych leków w sytuacji zagrożeń i zakażeń tzw. szpitalnych. Będący w kręgu zainteresowań badawczych Habilitantki *Campylobacter* spp. jest główną przyczyną chorób przenoszonych przez żywność u ludzi, szczególnie gdy są przenoszone przez niewłaściwe obchodzenie się z niedogotowanym mięsem drobiowym i jego spożywaniem. Wiele danych wskazują, że patogen ten stanie się główną przyczyną schorzeń i zatruc pokarmowych u ludzi w kolejnych dekadach wypierając nawet obecnie ważne i groźne zatrucia pokarmowe na tle zakażeń *Salmonella*. Większość zakażeń *Campylobacter* ustępuje samoistnie, ale w ciężkich lub długotrwałych przypadkach konieczne jest leczenie przeciwdrobnoustrojowe np. z użyciem fluorochinolonów i makrolidów. Masowe stosowanie tych leków, zarówno w medycynie klinicznej, jak i produkcji zwierzęcej, ma duży wpływ na zdrowie publiczne.

Ocena osiągnięcia naukowego wymienionego oraz pozostałego opublikowanego dorobku naukowego

Ocena prac stanowiących szczególne osiągnięcia naukowe wynikające z art. 219 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zmianami).

Osiągnięcie naukowe prezentowane przez dr nauk wet. **Annę Barbarę Woźniak-Biel** to cykl publikacji pod wspólnym tytułem „*Fenotypowa i molekularna charakterystyka antybiotykoodporności oraz czynników wirulencji szczepów *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. i *E. coli* izolowanych od drobiu*”.

Cykl ten składa się z 3 oryginalnych, monotematycznych publikacji o łącznej liczbie IF równej **7,392** wg bazy *Journal Citation Reports* (JCR) i **165** punktów według listy czasopism punktowanych MNiSW. Udział Habilitantki w powstawaniu tych prac był znaczący. W dwóch prezentowanych pracach, dr **Anna Barbara Woźniak-Biel** pełniła rolę pierwszego autora, a w trzeciej jest drugim autorem. Jej szacunkowy udział w ich powstawaniu wg przedłożonych deklaracji samej Autorki jest bardzo wysoki (Załącznik nr 4). Do wszystkich prac przedłożonego do oceny cyklu dołączono odpowiednie oświadczenia pozostałych współautorów, a ich fotokopie wraz z odpowiednimi odbitkami prac załączono w przygotowanym autoreferacie przedłożonym Recenzentowi.

Pracami wchodzącymi w skład omawianego cyklu są:

- 1. Woźniak-Biel A, Bugla-Płoskońska G, Kielsznia A, Korzekwa K, Tobiasz A, Korzeniowska-Kowal A, Wieliczko A.:** High Prevalence of resistance to fluoroquinolones and tetracycline *Campylobacter* spp. isolated from poultry in Poland. *Microbial Drug Resistance* 2018, 24:314-322
(IF=2,397; 25 pkt. MNiSW)
- 2. Woźniak-Biel A, Bugla-Płoskońska G, Burdzy J, Korzekwa K, Ploch S, Wieliczko A.:** Antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from humans and turkeys in Poland. *Microbial Drug Resistance* 2019, 25:277-286
(IF=2,519; 70 pkt. MNiSW)
- 3. Ćwiek K, Woźniak-Biel A, Karwańska M, Siedlecka M, Lammens C, Rebelo AR, Hendriksen RS, Kuczkowski M, Chmielewska-Władyka M, Wieliczko A.:** Phenotypic and genotypic characterization of *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10 and ST744 isolated from poultry in Poland. *Brazilian Journal of Microbiology* 2021, 52(3):1597-1609
(IF=2,476; 70 pkt. MNiSW)

Wszystkie wykazane powyżej prace stanowią tematyczny cykl badawczy w wyraźnie wyrażonym postępie wiedzy n/t problematyki zakażeń i ich następstw u drobiu w kraju, wdrożeniem nowoczesnych metod ich wykrywania i identyfikacji także co istotne dla zdrowia ludzkiego problemów wywoływanych przez zakażenia bakteriami oportunistycznymi i problematyki dotyczącej ograniczenia możliwości terapii w związku z ich rolą w narastaniu oporności na antybiotyki co było jednym z głównych celów badawczych Habilitantki. Powyższe ma znamiona tzw. dzieła i spełnia kryteria stawiane tego typu wymaganiom. Należy dodać, że wszystkie prace są opublikowane w dobrych czasopismach naukowych co oczywiście dodaje im rangi badań naukowych związanych z tymi mikroorganizmami, którymi zajęła się Habilitantka, ich cech fenotypowych i genetycznych wykazanych z wykorzystaniem najnowszych metod badawczych.

W ogólnych zarysach podjęty cykl badań miał na celu:

- zasadniczy cel obejmował ocenę kształtowania się fenotypowej i genetycznej oporności szczepów *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. oraz *Escherichia coli* izolowanych od kurcząt i indyków rzeźnych oraz od ludzi
- ocenę molekularnych podstaw antybiotykooporności - tj. występowania mutacji, genów warunkujących oporność fenotypową badanych szczepów jako pośredniego wskaźnika racjonalnego lub nieracjonalnego stosowania chemioterapeutyków u zwierząt lub ludzi. Cel zakładał głównie ocenę w kontekście możliwego wertykalnego i horyzontalnego transferu genów oporności, który z założenia może odbywać się nie tylko przez produkty pochodzenia zwierzęcego, ze zwierząt na ludzi, ale również może przebiegać w mikrobiomie przewodu pokarmowego między bakteriami
- zastosowanie i wykorzystanie techniki MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Description-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) do identyfikacji i porównania profili białkowych szczepów z rodzaju *Campylobacter* izolowanych od drobiu (określenie swoistego dla mikroorganizmu profilu białkowego z użyciem spektrometrii mas).
- kolejnym celem była ocena zależności między antybiotykoopornością (w tym wieloopornością szczepów) wśród szczepów *Enterococcus* spp. i *E. coli* izolowanych od różnych gatunków drobiu oraz od ludzi w kontekście ich zdolności tworzenia biofilmu. Założono, że zdolność formowania biofilmu przez bakterie jest uznawana za cechę, która wpływa na zwiększenie patogenności szczepów, ponieważ sprzyja przetrwaniu kolonii

bakteryjnych w niesprzyjających warunkach. W tak zwanym osadzie potrafią one przetrwać do 0,5 roku. Tym samym czyni je bardziej opornymi na czynniki środowiskowe, czy stosowane środki przeciwbakteryjne.

- cel wyznaczony w kolejnym etapie badań dotyczył oceny prevalencji a także charakterystyki wraz z analizą filogenetyczną szczepów *Escherichia coli*, posiadających geny *mcr*, izolowanych od różnych gatunków drobiu co istotnie poszerza wiedzę na temat roli tych genów w generowaniu oporności tych bakterii i występowania takowych szczepów *E. coli* u różnych gatunków drobiu

Jak już wspomniałem uprzednio zagadnienia związane z patogenezą, diagnostyką i zwalczaniem chorób bakteryjnych ale również niezwykle obecnie istotnego problemu antybiotykooporności stanowią szeroki zakres zainteresowań Habilitantki już od 2005 roku w tym zakażeń wywołanych przez pałeczki *Campylobacter* spp. u drobiu a następnie zakażeń *Enterococcus* spp. (od 2019). Kolejnym zagadnieniem związanym z problematyką lekooporności szczepów bakterii *E.coli* Autorka zajęła się podejmując badania w roku 2021. Habilitantka swoją uwagę skupia zarówno na epidemiologii zakażeń tymi bakteriami z precyzyjną ich identyfikacją gatunkową oraz ich wrażliwości na chemioterapeutyki określonych metodą klasyczną jak i z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej.

Podjęte przez Habilitantkę szczegółowe i dobrze zaplanowane a także głęboko przemyślane badania, których rezultaty opublikowano w pracach stanowiących w miarę monotematyczny cykl ocenianego osiągnięcia naukowego przedstawiony w postępowaniu habilitacyjnym pozwoliły na wykazanie w poszczególnych chronologicznie po sobie publikacjach następujących treści:

Praca (1) zatytułowana “High Prevalence of resistance to fluoroquinolones and tetracycline *Campylobacter* spp. isolated from poultry in Poland”. *Microbial Drug Resistance* 2018, 24:314-322

W pracy tej Habilitantka dokonała oceny częstości występowania poszczególnych gatunków *Campylobacter* spp. u kurcząt brojlerów i indyków w kraju. Wykazała częste występowanie zakażeń bakteriami z rodzaju *Campylobacter* w materiale biologicznym pochodzącym od tych gatunków drobiu w kraju. Celem badań była identyfikacja szczepów *Campylobacter*, przy użyciu zarówno metod PCR, jak i metod laserowej desorpcji i jonizacji laserowej (MALDI-TOF) wspomaganych matrycą w celu ujawnienia dokładności identyfikacji, Dokonała także oceny oporności przeciwdrobnoustrojowej i genetycznej badanych szczepów wykorzystując metodę klasyczną MIC oraz metody biologii

molekularnej. Reprezentatywną pulę izolatów własnych w pierw przebadano z użyciem metody mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym, w celu oznaczenia najmniejszego stężenia hamującego - MIC (Minimal Inhibitory Concentration), dla szczepów *Campylobacter* spp. w odniesieniu do dziewięciu różnych antybiotyków. Autorka w swych badaniach wykazała powszechne występowanie oporności na fluorochinolony i tetracyklinę szczepów *Campylobacter* spp. wyizolowanych od drobiu w kraju. Najwyższy odsetek oporności (100%) szczepów izolowanych od indyków i brojlerów kurzych stwierdzono wobec cyprofloksacyny, podczas gdy na tetracyklinę było opornych 58,1% od indyków i 78,6% szczepów od brojlerów. Wszystkie szczepy oporne na cyprofloksacynę miały mutację w genie *gyrA*, w pozycji Thr-86. Z kolei obecność genu *tetO* stwierdzono u 71% szczepów od indyków i u 100% izolatów od brojlerów. Wszystkie oporne szczepy na tetracykliny równocześnie posiadały gen *tetO*. Dodatkowo u pięciu szczepów pochodzących indyków i trzech od brojlerów, wrażliwych na tetracyklinę, stwierdziła obecność innego genu *tetM*. Wyniki te wskazują na wysoką częstość występowania szczepów *Campylobacter*, które są fenotypowo i genetycznie odporne na fluorochinolony i tetracyklinę co wyzwała obawy co do dalszego narastania oporności. Wyniki badań wykazały zatem na wysoki odsetek szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od kurcząt rzeźnych i indyków, opornych na chinolony (ciprofloksacynę, kwas nalidyksowy) oraz tetracyklinę. Analizując profile wielooporności Autorka nie stwierdziła szczepów wieloopornych wśród bakterii z rodzaju *Campylobacter*.

W publikacji drugiej „Antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from humans and turkeys in Poland”. *Microbial Drug Resistance* 2019, 25:277-286, w ramach badań Habilitantka z zamysłem podjęła się zbadania problemu częstej przyczyny stale się utrzymujących zakażeń bakteryjnych w systemach pojenia drobiu i ich „obrastanie” od wewnątrz tzw. biofilmem. Wiele danych literaturowych wskazuje, że żywotność i zdolność do namnażania się bakterii saprofitycznych i chorobotwórczych może utrzymywać nawet powyżej 0,5 roku od momentu wnikięcia do systemu pojenia. Autorka słusznie założyła tezę, że w trakcie wielokrotnego namnażania się w biofilmie bakterii może dochodzić do wzrostu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Tworzenie biofilmu i ewentualną pojawiającą się oporność badała słusznie wobec oportunistycznych bakterii *Enterococcus* spp. izolowanych u ludzi i indyków w hodowlach wielkotowarowych. Enterokoki są licznymi bakteriami w fizjologicznym składzie flory jelitowej wielu organizmów wyższych, w tym ludzi i u drobiu. Oportunistyczne bakterie w pewnych warunkach stają się patogenami i mogą wywoływać nawet śmiertelne infekcje dróg moczowych i zapalenie wsierdza u ludzi. U drobiu produkcyjnego ras ciężkich w ostatniej

dekadzie patogeny te powodowały zapalenie stawów nóg, stawów kręgosłupa i szpiku a przy rozwinięciu się sepsy prowokują liczne upadki w pierwszych tygodniach życia. Habilitantka wpierw zgromadziła odpowiednio liczną kolekcję szczepów (w liczbie 107 szczepów) *Enterococcus* spp. w tym prawie połowicznie pochodzących od ludzi i od indyków (odpowiednio 56 i 51). W badaniach wstępnych jako gatunek *Enterococcus faecalis* określiła wśród badanych izolatów pozyskanych jako próbki od ludzi 80,36% i w 80,39% próbek pochodzących od indyków. Z kolei gatunek *Enterococcus faecium* zidentyfikowała u znacznie mniej licznej grupy badanych izolatów (u 8,93% szczepów ludzkich i 17,65% indyków). Niezależnie od gatunku zaskakująco wysoki odsetek szczepów Autorka wykazała jako opornych na tetracyklinę wśród szczepów ludzkich 85,71% a jeszcze wyższy (94,12%) izolowanych od indyków. W tych badaniach wykazała także oporność na erytromycynę u 37,50% szczepów ludzkich i wysoką 76,47% oporność wśród szczepów indyckich. W odniesieniu do 27,10% wszystkich szczepów wykazała oporność na cyprofloksacynę a dodatkowo wykazała, że 25% szczepów ludzkich i 15,69% szczepów od indyków było opornych na wankomycynę. Niewątpliwie istotnym było wykazanie obecności oporności na wiele substancji przeciwustrojowych. Wykazała ją odpowiednio u 32,14% i 43,14% szczepów ludzkich i z kolekcji własnej Habilitantki od indyków. Badania w zakresie genetycznych uwarunkowań oporności pozwoliły jej wykazać, że gen oporności na tetracyklinę, tetM, wykryto u 82,24% wszystkich analizowanych szczepów, podczas gdy gen tetO znaleziono u 53,57% szczepów ludzkich, natomiast stwierdzono go jedynie u 7,84% szczepów indyckich. Spośród innych genów warunkujących oporność Autorka wykazała gen oporności na wankomycynę (vanA) wykryty u siedmiu szczepów badanej bakterii w tym sześciu wyizolowanych od indyków i u jednego od ludzi. Gen ermB warunkujący oporność na makrolidy wykryto w 55,14% wszystkich izolatów (42,86% szczepów ludzkich i 68,63% indyków), podczas gdy gen ermA wykryto u 17,65% indyków, ale tylko w 3,57% ludzkich izolatów. Świadczy to o dużym zróżnicowaniu szczepów w zakresie różnej genetycznej oporności ale w tym miejscu należy wskazać na celne stwierdzenie Autorki tych badań, że wszystkie te szczepy miały zdolność tworzenia biofilmów czyli mogących nabrać nowych cech oporności i stanowić stale zagrożenie w leczeniu dla kolejnych populacji drobiu hodowlanego i także dla ludzi. Badaczka wskazała także na uwarunkowania powstawania biofilmu gdzie silniejszy (szybciej się tworzący) biofilm powstał po 24-godzinnej inkubacji i był prowokowany przez szczepy wyizolowane od indyków podczas gdy wszystkie badane szczepy od ludzi wytwarzały go po 48 godzinach.

Analizując trzecią wskazaną w dziele publikację (3) “Phenotypic and genotypic characterization of mcr-1-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10 and ST744 isolated from poultry in Poland.” Brazilian Journal of Microbiology 2021, 52(3):1597-1609, - należy zauważyć znaczący wkład Habilitantki w badania z wykorzystaniem nowoczesnych technik do przeprowadzenia charakterystyki fenotypowej i genotypowej wielolekoopornych szczepów mcr-1-dodatnich *Escherichia coli* określonych jako ST93, ST117, ST156, ST10 i ST744 wyizolowanych od drobiu w populacji krajowej. Szczególnie istotne było zbadanie mechanizmów tzw. plazmidowej oporności bakterii na polimiksynę, która stanowi obecnie poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie. W podjętych badaniach celem było określenie występowania genów oporności na kolistynę za pośrednictwem plazmidu a następnie przeprowadzenie charakterystyki molekularnej szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych od drobiu. W odniesieniu do licznej kolekcji własnej 318 szczepów *E.coli* poddanej badaniom wpieryw wykonano test wrażliwości na szereg środków przeciwdrobnoustrojowych metodą minimalnego stężenia hamującego a następnie w powyższych badaniach Autorka określiła częstość występowania genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w tym genów mcr1-mcr5, badając je metodą PCR. Zdolność poszczególnych szczepów do tworzenia biofilmu badała metodą barwienia fioletem krystalicznym. Pokrewieństwo genetyczne szczepów *E. coli* mcr-1-dodatnich oceniano metodą typowania sekwencji multilocus. Wprowadzenie i wykorzystanie w panelu środków przeciw ustrojowych i określanie antybiotykowrażliwości szczepów wobec chloramfenikolu (leku już od dłuższego czasu zakazanego w terapii drobiu) stanowi trafne posunięcie w tych badaniach albowiem należy się domyślać, że zamiar Badaczki był celowy w tym względzie, ponieważ prawdopodobnie słusznie założyła, że oporność na chloramfenikol wśród badanych genów oporności może być „historyczna” tj. nabyta dużo wcześniej u pewnej populacji bakterii. Badania te wniosły nową wiedzę wykazując, że spośród 318 szczepów *E. coli* jedynie 5,35% zawierało gen mcr-1. Jednak wszystkie szczepy *E. coli* z genem mcr-1- były wielolekoopornymi i aż 88,24% izolatów zawierało geny oporności (geny błatem) dla tetracykliny (tetA i tetB) i sulfonamidów (sul1, sul2 i sul3). Wysokie wskaźniki oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe zaobserwowano szczególnie w odniesieniu do ampicyliny (100%), tetracykliny (88,24%) i chloramfenikolu (82,35%). W wysokim odsetku (41,18) jako szczepy wielolekooporne, mcr-1-dodatnie było równocześnie umiarkowanymi producentami biofilmu, podczas gdy pozostałe (58,82 %) szczepy wykazywały słabą produkcję biofilmu. Dzięki wykonanym badaniom zidentyfikowano w odniesieniu do tych szczepów *E.coli* dziewięć różnych typów sekwencji w tym jeden jako

nowy ST został zidentyfikowany w tych badaniach. Typem dominującym ST był ST93 (29,41%), a następnie ST117 (17,65%), ST156 (11,76%), ST 8979 (11,76%), ST744 (5,88%) i ST10 (5,88%). Co więcej, wyniki wykazały niską częstość występowania szczepów *E. coli* mcr-1-dodatnich wyizolowanych z krajowej populacji drobiu. Nie bez znaczenia jest stwierdzenie wynikające z tych badań, że wszystkie wyizolowane szczepy były odporne na wiele środków przeciwdrobnoustrojowych a równocześnie były w stanie tworzyć biofilm na niskim lub średnim poziomie. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na niską prevalencję szczepów *E. coli* izolowanych od drobiu, posiadających geny oporności na kolistynę, mimo jej długoletniego stosowania w produkcji drobiarskiej co jest odkryciem optymistycznym. Z kolei częstość występowania innych genów, takich jak *tetA*, *blaTEV*, czy *sul1*, *sul2* mogła wynikać z dość powszechnego stosowania wybranych chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych (β -laktamy, tetracykliny, sulfonamidy) w leczeniu zakażeń bakteryjnych drobiu różnego tła chorób przez wiele lat. W badaniach nie wykazano obecności genów plazmidowych PMQRs (Plasmid-Mediated Quinolone Resistance genes) takich jak *qnrA-D*, *qnrS*, czy *qepA*, odpowiedzialnych za oporność szczepów na chinolony. Badanie Habilitantki, które są niewątpliwie wynikiem jej szczególnego zainteresowania naukowego wykazały, że wśród wymienionych genów, *qepA* jako jedyny koduje pompy błonowe efflux odpowiedzialne za obniżanie wewnątrzkomórkowego stężenia chemioterapeutyku. U zaledwie jednego szczepu, izolowanego od indyków rzeźnych, stwierdzono obecność genu *aac(6')-Ib-cr*, co może wskazywać na fakt, że oporność ta kodowana jest przede wszystkim chromosomalnie jako mutacja w regionie QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region), w podjednostce topoizomerazy II (GyrA i GyrB) i/lub topoizomerazy IV (ParC i ParE).

Reasumując monotematyczny cykl 3 prac doświadczalnych pod wspólnym tytułem „**Fenotypowa i molekularna charakterystyka antybiotykoodporności oraz czynników wirulencji szczepów *Campylobacter spp.*, *Enterococcus spp.* i *E. coli* izolowanych od drobiu**” przedstawiony do oceny, (co należy podkreślić), że jest prawie całkowicie osobistym osiągnięciem Habilitantki o dużym i ważnym znaczeniu oraz Jej niekwestionowanym wkładem w rozwój nauk weterynaryjnych w dziedzinie patologii zwierząt (szczególnie u drobiu w produkcji wielkotowarowej). Dodatkowo dotyczy jakże istotnego obecnie wkładu w wyjaśnienie problemu narastania oporności bakterii na stosowane dotychczas w terapii antybiotyki. Również zbadanie zdolności bakterii oportunistycznych istotnych jednak dla zdrowia zwierząt i człowieka do tworzenia własnego środowiska przetrwania (tworzenie

biofilmu) i zmienności genetycznej w nabywaniu oporności jest osiągnięciem Habilitantki. Nie jest również bez znaczenia dla zdrowia konsumentów produktów drobiarskich pojawianie się możliwości transferu genetycznego u opornych na leczenie szczepów bakteryjnych, będących także potencjalnymi donorami genów oporności dla innej bakteryjnej flory jelitowej ludzi. Obecność licznych determinant oporności, zwłaszcza tych, które mogą być zlokalizowane na ruchomych elementach genetycznych, stanowi zagrożenie w horyzontalnym rozprzestrzenianiu się lekooporności w obrębie bakterii jakże dr wet. Anna Barbara Woźniak-Biel poddała swoim badaniom i może to sprzyjać pojawieniu się patogenów kolonizujących przewód pokarmowy człowieka i ptaków oraz ich przetrwaniu w środowisku. Przeprowadzone przez Habilitantkę badania jako pierwsze w kraju wykazały, że drób użytkowy jest źródłem opornych i wieloopornych szczepów bakterii z rodzaju *Campylobacter*, *Enterococcus* i *E. coli*. a oporność tych bakterii na stosowane najczęściej w terapii chemioterapeutyki przeciwbakteryjne jest wynikiem działania kilku mechanizmów oporności i nie jest uzależniona od występowania pojedynczych genów lub mutacji. Zaadoptowanie techniki MALDI-TOF MS jako szybkiego i wiarygodnego narzędzia do identyfikacji gatunkowej oraz w badaniach w zakresie porównania widm białkowych dla bakterii z rodzaju *Campylobacter* pozwoliło Autorce wysunąć spostrzeżenie, że może stanowić ta technika alternatywę dla badań molekularnych. Jej nowatorskie badania wskazują na obecność kilku mechanizmów oporności (genów, mutacji, pomp efflux) a te właśnie wpływają na poszerzenie spektrum oporności bakterii. Autorka zwraca uwagę na istotną rolę jaką odgrywają tzw. pompy (efflux pumps) zlokalizowane w błonie komórkowej bakterii i ich aktywną rolę w „wyrzucaniu” przez bakterie odporne substancji niekorzystnych np. substancji antybiotycznych. Kształtuje to cechy oporności bakterii na wiele chemioterapeutyków i określany jest pod nazwą CmeABC. Niepokojącym może być fakt, że bakterie izolowane od drobiu i ludzi charakteryzują się najwyższym odsetkiem oporności na tetracykliny, chinolony oraz β -laktamy (przez wiele lat stosowane powszechnie) a dodatkowo odporne i wielooporne szczepy *Enterococcus* spp. mogące stanowić wcześniej florę oportunistyczną - tworzą silny biofilm (sprzyjający także możliwości transferowi horyzontalnemu i wymianie genów). Z drugiej strony, w rezultacie wykonanych badań Dr Anna Barbara Woźniak-Biel stwierdziła, że odporne i wielooporne izolaty *E. coli* formują biofilm na słabym lub umiarkowanym poziomie. Wykazała wysoki odsetek wieloopornych szczepów wśród izolatów *E. coli mcr-1*-dodatnich a równocześnie niską prewalencję genów *mcr* wśród izolatów *E. coli* pochodzących od różnych gatunków drobiu grzebiącego i wodnego.

Przedłożony cykl prac spełnia wszystkie kryteria ustawowe szczególnego osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego dr hab. nauk wet. w świetle wymaganych prawem przepisów.

Ocena pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Nie sposób nie docenić innych zainteresowań naukowych Habilitantki i jej znaczącego dorobku poza przedstawionym cyklem badań wchodzących w skład dzieła.

Analiza pozostałych osiągnięć naukowych dr **Anny Barbary Woźniak-Biel** stanowi cenne źródło wiedzy o całej karierze naukowej, palecie zainteresowań naukowych i osiągniętych wynikach badań. Były one uwarunkowane zakresem tematyki naukowej jaką na przestrzeni lat kreowano w jej macierzystej Katedrze i nie tylko. Habilitantka w swoich badaniach w ramach ocenianego zakresu tematycznego była też żywo zainteresowana potrzebą rozwoju zagadnień z zakresu patologii drobiu w produkcji wielkotowarowej co łączy się szczególnie w ostatnich latach z bardzo dynamicznym rozwojem tej gałęzi produkcji zwierzęcej. Poza pracami stanowiącymi osiągnięcie naukowe Habilitantka brała udział w realizacji innych badań naukowych.

Główne kierunki tych badań obejmują takie zagadnienia jak:

- charakterystyka fenotypowej i genetycznej antybiotykooporności szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od drobiu
- badania nad zakażeniami cirkowirusowymi ptaków oraz charakterystyka cirkowirusów izolowanych od gęsi
- badania nad antybiotykoopornością oraz opornością na dezynfekanty szczepów *Listeria monocytogenes*
- analiza różnicowa bakterii *Listeria monocytogenes* pod kątem różnych genotypów inlA, ich zdolności do mutacji oraz adaptacji do niskich temperatur
- badań nad immunogennością białka CjaA oraz nad oceną ochronnego działania białka OMC *C. jejuni* w zapobieganiu kampylobakteriozie drobiu

- ocena wrażliwości oraz genetyczna charakterystyką antybiotykoodporności u szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od ptaków wolnożyjących.
- analizy filogenetycznej oraz charakterystyki genów wirulencji szczepów *Salmonella* izolowanych od ludzi i gadów
- występowania i molekularnego zróżnicowania genów wirulencji szczepów *Yersinia enterocolitica* i *Y. enterocolitica* like izolowanych od ludzi i zwierząt

a także, inne dość szerokie zainteresowania interdyscyplinarne Habilitantki i badania wykonane w różnych zespołach badawczych jak:

- genetyczna charakterystyka *Cryptococcus neoformans* izolowanych od zwierząt
- wpływu owoców derenia jadalnego (*Cornus mas*) na poziom trójglicerydów i występowania miażdżycy poprzez aktywację PPARa u królików z hipercholesterolemią
- badań nad występowaniem *Toxoplasma gondii* u królików
- opisu przypadków klinicznych jak ocena histopatologiczna zmian usuniętych z jamy jeża pigmejskiego
- badań nad występowaniem i charakterystyką przeciwciał matczynych u ptaków

Zakres działalności naukowej dr **Anny Barbary Woźniak-Biel** charakteryzuje się dużą różnorodnością tematyczną obejmującą epidemiologię i rolę różnych czynników bakteryjnych w patologii drobiu, opracowaniem i wdrażaniem technik diagnostycznych i terapii drobiu (antybiotykoterapii) a głównie badań nad problematyką badania mechanizmów nabywania oporności u szeregu bakterii oportunistycznych jak i patogennych. Jej zainteresowania badawcze w zakresie metod kontrolowania zakażeń bakteryjnych w tym lekoopornych i określania parametrów odporności zmierzają do ograniczenia stosowania antybiotyków u drobiu co obecnie staje się ogólnoswiatowym wyzwaniem. Całość, w miarę jednak spójnych zainteresowań naukowych Habilitantki w okresie około 17-tu lat jej pracy naukowej, można skupić w obszary tematyczne takie jak:

- techniki diagnostyczne w rozpoznawaniu i zwalczaniu chorób bakteryjnych (wdrożenie szeregu nowoczesnych technik diagnostycznych).

- charakterystyki fenotypowej i genetycznej antybiotykoodporności szczepów bakteryjnych izolowanych od drobiu gdzie dokonała identyfikacji szczepów z zastosowaniem metod biologii molekularnej a następnie określiła wrażliwość izolatów na wybrane chemioterapeutyki,

- badań nad genetycznymi uwarunkowaniami oporności, określenie częstości występowania mutacji genetycznych odpowiedzialnych za oporność na chemioterapeutyki w odniesieniu do izolatów pochodzących od drobiu z różnych okresów w tym tzw. szczepów muzealnych.

W kolejnych etapach:

-określenia częstości występowania mutacji genetycznych związanych z opornością na chemioterapeutyki dla szczepów drobiowych porównując je ze szczepami izolowanymi od ludzi

- występowania, charakterystyki i oceny właściwości patogenów bakteryjnych w zakażeniach u drobiu oraz innych ptaków (ozdobnych i wolnożyjących)

- występowania, charakterystyki i oceny właściwości innych patogenów bakteryjnych izolowanych z żywności i od różnych gatunków zwierząt w zakresie określenia ich zdolności adaptacyjnych wynikających z obecności mutacji genowych w tym kształtujących czynniki wirulencji u bakterii

Badania które prowadziła i/lub w których uczestniczyła Habilitantka w zakresie tych obszarów wnoszą nową wiedzę a wymiernym wskaźnikiem tych badań jest szereg publikacji w czasopismach znajdującym się w bazie JCR.

Efektem prowadzonych we wszystkich wymienionych powyżej obszarach badań Habilitantki były wydane drukiem publikacje w liczbie 18-tu w czasopismach z listy JCR posiadających Impact Factor (IF) w oraz uzyskanie 780 punktów MNiSW (dane wykazane w autoreferacie „Załącznik nr 4 do wniosku”), co daje łączny współczynnik wpływu 41,669 i 1096 punktów ministerstwa MNiSW. Łącznie habilitantka opublikowała 39 publikacji których tematyka dotyczyła prowadzonej przez nią aktywności naukowej. Były to publikacje z okresu przed (14 publikacje o IF 1,242) i po doktoracie (22 publikacji o IF 40,427). Na tematyczne dzieło składają się 3 publikacje o współczynniku wpływu (IF) od 2,397 do 2,519 (sumaryczny IF 7,392) i 165 pkt MNiSW. Habilitantka jest też autorką 21 publikacji nie posiadających IF, 3 rozdziałów w monografiach naukowych, 44 doniesień na konferencje naukowe i dwóch publikacji popularnonaukowych (Zał. Nr 4 i Zał. Nr 5). W pozostałych informacjach naukowych należy zauważyć znaczącą liczbę cytowań w bazie Web of Science Core Collection, która wynosi 232 (bez autocytowań 227), zaś w bazie Scopus wynosi 252 (bez autocytowań 247). Posiadany Index Hirscha w bazie Web of Science Core Collection wynosi 8 a w bazie Scopus 9.

Habilitantka w swoich badaniach w ramach ocenianego zakresu tematycznego potrafiła efektywnie współpracować z innymi badaczami podejmując tematykę dotyczącą

występowania i zróżnicowania a także fenotypowej i genotypowej charakterystyki szczepów *Gallibacterium anatis* izolowanych od drobiu, którą to współpracę prowadzi z Uniwersytetem w Kopenhadze (Dania), Section for Veterinary Clinical Microbiology, Department of Veterinary and Animal Sciences. Wg przedłożonej dokumentacji także krajowa współpraca jest udziałem Dr Anny Barbary Woźniak-Biel jak: w zakresie opracowywania preparatów bakteriofagowych dla drobiu przeciw bakteriom z rodzajów *Salmonella*, *Campylobacter* oraz patogennym szczepom *E.coli* (APEC)- współpraca z Katedrą Biotechnologii Mikrobiologii Żywności UP we Wrocławiu, współpraca w badania nad immunogennością i skutecznością szczepień p-ko kamylobakteriozie u kurcząt z wykorzystaniem wyselekcjonowanego szczepu ST x9718 ,wytwarzającego białko CjaA *Campylobacter jejuni* oraz z Katedrą i Zakładem Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w zakresie badań nad wyciągiem z owocu derenia jadalnego i jego wpływu na koncentrację trójglicerydów i rozwój arteriosklerozy u królików z hipercholesterolemią. Efekt tej współpracy Habilitantki to nie tylko cenne publikacje naukowe ale również patent (jest współprawną właścicielką Patentu Nr 222598 za preparat do utrzymywania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów po stosowaniu suplementu diety z udziałem preparatu z derenia jadalnego). Otrzymała także medal wynalazczości.

Współpracując z sektorem gospodarczym w latach 2018-202 brała czynny udział w 2 projektach naukowo-wdrożeniowych pod kierownictwem prof. dr. hab. A. Gawła finansowanych przez EFRROW mających na celu wdrożenie innowacyjności produktowej i wzrost konkurencyjności dotyczącej wylęgu „Piskląt modlińskich” za które to projekty jako współautorka uzyskała nagrodę MRiRW.

Inne osiągnięcia, nie wymienione w pkt. IIIA-IIIP.

Dr. **Anna Barbara Woźniak-Biel** jest Specjalistą w dziedzinie- Choroby drobiu i ptaków ozdobnych oraz Specjalistą w dziedzinie- Choroby zwierząt futerkowych. Obydwa dyplomy specjalisty zostały wydane przez Komisję ds. Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Weterynaryjne Centrum Kształcenia Podyplomowego w Puławach odpowiednio w 2010 i 2014 roku.

W swojej zawodowej edukacji Habilitantka wykazała się poza zasadniczą pracą naukową aktywnością w zakresie odbytych staży naukowych w tym zagranicznych:

- pięciomiesięczny staż naukowo-badawczy w University of British Columbia, Vancouver, Canada

- staż szkoleniowy w Uniwersytecie im. Piotra i Marii Curie, Paryż
- pięciomiesięczny staż szkoleniowy kliniczny w ramach programu Sorates-Erasmus, Uniwersytet Ludwig- Max. w Monachium

Ponadto Dr. A.B. Woźniak-Biel brała aktywny udział w 6 specjalistycznych szkoleniach w tym w jednym zagranicznym.

Ważną aktywnością Habilitantki był jej udział w kierowaniu i realizowaniu jako wykonawca 5 projektów badawczych. Dodatkowo była kierownikiem 4 zadań badawczych finansowanych w ramach projektów:4/GW/2011, MWet/736/2013/S.C, MWet /285/2012/S.C. i Mwet/401/2014/S.C.

Kształcenie kadry naukowej

Kandydatka sprawowała opiekę naukową w charakterze promotora pracy magisterskiej dotyczącej badań obejmujących charakterystykę fenotypową i genotypową szczepów *Enterococcus* spp. izolowanych od drobiu i ludzi a także pełniła rolę recenzenta w 3 pracach magisterskich których tematyka badań obejmowała zagadnienia charakterystyki czynników wirulencji szczepów *E.coli* z przypadków kolibakteriozy u ptaków w koleracji do oporności na bakteriobójczą aktywność surowicy. Recenzowała także pracę dotyczącą oporności szczepów *Campylobacter* spp. na wybrane chemioterapeutyki oraz analizę mechanizmów warunkujących tę oporność. Była to tematyka bardzo zbliżona do tematyki badań jakie wykonywała w swojej karierze naukowej Habilitantka co mogło mieć pozytywne przełożenie w postaci dodatkowych walorów wiedzy. Dr wet. Anna Barbara Woźniak-Biel była też wielokrotnym opiekunem merytorycznym nad badaniami prowadzonymi przez studentów oraz jednej doktorantki.

W zakresie dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego

Dr. Anna Barbara Woźniak –Biel prowadzi także działalność popularyzatorską będąc autorem lub współautorem 8 publikacji o charakterze popularno-naukowym wymienionych w pkt.II.3 i II.5 Załącznika Nr 5 będącego składnikiem wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Habilitantka przynależy do szeregu organizacji i towarzystw zawodowych:

- jest członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych- PTNW
- członkiem grupy eksperckiej w zakresie zoonoz przy wdrażaniu projektu ZODIAC
- członkiem Komisji ds. sprawozdawczości i informacji Rady Dyscypliny Weterynaria (POLON)

- była wielokrotnym członkiem Komitetu organizacyjnego Naukowej Konferencji Drobiarskiej oraz Członkiem organizatorem sesji w ramach Kongresów PTNW i Konferencji „Eimeriana Avia”.

Wielostronna i wielokierunkowa aktywność naukowa, publikacyjna, dydaktyczna, popularyzatorska i wdrożeniowa Habilitantki była wielokrotnie nagradzana przez MRiRW, MN i SW oraz Rektora UP we Wrocławiu.

Działalność dydaktyczna

Habilitantka, przez cały okres zatrudnienia tj. od 2005 r. do chwili obecnej, w ramach działalności dydaktycznej prowadzi zajęcia z patologii drobiu i ptaków ozdobnych ze studentami na Wydziale Med. Wet. UP we Wrocławiu, co obejmuje tematykę „Choroby ptaków” oraz „Choroby ptaków –staż kliniczny” a dodatkowo „Choroby zwierząt egzotycznych” oraz „Choroby gołębi”. Szacunkowa liczba godzin w ramach przedmiotów polskojęzycznych wynosi 311 godzin i 6 godz wykładów w ciągu roku akademickiego. Aktywność dydaktyczna Habilitantki w przedmiotach anglojęzycznych, które obejmują „Avian Diseases”, „Avian Diseases – clinical internship”, „Zoonoses”, „Disease of Fur Animals”, „Exotic Diseases”, „Pigeon diseases” oraz „Veterinary Care for Exotic Animals” wynosi 111 godzin ćwiczeń i 19 godzin wykładów. Powyższe dane świadczą o bardzo aktywnym zaangażowaniu dr Anny Barbary Woźniak-Biel w działalność dydaktyczną uczelni. Do działalności dydaktycznej Habilitantki należy dodać jej współautorstwo rozdziału „Patologia płuc i okresu okołopłucowego” w podręczniku akademickim „Choroby drobiu” pod redakcją Prof. dr hab. M. Mazurkiewicza i Prof. dr hab. A. Wieliczko, Wydanie III. a także współautorstwo 2 innych rozdziałów w monografiach (2015) „Zoonozy XXI wieku- weterynaryjne programy monitorowania i zwalczania w produkcji drobiarskiej. Wektory i patogeny- w przeszłości i przyszłości” i w 2018r. „ Wybrane problemy neurologiczne królików domowych oraz ich diagnostyka” .

Należy zaznaczyć, że zagadnienia związane z patogenezą, diagnostyką i zwalczaniem chorób bakteryjnych ale również niezwykle obecnie istotnego problemu antybiotykoodporności stanowią szeroki zakres zainteresowań Habilitantki już od 2005 roku w tym zakażeń wywołanych przez pałeczki *Campylobacter* spp. u drobiu a następnie zakażeń *Enterococcus* spp. (od 2019) oraz kolejnym problemem związanym z problematyką lekooporności szczepów bakterii *E.coli* od roku 2021. Podsumowując dotychczasowy bardzo owocny okres działalności naukowej Habilitantki, należy podkreślić Jej duże zaangażowanie w dziedzinie patologii drobiu zarówno na poziomie badań oceniających szeroko wpływ poszczególnych patogenów bakteryjnych na zdrowie drobiu i wynikających z tego ew.

zagrożeń zoonotycznych dla ludzi, bezpieczeństwa żywnościowego produktów drobiarskich ale także w zakresie wybranych aspektów antybiotykoterapii z uwzględnieniem narastania oporności na leki stosowane w medycynie ludzkiej.

Po analizie przedłożonej dokumentacji dotyczącej dorobku i kariery naukowej Habilitantki, Recenzent może wywodzić wnioski, że jest ona nie tylko dojrzałym naukowcem co ma poparcie w analizie jej dorobku naukowego i publikacyjnego ale także osobą o szerokich horyzontach zainteresowań. Świadczy to dodatkowo pozytywnie o osobie Doktor Annie Barbarze Woźniak-Biel albowiem stanowi przykład możliwości osiągnięcia celu naukowego pozostając równocześnie jako lekarz weterynarii osobą o dużej aktywności zawodowej. Na uwagę zasługują też staranność przygotowania autoreferatu co odpowiada poziomowi i efektywności prowadzonych badań w ramach prac składających się na dzieło przedłożone we wniosku habilitacyjnego.

Wniosek końcowy

Analiza przedłożonego do oceny dorobku naukowego **dr Anny Woźniak-Biel**, w tym monotematycznego cyklu publikacji jako tzw. „osiągnięcie naukowe”- stanowiące znaczący wkład Kandydatki w rozwój nauk weterynaryjnych, upoważnia mnie do stwierdzenia, że Jej **osiągnięcia spełniają kryteria określone w art. 219 ust. 1 pkt.2 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r.** Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. Z 2022 r. poz. 574 ze zmianami) w postępowaniu habilitacyjnym.

Wnioskuje więc o podjęcie dalszych czynności w postępowaniu o nadanie dr n. wet. Annie Barbarze Woźniak-Biel stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie Nauki Rolnicze w Dyscyplinie Weterynaria.

Dr hab. Grzegorz Tomczyk,
profesor Instytutu



