

AUTOREFERAT

Dr n. wet. Anna Woźniak-Biel

Zakład Chorób Ptaków, Zwierząt Egzotycznych, Futerkowych i Laboratoryjnych

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 2022

1. Imię i nazwisko

Anna Barbara Woźniak-Biel; ORCID: 0000-0002-7120-3919

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- **2010** - stopień naukowy: **Doktor nauk weterynaryjnych**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu. Tytuł rozprawy doktorskiej: "Ocena wrażliwości na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne szczepów *Campylobacter* spp. wyizolowanych od drobiu i ludzi oraz analiza ich genetycznego zróżnicowania". Promotor pracy doktorskiej: prof. dr hab. Alina Wieliczko.
- **2005** - tytuł zawodowy: **Lekarz weterynarii**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza we Wrocławiu.
- **2014** - tytuł: **Specjalista chorób zwierząt futerkowych**, Komisja do Spraw Specjalizacji lekarzy Weterynarii, Centrum Kształcenia Podyplomowego, Puławy
- **2010** - tytuł: **Specjalista chorób drobiu oraz ptaków ozdobnych**, Komisja do Spraw Specjalizacji lekarzy Weterynarii, Centrum Kształcenia Podyplomowego, Puławy

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

Adiunkt

1.10.2010 – do chwili obecnej, Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Studia doktoranckie

1.10.2005 – 2.07.2010 - słuchaczka studiów doktoranckich w Katedrze Epizootiologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

Fenotypowa i molekularna charakterystyka antybiotykooporności oraz czynników wirulencji szczepów *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. i *E. coli* izolowanych od drobiu

Cykl obejmuje 3 oryginalne prace opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), których sumaryczny IF wynosi 7,392, a łączna liczba punktów MNiSW to 165.

4.1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- (1) Woźniak-Biel A,** Bugła-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)

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam twórcą hipotezy badawczej, pomysłodawcą badań, pobrałam materiał do badań, wykonałam znaczącą większość badań w kierunku anybiotykooporności oraz badania molekularne, dokonałam analizy wyników badań, przygotowałam dokumentację wyników badań, napisałam manuskrypt i odpowiedziałam na recenzje (autor korespondencyjny). Szczegółowo opisany udział poszczególnych współautorów w powstanie pracy znajduje się w załącznikach do niniejszego dokumentu.

- (2) Woźniak-Biel A,** Bugła-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)

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam twórcą hipotezy badawczej, pomysłodawcą badań, pobrałam materiał do badań, wykonałam znaczącą większość badań w kierunku anybiotykooporności oraz badania molekularne, dokonałam analizy wyników badań,

przygotowałam dokumentację wyników badań, napisałam manuskrypt i odpowiedziałam na recenzje (autor korespondencyjny). Szczegółowo opisany udział poszczególnych współautorów w powstanie pracy znajduje się w załącznikach do niniejszego dokumentu.

- (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)

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam twórcą hipotezy badawczej, pomysłodawcą badań, dokonałam analizy wyników badań, napisałam manuskrypt i odpowiedziałam na recenzje (autor korespondencyjny). Szczegółowo opisany udział poszczególnych współautorów w powstanie pracy znajduje się w załącznikach do niniejszego dokumentu.

4.2. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników

4.2.1. Wprowadzenie

Narastanie oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR - Antimicrobial Resistance) stanowi aktualny, globalny problem w produkcji drobiarskiej. Wieloletnie stosowanie chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych wywarło duży wpływ na kształtowanie się oporności szczepów chorobotwórczych i saprofitycznych (oportunistycznych, warunkowo chorobotwórczych) poprzez selekcję mutantów opornych na stosowane chemioterapeutyki przeciwbakteryjne. Poziom oporności oraz czas, w jakim ona powstaje zależą od samego czynnika infekcyjnego a także od stosowanego leku. Nieprzestrzeganie powszechnie obowiązujących zasad antybiotykoterapii jak: stosowanie dawki podprogowej (subterapeutycznej), zbyt krótki okres antybiotykoterapii, użycie antybiotyków jako stymulatorów wzrostu prowadzi do selekcji opornych szczepów. Dodoatkowo, ciągłe lub powtarzające się stosowanie leków antybakteryjnych sprzyja nie tylko powstawaniu, ale także wzmocnieniu oporności u bakterii (51). W intensywnej produkcji drobiarskiej antybiotyki i chemioterapeutyki przeciwbakteryjne podawane są nie tylko chorym klinicznie ptakom, ale również osobnikom nie wykazującym objawów

chorobowych w celu ograniczenia możliwości rozprzestrzeniania się choroby w stadzie (działanie metafilaktyczne). Niewłaściwe stosowanie oraz nadużywanie substancji przeciwbakteryjnych w produkcji drobiarskiej oraz medycynie ludzi, przyczyniło się do pojawienia oraz rozprzestrzenienia, na bardzo szeroką skalę, antybiotykoopornych drobnoustrojów charakteryzujących się różnymi mechanizmami oporności. W Polsce, do 2005 roku, niektóre antybiotyki (np. bacytracyna, tylozyna, spiramycyna) wykorzystywane były w produkcji drobiarskiej jako tzw. antybiotykowe stymulatory wzrostu (ASW), które dodawane do paszy miały chronić ptaki przed zakażeniami, a tym samym zapewniać bardzo dobre efekty produkcyjne, minimalizując tym samym straty finansowe spowodowane upadkami. Praktyka ta pozostawiła po sobie niepożądane skutki w postaci nabycia oporności wśród takich bakterii jak: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., czy *Enterococcus* spp. Drobnoustroje te stanowią potencjalne źródło zakażenia dla człowieka („food-borne pathogens”) i są coraz częściej przyczyną trudno leczących się biegunek u ludzi. Od 1 stycznia 2006 roku, zgodnie z Rozporządzeniem (WE) 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. „w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt” stosowanie antybiotykowych stymulatorów wzrostu jako dodatków paszowych w produkcji drobiarskiej jest w Polsce zakazane, jednakże konsekwencje zbyt powszechnego stosowania antybiotyków mogły mieć swoje długofalowe konsekwencje (44).

Terminem „oporność”, wg HMSO (Her Majesty’s Stationery Office), określa się zjawisko „zdolności drobnoustroju do przeciwstawiania się chemioterapeutykowi”. Z pojęciem oporności stykamy się w kilku aspektach. Wyróżniamy oporność naturalną, indukowaną oraz nabytą. Pierwsza z nich wynika z naturalnych, genetycznie uwarunkowanych właściwości fenotypowych bakterii np. szerokość kanałów proteinowych w błonie komórkowej. Wielkość tych kanałów decyduje o tym czy dana cząstka antybiotyku przedostanie się do wnętrza komórki, czy zostanie odrzucona. Oporność indukowana nie występuje stale, ale powstaje w obecności konkretnej substancji czynnej. Bakterie „aktywują” gen odpowiedzialny za syntezę enzymu doprowadzającego do inaktywacji chemioterapeutyku (7, 45). Zjawisko oporności nabytej wiąże się z wystąpieniem jednej lub kilku mutacji punktowych w genach chromosomalnych lub plazmidowych oraz z transferem horyzontalnym i wertykalnym genów między szczepami (23, 34, 35). Przekazywanie materiału genetycznego między komórkami bakteryjnymi występuje zarówno u

drobnoustrojów patogennych dla człowieka/zwierząt jak i pośród bakterii saprofitycznych, w tym między bakteriami oportunistycznymi (warunkowo chorobotwórczymi).

Narastanie antybiotykooporności stwarza problem przede wszystkim w doborze efektywnej terapii antybakteryjnej zarówno u zwierząt, jak i u ludzi, i jest przyczyną trudno leczących się infekcji. Ponadto, u bakterii izolowanych z przypadków klinicznych, od drobiu i ludzi, coraz częściej stwierdzana jest wielolekooporność (multi-drug resistance), będąca wynikiem niewłaściwie prowadzonej terapii antybakteryjnej w stadach drobiu, czy medycynie ludzi. Skutkuje to nie tylko wzrastającym odsetkiem opornych szczepów, ale pośrednio, niesie również ze sobą zagrożenie dla zdrowia ludzi – konsumentów drobiu. Poprzez kontakt z drobiem, możliwym nosicielem opornych bakterii, a także produktami pochodzenia drobiowego zanieczyszczonymi opornymi bakteriami (np. podczas etapu wytrzewiania w zakładzie uboju drobiu) dochodzić może do przekazywania tych bakterii na ludzi. Stanowi to istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego w kontekście zawężania możliwości terapeutycznych oraz rozprzestrzeniania się genów oporności między bakteriami wchodzącymi w skład mikrobiomu przewodu pokarmowego różnych gospodarzy (drób – człowiek).

Ryzyko nabywania opornych bakterii od zwierząt jest wyższe u osób, które pozostają w ścisłym kontakcie ze zwierzętami lub produktami zwierzęcymi np. rolnicy, pracownicy rzeźni, lekarze weterynarii. Warto dodać, że narastająca oporność narzuca konieczność bardzo rozważnego stosowania substancji przeciwbakteryjnych zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej. Dlatego, zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie weterynaryjnych produktów leczniczych wszystkie państwa członkowskie miały do końca 2021 roku ustalić listę substancji przeciwbakteryjnych zarezerwowanych do stosowania u ludzi, a tym samym zakazanych do stosowania w medycynie weterynaryjnej. Wstępne prace pokazują, że całkowity zakaz stosowania w medycynie weterynaryjnej będzie dotyczył głównie preparatów z grupy fluorochinolonów, cefalosporyn III i IV generacji, polimyksyn i makrolidów. W ten sposób planowane jest stopniowe ograniczanie stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych, w tym antybiotyków, w produkcji zwierzęcej (43). Z podawaniem chemioterapeutyków u zwierząt wiąże się również problem minimalnych pozostałości tych substancji w produktach pochodzenia zwierzęcego. Śladowe ilości

chemioterapeutyków obecne w mięsie, jajach i innych produktach mogą w istotny sposób wpływać na rozwój zarówno oporności drobnoustrojów saprofitycznych jak i chorobotwórczych dla ludzi, które mogą być przenoszone poprzez żywność pochodzenia zwierzęcego na ludzi.

Każdego roku infekcje spowodowane przez lekooporne bakterie prowadzą do znacznej liczby zgonów u ludzi, a także są przyczyną istotnych strat finansowych generowanych z tytułu trudno leczących się zakażeń u ludzi w wielu krajach Unii Europejskiej (UE). Problem AMR rośnie na całym świecie i szacuje się, że rocznie z tego tytułu umiera na świecie około 700 tysięcy osób. Wg raportu opublikowanego w 2016 roku, brak monitorowania i ograniczania narastania antybiotykooporności szczepów bakteryjnych spowoduje, że do 2050 roku liczba zgonów spowodowanych przez lekooporne bakterie może być wyższa niż odsetek zgonów będących wynikiem chorób nowotworowych (40). Dlatego tak ważne jest ciągłe monitorowanie oraz badanie zjawiska oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe co pozwala na poznanie, analizę i opracowanie strategii walki z nią.

Zgodnie z Dyrektywą 2013/652/UE Komisji Europejskiej populacja drobiu (kury nioski, brojlery i indyki), trzody chlewnej, bydła oraz produkty pochodzenia zwierzęcego podlegają, od 1 stycznia 2014 r., obowiązkowi monitorowania pod kątem antybiotykooporności (9). Ponadto, według danych zgromadzonych przez Krajowy System Monitorowania Oporności Bakterii Jelitowych na Środki Przeciwdrobnoustrojowe (NARMS - National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria) kontroli antybiotykooporności powinny podlegać nie tylko patogeny jelitowe o potencjale zoonotycznym, ale również tzw. bakterie wskaźnikowe jak *E. coli*, *Enterococcus* spp. (8). Bakterie fizjologicznie bytujące w przewodzie pokarmowym ptaków, stanowiące skład naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego (np. *E. coli*, *Enterococcus* spp.), w przypadku dysfunkcji przewodu pokarmowego (*enteritis*, dysbakterioza) lub immunosupresji mogą stać się florą patologiczną (tzw. bakterie oportunistyczne). Ponadto monitorowanie antybiotykooporności wśród tych organizmów wskazuje na oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, które wykazują aktywność w stosunku do bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich (24).

Wspólna polityki państw europejskich, dotycząca produkcji bezpiecznej żywności, stała się podstawą do stworzenia koncepcji „One Health” (ang. Jedno Zdrowie), która opiera się na założeniu, że zdrowie ludzkie jest ściśle powiązane ze zdrowiem zwierząt i środowiska, tzn. pasza dla zwierząt, żywność dla ludzi, zdrowie zwierząt i ludzi oraz zanieczyszczenie środowiska są ze sobą ściśle powiązane. Konieczne zatem jest badanie czynników zakaźnych, które mogą przekraczać bariery gatunkowe i środowiskowe przemieszczając się między poszczególnymi składowymi Jednego Zdrowia. Chodzi tu głównie o choroby odzwierzęce przenoszone przez żywność (FBD – Food-Borne Diseases) jak kamylobakterioza, salmonelloza, kolibakterioza itp. Ponadto, ważnym aspektem projektu jest monitoring oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR – Antimicrobial Resistance) bakterii związanych z żywnością, które to mogą być przenoszone na ludzi i wywoływać różnego rodzaju stany chorobowe. Warto podkreślić, że tylko kompleksowe i zintegrowane działania w zakresie ochrony zdrowia ludzi i zwierząt, na każdym poziomie działań, mogą przyczynić się do ograniczenia występowania i rozprzestrzeniania zagrożeń związanych z żywnością.

Wśród bakterii izolowanych od drobiu i podlegających monitorowaniu oporności, ze względu na ich najczęstszą izolację z przypadków zatruc i zakażeń i pokarmowych u ludzi, na szczególną uwagę zasługują bakterie o potencjale zoonotycznym jak *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., czy bakterie komensalne wchodzące w skład mikrobiomu przewodu pokarmowego jak *E. coli*, *Enterococcus* spp. (14).

Bakterie z rodzaju *Campylobacter* są najczęstszą przyczyną zakażeń i zatruc pokarmowych w Europie (13) i należą do tzw. food-borne pathogens, czyli patogenów związanych z żywnością. Według raportów EFSA prevalencja zakażeń na tle *Campylobacter* u ludzi ma tendencję rosnącą, a szczególnie ważną rolę odgrywają dwa gatunki bakterii: *C. jejuni* oraz *C. coli*. W 2020 roku, według raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) oraz Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Zwalczenia Chorób (ECDC), w krajach Unii Europejskiej stwierdzono łącznie 120 946 zachorowań na kamylobakteriozę, w tym 414 w Polsce (14). W rozprzestrzenianiu się tych zakażeń najważniejszą rolę odrywają drób oraz produkty drobiowe. *Campylobacter* spp. to patogen powszechnie występujący w przewodzie pokarmowym różnych gatunków ptaków, w tym drobiu i najczęściej nie wywołujący objawów klinicznych choroby. Do gatunków najczęściej izolowanych od

ptaków należą: *C. jejuni*, *C. coli*, czy *C. lari*. W ostatnich latach odnotowano przypadki klinicznej postaci kamylobakteriozy, głównie w kur utrzymywanych w systemie wolnowybiegowym lub hodowanych na ściółce, której przyczyną był *Campylobacter hepaticus* (4-6). Zmiany anatomopatologiczne obejmowały liczne ogniska nekrotyczne w wątrobie, stąd nazwa jednostki - Spotty Liver Disease (SLD). Kamylobakterioza u ludzi objawia się silną biegunką najczęściej o charakterze samo-ograniczającym. W przypadkach osób z immunosupresją, dzieci, osób starszych może dochodzić do powikłań, które wymagają hospitalizacji. W literaturze opisywane są przypadki syndromu Guillain-Barré (ostra, zapalna choroba demielinizacyjna o podłożu autoimmunologicznym), syndromu Miller Fisher (ataksja, arefleksja, oftalmoplegia), czy reaktywnego *arthritis* będących wynikiem komplikacji przebytego zakażenia (32). Lekiem z wyboru w leczeniu kamylobakteriozy u ludzi jest erytromycyna (makrolid), ale również często stosuje się ciprofloksacynę (fluorochinolon) ze względu na jej szerokie spektrum przeciwbakteryjne. Alternatywnie, przy ogólnoustrojowej infekcji *Campylobacter* spp. stosuje się tetracyklinę. W przemyśle drobiarskim te środki przeciwdrobnoustrojowe są także stosowane, np. w leczeniu zaburzeń oddechowych lub żołądkowo-jelitowych. Stosowanie chemioterapeutyków z tych samych grup terapeutycznych, zarówno w weterynarii, jak i medycynie ludzkiej może nieść ze sobą ryzyko krzyżowej oporności szczepów izolowanych od drobiu i ludzi oraz możliwość przenoszenia opornych, a czasem nawet wieloopornych szczepów, przez produkty drobiowe, na ludzi. Konsekwencją tego jest występowanie trudno leczących się zakażeń u ludzi i znaczne ograniczenie możliwości terapeutycznych, w tym eliminacji z użycia ważnych chemioterapeutyków np. tzw. leków "ostatniej szansy". Transmisja bakterii opornych ze zwierząt na ludzi jest zależna od wielu czynników, jak np.: sposobu utrzymania zwierząt, typu produkcji, metody uboju, obróbki mięsa, czy nawet sposobu przygotowania posiłków. Do grup ryzyka, w których narażenie na zakażenie, a tym samym możliwość transmisji opornych bakterii jest większe, należą pracownicy ferm drobiu, lekarze weterynarii, czy pracownicy zakładów przetwórstwa mięsnego. Źródłem pałeczek z rodzaju *Campylobacter* jest głównie kontakt ze świeżym kałomoczem ptaków w przypadku pracowników ferm i lekarzy weterynarii lub kontakt z produktami drobiowymi zanieczyszczonymi tymi bakteriami w odniesieniu do pracowników zakładów przetwórczych i konsumentów (23).

Pałeczka *Escherichia coli* jest bardzo zróżnicowanym gatunkiem, szeroko rozpowszechnionym w środowisku naturalnym, zwłaszcza w glebie, wodzie i roślinach. Uznawana jest również za wskaźnikową bakterię komensalną, powszechnie izolowaną z mikrobiomu jelit zdrowych zwierząt i ludzi. *Escherichia coli* łatwo rozprzestrzenia się w środowisku dlatego nie dziwi fakt, że niektóre szczepy mogą ponownie infekować ludzi poprzez żywność pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego (52). Ze względu na nadmierne stosowanie antybiotyków w produkcji drobiarskiej i medycynie człowieka, presja selekcyjna jest bardzo wysoka, co skutkuje powstaniem szczepów *E. coli* opornych na różne leki, a geny lekooporności przenoszone przez te bakterie mogą być transmitowane na inne bakterie chorobotwórcze. Szczepy wielolekooporne charakteryzują się obecnością wielu genów warunkujących lekooporność, co skutkuje niewrażliwością na wiele różnych grup leków (22). Mutacje genetyczne lub nabycie genów oporności na antybiotyki, poprzez horizontalny transfer genów, może również skutkować występowaniem bakterii opornych na antybiotyki w całym środowisku (2). Stale rosnące zagrożenie związane z pojawianiem się opornych szczepów bakterii może być związane z ich zwiększoną zjadliwością, a wraz ze wzrostem oporności na antybiotyki wzrost zjadliwości może naturalnie ewoluować (18). Dlatego monitorując rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki, ważne jest aby również kontrolować rozprzestrzenianie się zjadliwości (47). Według raportu EFSA pałeczki *E. coli* izolowane od kurcząt rzeźnych w 2018 roku w Polsce charakteryzowały się opornością głównie na ampicylinę (85,6%), ciprofloksacynę (84%) i tetracyklinę (76,2%), natomiast odsetek szczepów opornych na kolistynę, jako jednego z przedstawicieli tzw. krytycznych antybiotyków, wynosił zaledwie 0,6%. Wielooporność charakteryzowaną jako jednoczesną niewrażliwość na co najmniej 3 różne klasy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych, odnotowano wśród 76,8% izolatów. Podobną tendencję zaobserwowano wśród szczepów *E. coli* pochodzących od indyków rzeźnych, gdzie oporność na ampicylinę stwierdzono u 71,2% badanych izolatów, oporność na tetracyklinę u 62,5% i na ciprofloksacynę u 62%, zaś wielooporność kształtowała się na poziomie 62% (14). Leczenie infekcji na tle *E. coli* staje się coraz bardziej skomplikowane z powodu pojawienia się oporności na większość środków przeciwdrobnoustrojowych pierwszego rzutu. Z biegiem lat oporność na cefalosporyny wśród członków

Enterobacteriaceae wzrosła głównie z powodu rozprzestrzeniania się β -laktamaz o rozszerzonym spektrum (ESBL) (46).

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* to oportunistyczne drobnoustroje, które mogą kolonizować przewód pokarmowy zdrowych ssaków, ptaków oraz ludzi, a w przypadku spadku odporności (immunosupresji), będącej wynikiem szczepień, współistniejących pierwotnych zakażeń bakteryjnych, czy dysbakteriozy dochodzić może do rozwoju klinicznych objawów na tle *Enterococcus* spp. (10, 11). W patologii drobiu istotną rolę odgrywają następujące gatunki: *E. cecorum*, *E. faecalis*, *E. faecium*, czy *E. hirae*, które są najczęściej izolowane od drobiu i mogą być przyczyną zakażeń związanych z zapaleniem wsierdza u kur, ziarniniakami wątroby u indyków, wodobrzuszem u kur oraz zapaleniem stawów, zapaleniem kości i szpiku lub zapaleniem pępka i woreczka żółtkowego u jednodniowych piskląt (12, 50). Obraz kliniczny choroby w dużej mierze uzależniony jest od gatunku izolowanej bakterii. W ostatnich latach, w wielkotowarowej produkcji drobiarskiej dominują zakażenia wywołane przez *E. cecorum*, manifestujące się zaburzeniami lokomotorycznymi, zapaleniem stawów kręgosłupa (Enterococcal Spondylitis – ES), czy zwyrodnieniem stawów kręgosłupa (Enterococcal Vertebral Osteoarthritis – EVOA) (12). U ludzi enterokoki są przyczyną zakażeń szpitalnych, najczęściej związanych z zakażeniami dróg moczowych, zapaleniem wsierdza, zakażeniami jamy brzusznej i miednicy, zaś najczęściej izolowanymi gatunkami są *E. faecalis* i *E. faecium*. W ostatnich latach obserwuje się rosnącą rolę enterokoków jako czynnika etiologicznego zakażeń u ludzi, drobiu a także zanieczyszczenia żywności, co stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Nadużywanie środków przeciwdrobnoustrojowych w medycynie człowieka i weterynarii prowadzi do selekcji opornych szczepów. Enterokoki są potencjalnymi wektorami rozprzestrzeniania się genów oporności wewnątrz lub poza rodzajem, np. dla innych bakterii wchodzących w skład mikrobiomu jelit. Izolacja od zwierząt konsumpcyjnych (w tym drobiu) enterokoków opornych na różne środki przeciwdrobnoustrojowe, stanowi wysokie ryzyko przeniesienia tych bakterii na ludzi. Według Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control) infekcje wywołane przez *E. faecalis* stanowią problem kliniczny w wielu krajach europejskich zwłaszcza ze względu na ich oporność na aminoglikozydy i wankomycynę. Co więcej, w drugiej połowie XX wieku w Europie, awoparcyna (antybiotyk glikopeptydowy)

była szeroko stosowana jako antybiotykowy stymulator wzrostu u drobiu oraz zwierząt gospodarskich (bydło, owce, kozy, świnie). Od 1997 roku stosowanie awoparcyny jako dodatku paszowego jest w Europie zakazane, jednakże jej długoletnie wykorzystanie w produkcji drobiarskiej mogło odegrać ważną rolę w selekcji szczepów opornych na wankomycynę (VRE – Vancomycin-resistant *Enterococcus*).

Ważnym elementem w badaniach nad antybiotykoopornością jest poznanie mechanizmów warunkujących oporność bakterii na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe, które są różnorodne i obejmują występowanie genów oporności, mutacje chromosomalne i/lub plazmidowe, a także wytwarzanie enzymów (o charakterze stałym lub indukowanym). Przykładem enzymów odpowiedzialnych za rozkład (unieczynnienie) antybiotyków β -laktamowych są β -laktamazy: β -laktamazy o rozszerzonym spektrum (ESBL), β -laktamazy AmpC (AmpC) i karbapenemazy. β -laktamazy odpowiedzialne są za oporność na różne antybiotyki β -laktamowe, w tym pochodne penicyliny (penemy), cefalosporyny (cefemy), monobaktamy i karbapenemy. Ze względu na duże znaczenie kliniczne tych antybiotyków, bakterie wytwarzające ESBL, AmpC i karbapenemazy stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi. Wiele karbapenemaz jest w stanie się rozkładać prawie wszystkie antybiotyki β -laktamowe, co sprawia, że bakterie, które je wytwarzają są wyjątkowo lekooporne. Niezwykle istotnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego jest coraz częstsze izolowanie od zwierząt oraz z produktów pochodzenia zwierzęcego wielolekoopornych bakterii (MDR - multidrug resistant), które mogą być przyczyną trudno leczących się infekcji u ludzi. Dodatkowo, geny oporności zlokalizowane na chromosomach lub ruchomych elementach, takich jak plazmidy, mogą być łatwo przenoszone między bakteriami (38).

Fluorochinolony to przykład chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych często stosowanych w medycynie weterynaryjnej ze względu na swoje szerokie spektrum działania względem tlenowych bakterii Gram-ujemnych oraz w mniejszym stopniu, bakterii Gram-dodatnich. Mechanizm działania fluorochinolonów polega na wiązaniu się z podjednostką A gyrazy DNA, enzymu odpowiedzialnego za prawidłowe zwijanie się nici DNA, co blokuje proces replikacji bakteryjnego DNA i doprowadza do śmierci komórki. Narastająca oporność na fluorochinolony jest wynikiem mutacji punktowych w regionie QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region) w genie *gyrA*, kodującym podjednostkę enzymu gyrazy DNA – podtyp II topoizomerazy. Najczęściej spotykaną mutacją

warunkującą oporność na fluorochinolony jest substytucja nukleotydów w kodonie 86 (Thr-86→Ile), czego wynikiem jest zamiana treoniny w izoleucynę. Za powstawanie oporności odpowiedzialne są również inne mutacje (substytucje), np. zastąpienie w kodonie 86 treoniny lizyną (Thr-86→Lys) lub alaniną (Thr-86→Ala), czy zastąpienie w kodonie 70 alaniny treoniną (Ala-70→Thr). Rzadziej spotykane są mutacje w kodonie 90 (Asp-90→Asn), czy w kodonie 104 (Pro-104→Ser), a ich rola w procesie narastania oporności nadal nie jest do końca wyjaśniona (26). Luo i wsp. (22) wykazali, że mutacje w genie *gyrA*, w kodonie 90 (Asp-90→Asn) lub kodonie 86 (Thr-86→Lys) odpowiedzialne są za pośredni stopień oporności szczepów *Campylobacter* spp. Powszechnie wiadomo, że *C. jejuni* oporny na ciprofloksacynę może łatwiej i szybciej kolonizować przewód pokarmowy drobiu niż izogeniczny, wrażliwy szczep *C. jejuni*, nawet przy braku presji selekcyjnej fluorochinolonami (33).

Istotną rolę w kształtowaniu się opornych na fluorochinolony szczepów *Campylobacter* spp. odgrywają również pompy, które aktywnie usuwają niekorzystne substancje z wnętrza komórki (tzw. efflux pumps). Efflux pumps to system pomp zlokalizowanych w błonie komórkowej bakterii, umożliwiający wyrzucanie niekorzystnych dla bakterii substancji na zewnątrz komórki. System pomp odpowiedzialnych za oporność na wiele chemioterapeutyków nosi nazwę CmeABC i jest kodowany w chromosomalnym DNA (53). Składa się on z: białek transportujących (CmeB), białek zbliżających do siebie błonę periplazmatyczną i zewnętrzną (CmeA) oraz białkowego czynnika zewnątrz błonowego (CmeC). Wszystkie te składowe należą do rodziny Resistance-Nodulation-cell Division (RND). CmeABC jest stale obecny w szczepach środowiskowych *Campylobacter* spp. i wykazuje szerokie spektrum w stosunku do substancji usuwanych z wnętrza komórki. Należą do nich: antybiotyki, chemioterapeutyki (szczególnie fluorochinolony), metale ciężkie, detergenty, sole żółciowe, czy barwniki. Sole żółciowe, jak wynika z badań Lin i Martinez (29), mogą wpływać na ekspresję CmeABC, dzięki czemu szczepy *C. jejuni* łatwiej dokonują kolonizacji jelita oraz obniżają wrażliwość *Campylobacter* spp. na chemioterapeutyki. Poza CmeABC, szczepy *C. jejuni* wykazują obecność dodatkowego systemu pomp o nazwie CmeDEF. CmeD stanowi białko kanału błony zewnętrznej komórki, zaś CmeE to białko związane z błoną periplazmatyczną a CmeF to transporter

wewnątrzłonowy. Badania przeprowadzone przez Akiba i wsp. (1) dowiodły równorzędnej roli CmeABC i Cme DEF w procesie usuwania chemioterapeutyków z wnętrza komórki.

Antybiotyki z grupy tetracyklin są powszechnie stosowane w medycynie weterynaryjnej oraz medycynie ludzkiej. Przede wszystkim wynika to z ich wysokiej skuteczności działania będącej efektem szerokiego spektrum antybakteryjnego wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, riketsji, chlamydii oraz mykoplazm. Analizując oporności bakterii na tetracykliny należy uwzględnić oporność niespecyficzną oraz specyficzną. Pierwsza związana jest z ograniczeniem transportu antybiotyku przez kanały zlokalizowane w błonie zewnętrznej, druga z osłabieniem wiązania antybiotyku z podjednostką 30S rybosomu. Za oporność na tetracykliny odpowiedzialne są geny *tet* zlokalizowane w plazmidowym (plazmidy koniugacyjne) lub chromosomalnym DNA bakterii (16, 39). Produkty tych genów, białka Tet, są odpowiedzialne za obniżenie zdolności wiązania się tetracyklin z podjednostką 30S rybosomu, czego wynikiem jest brak inhibicji syntezy łańcucha polipeptydowego w komórce bakteryjnej. U enterokoków, oporność na tetracykliny związana jest głównie z obecnością genów *tetM* i *tetO*, odpowiedzialnych za ochronę rybosomów przed przyłączeniem antybiotyku, a także genem *tetL* kodującym pompy eksportujące antybiotyki z wnętrza komórki (25, 42).

Antybiotyki aminoglikozydowe odznaczają się szerokim spektrum działania względem Gram-ujemnych pałeczek jelitowych (*Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp.), mniejszą aktywność wykazują wobec *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., czy *Mycobacterium* sp. Ich aktywność bakteriobójcza wiąże się z możliwością łączenia się z podjednostką 30S rybosomu, co doprowadza do syntezy białek błonowych o zmienionej konformacji przestrzennej i śmierci komórki. Przyczyną powstawania oporności na aminoglikozydy jest najczęściej inaktywacja enzymatycznej antybiotyku. Geny kodujące białka enzymatyczne zlokalizowane są na plazmidach lub w chromosomalnym DNA, zaś enzymy inaktywujące aminoglikozydy są syntetyzowane w cytoplazmie komórki a następnie transportowane do przestrzeni periplazmatycznej. W literaturze znane są geny strukturalne np. *aacA4*, *aphA-3*, czy *aphA-7* (*Campylobacter* spp.) lub *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* (*Enterococcus* spp.) odpowiedzialne za syntezę enzymów unieczyniających aminoglikozydy (3). Jak wykazały badania Costa i wsp. (3) obecność genu *aac(6')Ie-*

aph(2'') wśród izolatów *Enterococcus* spp. pozyskanych od ludzi wpływała na równoczesną oporność tych szczepów na antybiotyki pochodzące z innych klas – β -laktamy.

Do grupy antybiotyków szeroko wykorzystywanych zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej należy zaliczyć także makrolidy i polimyksyny, które charakteryzuje wysoka skuteczność oraz niski odsetek efektów ubocznych. Podczas gdy makrolidy wykazują efekt bakteriostatyczny wiążąc się z podjednostką 50S rybosomu i hamując syntezę białek bakteryjnych, polimyksyny działają bakteriobójczo poprzez konkurencję kationowych cząsteczek antybiotyku z jonami wapnia i magnezu, które zapewniają stabilizację lipopolisacharydu (LPS) obecnego w ścianie komórkowej Gram-ujemnych pałeczek. Wyparcie jonów z receptorów prowadzi do inaktywacji LPS oraz depolimeryzacji błony komórkowej i ucieczki ważnych składników z komórki bakteryjnej. Oporność szczepów *Campylobacter* spp. na makrolidy jest efektem mutacji w domenie V, w genie 23S rRNA, w pozycji 2075 (A→G) oraz 2074 (A→C) (homologiczne miejsca znajdują się w przypadku *E. coli* w pozycji 2058 i 2059). W pozycji 2074 dochodzi do transwersji adeniny cytozyną, natomiast w pozycji 2075 do tranzycji adeniny w guaninę. Mutacje te powodują zmianę strukturalną bakteryjnego rybosomu, przez co nie jest on w stanie wiązać się z antybiotykiem (15). W przypadku szczepów *Enterococcus* spp. za oporność na makrolidy odpowiedzialne są głównie geny *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC*) oraz gen *mef*, które mogą być przenoszone przez transpozony koniugacyjne, które z kolei mają zdolność przeskakiwania z chromosomalnego do plazmidowego DNA przez co pozwalają na przeniesienie i stałe dodawanie genów, takich jak te kodujące oporność na antybiotyki (17, 25, 41, 48).

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się substancji przeciwbakteryjnej – kolistynie, która jest antybiotykiem należącym do grupy polimyksyn (antybiotyków polipeptydowych). Polimyksyny działają silnie na bakterie Gram-ujemne, natomiast słabo na bakterie Gram-dodatnie, stosowane są w medycynie ludzkiej jako antybiotyki ostatniej szansy w przypadku trudno leczących się zakażeń lub infekcji powodowanych przez wielooporne szczepy bakteryjne, tzw. „superbakterie”. Kolistyna stosowana jest także w produkcji drobiarskiej w leczeniu i metafilaktyce zakażeń na tle *E. coli*, w przypadkach nieżytu żołądka i jelit (*gastroenteritis*), czy biegunce tła bakteryjnego. Za oporność bakterii na kolistynę odpowiedzialne są geny *mcr* zlokalizowane na plazmidach. Analiza *in silico* wykazała wysoką częstość ich występowania wśród szczepów *Enterobacteriaceae* izolowanych od

ludzi, zwierząt, z żywności i ze środowiska (28). Co więcej, oporność ta może być łatwo przenoszona na inne komórki bakteryjne podczas podziału komórkowego lub horyzontalnego transferu genów (np. koniugacji lub transdukcji) (27, 30). Warto zauważyć, że geny transferowane za pośrednictwem ruchomych elementów genetycznych (plazmidów) mogą być szybko rozprzestrzenione między gatunkami bakterii oraz między różnymi gospodarzami. Może być to wynikiem przenoszenia genów oporności w skutek krzyżowej kontaminacji między łańcuchami produkcji żywności, zwierzętami i ludźmi (31, 54). Wobec powyższego niezwykle istotne wydaje się monitorowanie i kontrolowanie tego zjawiska celem ograniczania możliwości narastania i rozprzestrzeniania kolistynooporności.

Obok narastania oporności, w tym wielooporności, bakterii czynnikami mającymi wpływ na zwiększenie ich potencjału zakaźnego są czynniki wirulencji a także zdolność tworzenia biofilmu. Szacuje się, że ponad 60% zakażeń bakteryjnych jest związanych ze zjawiskiem tworzenia biofilmów. Obecność czynników wirulencji umożliwia patogenom szybką kolonizację środowiska poprzez adhezję i/lub inwazję komórek gospodarza a także syntezę substancji wpływających na obniżenie możliwości obronnych organizmu. Zdolność tworzenia przez bakterie biofilmu, obok występowania genów oporności na chemioterapeutyki i genów wirulencji, jest cechą mającą wpływ na wzrost ich patogenności, ponieważ ułatwia adaptację do trudnych warunków środowiskowych (49). Pozwala bowiem na tworzenie dynamicznej, przestrzennie złożonej i wielowarstwowej struktury zawierającej bakterie otoczone macierzą zbudowaną głównie z polimerów cukrów i białek (extracellular polymeric substances – EPS). Formowanie biofilmu przez patogene bakterie jest uważane za główny czynnik wirulencji, zabezpieczający nie tylko przed niesprzyjającymi warunkami środowiska oraz mechanizmami odpowiedzi immunologicznej gospodarza, ale również przed ukierunkowanym działaniem środków przeciwbakteryjnych (37, 55). Szacuje się, że zakażenia o podłożu biofilmowym odpowiadają za blisko 80% wszystkich zakażeń obejmujących zwierzęta i ludzi. Bakterie chorobotwórcze wnikające do organizmu w postaci planktonicznej, po wstępnym etapie adhezji do komórek gospodarza, tworzą we wrotach zakażenia biofilm. Ważnym aspektem zakażeń bakteryjnych z towarzyszącym biofilmem jest fakt, że około 61% zakażeń odnotowywanych u ludzi ma pochodzenie zoonotyczne. Spożywanie produktów pochodzenia drobiowego, skażonego bakteriami wykazującymi silny potencjał formowania

biofilmu może przyczyniać się do występowania zakażeń, które nie są podatne na leczenie środkami przeciwdrobnoustrojowymi (36).

Istotną właściwością komórek bakteryjnych stanowiących integralną część biofilmu jest ich zwiększona oporność na działanie czynników zewnętrznych, w tym chemioterapeutyków. W porównaniu z formami planktonowymi bakterie wznoszące w formie biofilmu cechuje zwiększona, nawet 1000-krotnie, oporność na antybiotyki, czego konsekwencją jest rozwój przewlekłych i/lub nawracających zakażeń (26). Tolerancja biofilmu na działanie chemioterapeutyków zależy od wielu czynników m.in. gatunku bakterii, fazy wzrostu drobnoustrojów, obecności EPS (Extracellular Polymeric Substance - zewnątrzkomórkowa substancja polimerowa), indukcji mechanizmów oporności, czy produkcji enzymów degradujących antybiotyki. Macierz zewnątrzkomórkowa biofilmu stanowi mechaniczną barierę uniemożliwiającą dyfuzję antybiotyku w jego głąb, stąd też destrukcji ulegają jedynie komórki bakterii występujące na powierzchni biofilmu. Natomiast bakterie osiadłe w głębszych warstwach biofilmu są w stanie przetrwać zastosowaną antybiotykoterapię. Pomimo faktu, że antybiotykoterapia wciąż stanowi najpowszechniejszą metodę walki z zakażeniami bakteryjnymi, to jej skuteczność względem niszczenia biofilmu jest ograniczona. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bójcze (MBC) dla komórek bakteryjnych biofilmu są zazwyczaj znacznie wyższe, ok. 10-1000-krotnie, niż dla ich form planktonowych (19-21). Różnice te wynikają z odmiennych profili farmakokinetycznych i farmakodynamicznych dla środków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych wobec biofilmu oraz form planktonicznych bakterii. Istotne zatem wydaje się poznanie mechanizmów formowania i funkcjonowania biofilmu jako kluczowego postępowania niezbędnego do opracowania skutecznych i bezpiecznych strategii prewencji i zwalczania, zapobiegania oraz przeciwdziałania skutkom jego formowania.

Tworzenie biofilmu przez wielooporne szczepy bakterii stanowi aktualne i ważne wyzwanie dla ochrony zdrowia publicznego, szczególnie w kontekście zakażeń powodowanych przez patogeny groźne dla człowieka, a związane z żywnością pochodzenia zwierzęcego (np. drobiowego). Do takich drobnoustrojów należy zaliczyć przede wszystkim pałeczki z rodzaju *Campylobacter* oraz *Salmonella*, gdyż według raportów EFSA, to właśnie one są najczęstszą przyczyną zatruc i zakażeń pokarmowych u ludzi (13). Nie należy jednak

zapominać o rosnącej roli innych patogenów izolowanych od drobiu, np. *Escherichia coli*, czy *Enterococcus* spp., które obok wyżej wymienionych powinny podlegać stałemu monitoringowi antybiotykooporności oraz analizie czynników wirulencji, gdyż są doskonałym modelem indykatorowym w obserwacji tego zjawiska (50).

4.2.2. Uzasadnienie podjętych badań oraz cele badawcze

Narastanie oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe, szczególnie bakterii zoonotycznych oraz potencjalnie patogennych (oportunistycznych i wskaźnikowych), a także analiza czynników wpływających na zwiększenie ich patogenności (wirulencji) stanowi aktualny i ważny problem w produkcji drobiarskiej. Podjęte przeze mnie badania dobrze wpisują się w tę tematykę. Znajomość mechanizmów warunkujących lub wpływających na powstawanie antybiotykooporności, w tym wielooporności, u bakterii jest krokiem naprzód w poszukiwaniu rozwiązań mających na celu zachowanie skuteczności chemioterapeutyków w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej, co doskonale wpisuje się w strategię programu Jedno Zdrowie. W swoich badaniach, oprócz **oceny i analizy antybiotykooporności** skupiłam się na zależnościach między opornością a **występowaniem innych czynników wirulencji, jak genów zjadliwości, czy zdolności wybranych szczepów do formowania biofilmu**. Obecność różnych mechanizmów wpływających na zwiększenie niewrażliwości mikroorganizmów na substancje przeciwbakteryjne oraz na poprawę ich zdolności adaptacyjnych do niesprzyjających warunków środowiska stanowi nie tylko duże wyzwanie terapeutyczne, ale i zagrożenia wynikające z możliwości rozprzestrzeniania się tych szczepów w środowisku. Powszechnie wiadomo, że odporne bakterie mogą przekazywać sobie, na zasadzie koniugacji lub horyzontalnego transferu genów, geny oporności na chemioterapeutyki, zarówno w świetle jelita jak i w środowisku kurnika.

Ważnym aspektem prowadzonych przeze mnie badań nad szczepami *Campylobacter* spp. było również poszukiwanie **pewnych i szybkich technik identyfikacji tych bakterii**, poza metodami biochemicznymi, które często nie dają wiarygodnych wyników. Czuła i specyficzna diagnostyka *Campylobacter* jest niezmiernie ważna w kontekście potencjału zoonotycznego jakim odznaczają się te pałeczki. Nadmienię, że wg danych raportu EFSA z 2021 pałeczki *Campylobacter* były główną przyczyną zachorowań wśród ludzi (120,946 potwierdzonych przypadków/100 000 mieszkańców), dlatego też ich właściwa diagnostyka

jest tak ważna. Mając to na względzie podjęłam badania w zakresie zastosowania techniki MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Description Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) w diagnostyce laboratoryjnej zakażeń na tle *Campylobacter* spp.

Kontynuując badania z zakresu antybiotykooporności moje zainteresowania badawcze objęły występowanie genetycznej i fenotypowej oporności na kolistynę szczepów *E. coli* izolowanych od drobiu. Kolistyna należy do grupy polimyksyn, antybiotyków polipeptydowych ostatniej szansy w medycynie ludzkiej. Stosowanie antybiotyków z tej samej klasy w medycynie ludzkiej i medycynie weterynaryjnej może sprzyjać narastaniu odsetka szczepów opornych, które następnie mogą być transmitowane na ludzi poprzez produkty drobiowe. **Celem przeprowadzonych badań** było określenie prewalencji występowania genów *mcr*, związanych z opornością na kolistynę, w populacji szczepów *E. coli* izolowanych od różnych grup użytkowych ptaków, a następnie **charakterystyka ich profili oporności oraz analiza filogenetyczna, na podstawie uzyskanych widm białkowych**. Badania filogenetyczne pozwalają na określenie podobieństwa między badanymi izolatami oraz wskazać możliwe kierunki rozprzestrzeniania się szczepów w środowisku.

Mając na uwadze przedstawione dane postawiono następujące cele badawcze:

- **Cel 1:** Ocena kształtowania się fenotypowej i genetycznej oporności szczepów *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. oraz *Escherichia coli* izolowanych od kurcząt i indyków rzeźnych oraz od ludzi.
- **Cel 2:** Zastosowanie 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.
- **Cel 3:** Ocena zależności między zdolnością tworzenia biofilmu a antybiotykoopornością u szczepów *Enterococcus* spp. i *E. coli* izolowanych od różnych gatunków drobiu oraz od ludzi.
- **Cel 4:** Ocena prewalencji, charakterystyka oraz analiza filogenetyczna szczepów *Escherichia coli*, posiadających geny *mcr*, izolowanych od różnych gatunków drobiu.

Omówienie wyników osiągnięcia naukowego

Cel 1: Ocena kształtowania się fenotypowej i genetycznej oporności szczepów *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. oraz *Escherichia coli* izolowanych od kurcząt i indyków rzeźnych oraz od ludzi (publikacja 1, 2, 3).

Materiał do badań stanowiły szczepy własne, zgromadzone i wyizolowane od drobiu oraz szczepy kliniczne, pochodzące od ludzi, otrzymane z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Charakterystyka fenotypowa obejmowała analizę oporności badanych bakterii na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe, antybiotyki i chemioterapeutyki, stosowane powszechnie w leczeniu drobiu oraz ludzi. Celem badań była ocena kształtowania się odsetka opornych izolatów w kontekście badanych chemioterapeutyków oraz pochodzenia szczepów (drób/ludzie). Dodatkowo, ocenie poddano molekularne podstawy oporności - tj. występowanie mutacji, genów warunkujących oporność fenotypową badanych szczepów.

Ocena kształtowania się antybiotykooporności szczepów izolowanych od zwierząt konsumpcyjnych pośrednio stanowi wskaźnik racjonalnego lub nieracjonalnego, stosowania chemioterapeutyków u zwierząt lub ludzi. Zjawisko to przybiera na znaczeniu szczególnie w kontekście możliwego wertykalnego i horyzontalnego transferu genów oporności, który to może odbywać się nie tylko przez produkty pochodzenia zwierzęcego, ze zwierząt na ludzi, ale również w świetle samego jelita - między bakteriami. Badania wykonano z użyciem metody mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym, w celu oznaczenia najmniejszego stężenia hamującego - MIC (Minimal Inhibitory Concentration), dla szczepów *Campylobacter* spp. i *E. coli* (publikacja 1, 3), oraz metody dyfuzyjno-krążkowej na podłożu stałym dla szczepów *Enterococcus* spp. (publikacja 2).

Przeprowadzone badania wykazały wysoki odsetek szczepów *Campylobacter* spp. i *Enterococcus* spp. izolowanych od kurcząt rzeźnych i indyków, opornych na chinolony (ciprofloksacynę, kwas nalidyksowy) oraz tetracyklinę. Natomiast wśród szczepów *Enterococcus* spp. izolowanych od ludzi najwyższy odsetek izolatów charakteryzował się opornością na tetracyklinę, ciprofloksacynę oraz erytromycynę (publikacja 2). Natomiast w odniesieniu do szczepów *E. coli mcr-1* dodatnich, izolowanych od kurcząt rzeźnych i indyków, zaobserwowano wysoki odsetek szczepów opornych na ampicylinę, tetracyklinę, sulfonamidy, chloramfenikol i chinolony (publikacja 3). Stwierdzono, że stosowanie tych

samych chemioterapeutyków u różnych gatunków drobiu ma wpływ na narastanie oporności zarówno wśród szczepów oportunistycznych (wchodzących w skład mikrobiomu przewodu pokarmowego), jak i zoonotycznych. Otrzymane w badaniach (**publikacja 1, 3**) wysokie wartości MIC dla chinolonów, tetracykliny, ampicyliny i sulfonamidów, w ponad 90% poza skalą badanego chemioterapeutyku, dla szczepów *Campylobacter* spp. i *E. coli*, dodatkowo podkreślają skalę narastającej oporności. Analizując profile wielooporności stwierdzono brak izolatów wieloopornych wśród bakterii z rodzaju *Campylobacter*, natomiast odsetek wieloopornych szczepów *Enterococcus* spp. izolowanych od indyków i ludzi wynosił odpowiednio 43,14% oraz 32,14% (**publikacja 2**). Porównując wielooporność szczepów oportunistycznych - *Enterococcus* spp. izolowanych od indyków i *E. coli* pochodzących kurcząt rzeźnych, w obu grupach stwierdzono wyższy odsetek opornych na 6 różnych klas chemioterapeutyków szczepów, wynoszący odpowiednio 7,84% i 23,53% (**publikacja 2, 3**). Tak wysokiego odsetka nie zaobserwowano wśród szczepów *Enterococcus* spp. izolowanych od ludzi, gdzie wynosił on zaledwie 1,79%. Otrzymane wyniki wskazują na zdecydowanie wyższy odsetek szczepów opornych i wieloopornych wśród izolatów pochodzących od drobiu (kurczęta rzeźne, indyki) w porównaniu ze szczepami izolowanymi od ludzi.

Wszystkie badane izolaty, należące do różnych gatunków bakterii (*Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli*), poddano analizie w kierunku obecności genów/mutacji warunkujących tę oporność. Wśród szczepów *Campylobacter* spp. zaobserwowano, że wszystkie izolaty charakteryzujące się opornością na ciprofloksacyne posiadały mutację w genie *gyrA* w pozycji Thr-86, natomiast obecność genu *tetO* warunkującego oporność na tetracyklinę stwierdzono u 70% *C. jejuni* izolowanych od indyków i wszystkich szczepów (100%) *C. jejuni* pozyskanych od kurcząt rzeźnych. Geny *tetO*, czy *cmeB* (kodujące składową pompy efflux) identyfikowano również wśród szczepów wrażliwych na te antybiotyki, co wskazuje na różnorodne i często złożone mechanizmy oporności u tych bakterii (**publikacja 1**). Natomiast w badaniach nad genetyczną opornością szczepów *Enterococcus* spp. na wybrane chemioterapeutyki przeciwbakteryjne (**publikacja 2**) poszerzono zakres badanych genów oporności. Stwierdzono, że dominującym genem odpowiedzialnym z oporność na tetracyklinę wśród szczepów izolowanych od ludzi był gen *tetM* (85,71%), zaś obecność genu *tetO* stwierdzono u aż 53,57% izolatów. Wysoki odsetek szczepów klinicznych

(42,86%), izolowanych od ludzi, charakteryzowała obecność genu *ermB* warunkującego oporność na erytromycynę. Zdecydowanie wyższy odsetek szczepów posiadających geny *ermB* (68,63%) i *ermA* (17,65%) zaobserwowano wśród izolatów pochodzących od indyków rzeźnych, co może wskazywać na drób rzeźny jako możliwe źródło opornych i wieloopornych szczepów, niosących ze sobą geny oporności na różne chemioterapeutyki, które poprzez produkty pochodzenia drobiowego mogą być transmitowane na ludzi.

Kolejnym etapem prowadzonych badań była ocena występowania genów oporności u szczepów *E. coli*. Badania poszerzono o geny *mcr*, odpowiedzialne za oporność *E. coli* na kolistynę - lek ostatniej szansy w przypadku trudno leczących się infekcji u ludzi. Materiał, w postaci wymazów kałowych, pobierano od kurcząt i indyków rzeźnych oraz gęsi (**publikacja 3**). Do badań wytypowano łącznie 17 spośród 318 przebadanych izolatów (5,35%), które posiadały gen oporności na kolistynę - *mcr-1*. W każdej z badanych grup ptaków stwierdzono wysoki odsetek szczepów posiadających gen *blaTEV* (88,24%) warunkujący oporność na antybiotyki β -laktamowe; gen *tetA* (70,59%) odpowiadający za oporność na tetracykliny oraz geny warunkujące oporność na sulfonamidy – *sul1* i *sul2* (po 70,59%) oraz *sul3* (52,94%). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na niską prewalencję szczepów *E. coli* izolowanych od drobiu, posiadających geny oporności na kolistynę, mimo jej długoletniego stosowania w produkcji drobiarskiej. Natomiast 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. 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. 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).

Podsumowując, wykazałam, że drób jest źródłem opornych i wieloopornych szczepów bakteryjnych, zarówno o potencjale zoonotycznym (food-borne pathogens), jak również stanowiących fizjologiczną mikroflorę przewodu pokarmowego ptaków. Dowiodłam również, że za fenotypową oporność na badane chemioterapeutyki przeciwbakteryjne, odpowiedzialne są nie tylko geny lub mutacje warunkujące oporność na konkretny chemioterapeutyk, ale często jest ona powiązana z obecnością innych genów, np. kodujących składowe pomp *efflux*.

Cel 2: Zastosowanie 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 (publikacja 1).

Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń na tle *Campylobacter* spp., pomimo ciągłego jej doskonalenia, nadal nastrocza wielu problemów. Związane są one głównie z trudnościami interpretacyjnymi wykonanych testów biochemicznych, które często są niejednoznaczne i nie dają prawidłowej odpowiedzi na pytanie dotyczące gatunku izolowanej bakterii. Przyczyn tego należy dopatrywać się w specyficznych warunkach odżywczych i wzrostowych tych bakterii a także w możliwości występowania atypowych cech fenotypowych, które dodatkowo utrudniają identyfikację. W badaniach laboratoryjnych, do identyfikacji bakterii, wykorzystywane są zarówno metody fenotypowe, opierające się na specyficznych cechach biochemicznych i/lub strukturalnych bakterii, jak również metody molekularne (np. PCR, real-time PCR) bazujące na różnicach genetycznych między badanymi szczepami. O ile metody genetyczne stanowią specyficzne i czułe narzędzie diagnostyczne, metody opierające się na badaniu cech fenotypowych bywają zawodne i niejednoznaczne. Dlatego właśnie brak skutecznych metod diagnostycznych pozwalających na szybką i pewną identyfikację *Campylobacter* spp. na podstawie ich cech fenotypowych wpłynął na podjęcie przeze mnie badań mających na celu określenie przydatności zastosowania techniki MALDI-TOF MS do rutynowej diagnostyki.

Badaniom poddano łącznie 45 izolatów pochodzących od kurcząt i indyków rzeźnych. Jako kontroli w doświadczeniu użyto dwóch szczepów referencyjnych *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 i *Campylobacter coli* ATCC 33559. Wyniki badań dowiodły wysokiej specyficzności techniki MALDI-TOF MS w identyfikacji gatunkowej szczepów

Campylobacter spp., gdzie wynik otrzymany dla poszczególnych badanych izolatów wynosił od 2,03 do 2,43. Dla każdej badanej próbki, w kilku powtórzeniach, za każdym razem otrzymywano wynik jednoznacznie wskazujący na gatunek badanej bakterii. Jest to szczególnie ważne z perspektywy szybkiej i wiarygodnej diagnostyki zakażeń na tle *Campylobacter* spp., które stanowią główną przyczynę zatruc i zakażeń pokarmowych u ludzi, a których źródłem jest głównie drób i produkty pochodzenia drobiowego. Ponadto, technika MALDI-TOF MS, pozwala na tworzenie filogenetycznych dendrogramów określających podobieństwo profili białkowych badanych izolatów.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały wysoką skuteczność i powtarzalność techniki MALDI-TOF MS w identyfikacji gatunkowej szczepów *Campylobacter* spp. oraz w badaniach nad podobieństwem profili białkowych tych izolatów, która to technika może stanowić szybką, prostą i przede wszystkim wiarygodną alternatywę dla genotypowania.

Cel 3: Ocena zależności między zdolnością tworzenia biofilmu a antybiotykoopornością u szczepów *Enterococcus* spp. i *E. coli* izolowanych od różnych gatunków drobiu oraz od ludzi (publikacja 2, 3).

Kolejnym celem badawczym była ocena zależności między antybiotykoopornością (wieloopornością szczepów) a zdolnością tworzenia przez nie biofilmu. Zdolność formowania biofilmu przez bakterie jest uznawana za cechę, która wpływa na zwiększenie patogenności szczepów, ponieważ sprzyja przetrwaniu kolonii bakteryjnych w niesprzyjających warunkach, a tym samym czyni bardziej opornymi na czynniki środowiskowe, czy stosowane środki przeciwbakteryjne.

Materiał do badań stanowiły szczepy *Enterococcus* spp. pozyskane od indyków rzeźnych oraz ludzi (**publikacja 2**) a także szczepy *E. coli* mcr-1 dodatnie (**publikacja 3**), wyizolowane od kurcząt i indyków rzeźnych oraz gęsi. Badania wykazały istotnie statystycznie wyższy odsetek szczepów *Enterococcus* spp. izolowanych od indyków rzeźnych wykazujących zdolność do formowania silnego biofilmu, odpowiednio po 24 (98,04%) i 48 (100%) godzinach inkubacji w porównaniu ze szczepami *Enterococcus* spp. izolowanymi od ludzi - 80,36% po 24 i 100% po 48 godzinach inkubacji. Badania wykazały, że na powstawanie,

rodzaj oraz stabilność struktury biofilmu wpływ mają warunki oraz czas prowadzonej inkubacji odzwierciedlony wzrostem produkcji biofilmu w czasie. Natomiast w przypadku szczepów *E. coli*, niezależnie od badanej grupy ptaków, nie zaobserwowano tworzenia silnego biofilmu. Szczepy pochodzące od indyków rzeźnych cechowało tworzenie umiarkowanego (22,22%) lub słabego biofilmu, zaś u izolatów pochodzących od kurcząt rzeźnych stwierdzono formowanie umiarkowanego biofilmu na wyższym poziomie wynoszącym aż 57,14%. Pozostała część szczepów (42,86%) pochodzących od kurcząt rzeźnych formowała słaby biofilm (**publikacja 3**). Otrzymane wyniki wskazują na dużą różnicę w zdolności formowania biofilmu między bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi, które stanowią naturalny komponent fizjologicznej mikroflory przewodu pokarmowego ptaków, a które w niesprzyjających warunkach zoohigienicznych, stanach immunosupresji mogą powodować infekcje u drobiu. Porównując profile fenotypowej i genotypowej antybiotykooporności szczepów *Enterococcus* spp. i *E. coli* z ich zdolnością do tworzenia biofilmu stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy tymi cechami. Wielooporne szczepy *Enterococcus* spp. izolowane od drobiu i ludzi charakteryzowała zdolność formowania silnego biofilmu już po 24 h inkubacji, zaś u wieloopornych szczepów *E. coli* wytwarzających umiarkowany biofilm zaobserwowano równoczesną oporność na co najmniej 6 różnych klas chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych. Wśród szczepów izolowanych od indyków rzeźnych szczepy umiarkowanie biofilmujące wykazywały oporność na 6 różnych klas chemioterapeutyków, a wśród szczepów izolowanych od kurcząt rzeźnych na 6 (28,57%), 7 (14,29%) i aż na 8 (14,29%) różnych klas chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych.

Zdolność tworzenia biofilmu, jako strategia przetrwania w środowisku bakterii charakteryzujących się opornością i/lub wieloopornością na środki przeciwdrobnoustrojowe, stanowi skuteczny sposób ich przetrwania w środowisku dając im możliwość rozprzestrzeniania i przekazywania genów oporności między bakteriami.

Podsumowując, stwierdziłam, że zarówno szczepy o potencjale zoonotycznym (np. *Campylobacter* spp.), jak i szczepy oportunistyczne (np. *Enterococcus* spp., *E. coli*), wykazują zdolność tworzenia biofilmu w warunkach *in vitro*, którego poziom (słaby, umiarkowany lub silny) jest skorelowany z występowaniem fenotypowej i/lub genetycznej oporności. Wykazałam, że szczepy *Enterococcus* spp. izolowane od drobiu formowały silny

biofilm w krótszym czasie niż szczepy pochodzące od ludzi. Ponadto, wykazałam różnice w zakresie charakteru tworzonego biofilmu przez różne, wielooporne rodzaje bakterii - Gram-ujemne i Gram-dodatnie.

Cel 4: Ocena prewalencji, charakterystyka oraz analiza filogenetyczna szczepów *Escherichia coli*, posiadających geny *mcr*, izolowanych od różnych gatunków drobiu (publikacja 3).

Materiał do badań stanowiły szczepy wyizolowane w latach 2016-2020 od różnych typów użytkowych drobiu: kurcząt, indyków rzeźnych, stad rodzicielskich kur mięsnych, niosek towarowych, kaczek oraz gęsi. Wszystkie szczepy w łącznej liczbie 318 przebadano pod kątem obecności genów *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* i *mcr-5*, związanych z opornością bakterii na kolistynę. Badania wykazały niską prewalencję genów *mcr* wśród szczepów *E. coli* izolowanych od różnych gatunków drobiu, gdzie obecność genu *mcr-1* stwierdzono zaledwie u 5,35% badanych ptaków. Nie stwierdzono obecności innych genów (*mcr-2* – *mcr-5*) pośród badanych izolatów. Dominującym gatunkiem drobiu, od którego izolowano szczepy *E. coli* posiadające gen *mcr-1* był indyk rzeźny (52,94%), następnie kurczęta rzeźne (41,18%) i tylko jeden szczep izolowany od gęsi (5,88%). Ponadto dokonano oceny fenotypowej wrażliwości na kolistynę szczepów *E. coli* *mcr-1* dodatnich. Badania wykazały, że nie wszystkie szczepy posiadające gen *mcr-1* były odporne lub średniowrażliwe na ten antybiotyk. Zaledwie u 22,22% szczepów izolowanych od indyków rzeźnych stwierdzono fenotypową i genetyczną oporność na kolistynę, przy czym wśród izolatów pochodzących od kurcząt rzeźnych i gęsi było to odpowiednio aż 85,71% i 100% szczepów. Różnice te wynikać mogą z dodatkowych mechanizmów oporności (np. mutacji, genów), które nie zostały poddane ocenie w tym badaniu.

Jednocześnie w pracy podjęto nowatorskie badania dotyczące analizy porównawczej sekwencji genów metabolizmu podstawowego - MLST (Multilocus Sequence Typing) wieloopornych szczepów *E. coli*, *mcr-1* dodatnich. Wcześniej badania z tego zakresu nie były podejmowane u drobiu w Polsce. MLST pozwoliło na wyodrębnienie dziewięciu profili sekwencyjnych (STs) *E. coli*, spośród których ST93 był dominujący. Profile stwierdzone w badaniach własnych były również notowane w Europie oraz na innych kontynentach np. Azji, Ameryki Północnej, Australii, co świadczy o ich szerokim rozprzestrzenieniu w świecie.

Jednakże nasze badania pozwoliły na odkrycie nowych profili sekwencyjnych (ST117, ST1011), uprzednio nie stwierdzanych u drobiu. Analiza porównawcza ST117 i ST1011 z sekwencjami umieszczonymi w bazie EnteroBase pozwoliła na zidentyfikowanie ich jako najbardziej podobnych do kompleksu klonalnego ST69, obejmującego profile sekwencyjne stwierdzone w środowisku oraz izolowane od bydła w USA. Ponadto, analiza otrzymanych profili sekwencyjnych szczepów *E. coli mcr-1* dodatnich okazała się niezwykle przydatnym narzędziem do śledzenia i analizy możliwych dróg rozprzestrzeniania się szczepów, które mogą być transmitowane przez produkty drobiowe. Obecność takich samych profili sekwencyjnych została bowiem stwierdzona wśród szczepów izolowanych w Czechach od drobiu rzeźnego importowanego z Polski.

Podsumowując, dowiodłam niskiej prevalencji genów *mcr* wśród izolatów *E. coli* pochodzących od różnych gatunków drobiu. Po raz pierwszy stwierdziłam występowanie profili sekwencyjnych ST117 i ST1011 u drobiu w Polsce. Ponadto, wykazałam dużą przydatność metody MLST w analizie pokrewieństwa genetycznego izolatów *E. coli* pochodzących od różnych gatunków drobiu.

Podsumowując, przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały, że:

1. Drób jest źródłem opornych i wieloopornych szczepów bakterii z rodzaju *Campylobacter*, *Enterococcus* i *E. coli*.
2. Oporność bakterii z rodzaju *Campylobacter*, *Enterococcus* i *E. coli* na badane chemioterapeutyki przeciwbakteryjne jest wynikiem działania kilku mechanizmów oporności i nie jest uzależniona od występowania pojedynczych genów lub mutacji.
3. Obecność kilku mechanizmów oporności (genów, mutacji, pomp efflux) wpływa na poszerzenie spektrum oporności bakterii.
4. Bakterie izolowane od drobiu i ludzi charakteryzują się najwyższym odsetkiem oporności na tetracykliny, chinolony oraz β -laktamy.
5. Oporne i wielooporne szczepy *Enterococcus* spp. tworzą silny biofilm, podczas gdy oporne i wielooporne izolaty *E. coli* formują biofilm na słabym lub umiarkowanym poziomie.

6. Technika MALDI-TOF MS jest szybkim, wiarygodnym narzędziem do identyfikacji gatunkowej oraz badań w zakresie porównania widm białkowych dla bakterii z rodzaju *Campylobacter* i może stanowić alternatywę dla badań molekularnych.
7. Stwierdzono niską prevalencję genów *mcr* wśród izolatów *E. coli* pochodzących od różnych gatunków drobiu grzebiącego i wodnego.
8. Wykazano wysoki odsetek wieloopornych szczepów wśród izolatów *E. coli mcr-1*-dodatnich.

Piśmiennictwo:

1. Akiba M, Lin J, Barton YW, Zhang Q. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. J Antimicrob Chemother. 2006 Jan;57(1):52-60. doi: 10.1093/jac/dki419. Epub 2005 Nov 22. PMID: 16303882.
2. Brochier-Armanet C, Moreira D. Horizontal Gene Transfer in Microbial Ecosystems. In: Bertrand JC., Caumette P., Lebaron P., Matheron R., Normand P., Sime-Ngando T. (eds) Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications. 2015, Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2_12
3. Costa LBD, Corá LF, Correa FEL, Gabrielli LC, de Oliveira MR, Conceição N, Oliveira AG. High Prevalence of the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* Gene in Hospital Isolates of *Enterococcus faecalis* Co-Resistant to Gentamicin and Penicillin. Microb Drug Resist. 2019 Nov;25(9):1275-1281. doi: 10.1089/mdr.2018.0466. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31361553.
4. Courtice JM, Mahdi LK, Groves PJ, Kotiw M. Spotty Liver Disease: A review of an ongoing challenge in commercial free-range egg production. Vet Microbiol. 2018 Dec;227:112-118. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.08.004. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30473340.
5. Crawshaw TR, Hunter S, Wilkinson DA, Rogers LE, Christensen NH, Midwinter AC. Isolation of *Campylobacter hepaticus* from free-range poultry with spotty liver disease in New Zealand. N Z Vet J. 2021 Jan;69(1):58-64. doi: 10.1080/00480169.2020.1801532. Epub 2020 Sep 2. PMID: 32781921.
6. Crawshaw T. A review of the novel thermophilic *Campylobacter*, *Campylobacter hepaticus*, a pathogen of poultry. Transbound Emerg Dis. 2019 Jul;66(4):1481-1492. doi: 10.1111/tbed.13229. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31081981.
7. De Angelis G, Del Giacomo P, Posteraro B, Sanguinetti M, Tumbarello M. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae*. Int J Mol Sci. 2020 Jul 18;21(14):5090. doi: 10.3390/ijms21145090. PMID: 32708513; PMCID: PMC7404273.
8. Decyzja wykonawcza Komisji 2020/1729 z dnia 17 listopada 2020 r. w sprawie monitorowania i sprawozdawczości w zakresie oporności na środki

- przeciwdrobnoustrojowe u bakterii zoonotycznych i komensalnych oraz w sprawie uchylecia decyzji wykonawczej 2013/652/UE. Dz.U.UE.L.2020.387.8
9. Decyzja wykonawcza Komisji 2013/652/UE z dnia 12 listopada 2013 r. w sprawie monitorowania i sprawozdawczości w zakresie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u bakterii zoonotycznych i komensalnych. Dz.U.UE.L.2013.11.14
 10. Devriese LA, Cruz Colque JI, De Herdt P, Haesebrouck F. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *J Appl Bacteriol.* 1992 Nov;73(5):421-5. doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04998.x. PMID: 1447058.
 11. Devriese LA, Homme J, Wijfels R, Haesebrouck F. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J Appl Bacteriol.* 1991 Jul;71(1):46-50. PMID: 1910033.
 12. Dolka B, Chrobak-Chmiel D, Czopowicz M, Szeleszczuk P. Characterization of pathogenic *Enterococcus cecorum* from different poultry groups: Broiler chickens, layers, turkeys, and waterfowl. *PLoS One.* 2017 Sep 21;12(9):e0185199. doi: 10.1371/journal.pone.0185199. PMID: 28934313; PMCID: PMC5608366.
 13. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(12):6971, 324 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
 14. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA Journal* 2021;19(4):6490, 179 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>
 15. Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Trieber CA, Levesque S, Michaud S, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jul;49(7):2753-9. doi: 10.1128/AAC.49.7.2753-2759.2005. PMID: 15980346; PMCID: PMC1168676.
 16. Gibreel A, Tracz DM, Nonaka L, Ngo TM, Connell SR, Taylor DE. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Sep;48(9):3442-50. doi: 10.1128/AAC.48.9.3442-3450.2004. PMID: 15328109; PMCID: PMC514748.
 17. Giovanetti E, Brenciani A, Lupidi R, Roberts MC, Varaldo PE. Presence of the tet(O) gene in erythromycin- and tetracycline-resistant strains of *Streptococcus pyogenes* and linkage with either the mef(A) or the erm(A) gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Sep;47(9):2844-9. doi: 10.1128/AAC.47.9.2844-2849.2003. PMID: 12936983; PMCID: PMC182639.

18. Guillard T, Pons S, Roux D, Pier GB, Skurnik D. Antibiotic resistance and virulence: Understanding the link and its consequences for prophylaxis and therapy. *Bioessays*. 2016 Jul;38(7):682-93. doi: 10.1002/bies.201500180. Epub 2016 Jun 1. PMID: 27248008.
19. Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N. In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2683-90. doi: 10.1128/AAC.06486-11. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22354300; PMCID: PMC3346607.
20. Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep;55(9):4469-74. doi: 10.1128/AAC.00126-11. Epub 2011 Jun 13. PMID: 21670181; PMCID: PMC3165294.
21. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PØ, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011 Apr;3(2):55-65. doi: 10.4248/IJOS11026. PMID: 21485309; PMCID: PMC3469878.
22. Hu Y, Yang X, Li J, Lv N, Liu F, Wu J, Lin IY, Wu N, Weimer BC, Gao GF, Liu Y, Zhu B. The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Oct 27;82(22):6672-6681. doi: 10.1128/AEM.01802-16. PMID: 27613679; PMCID: PMC5086561.
23. Hull DM, Harrell E, van Vliet AHM, Correa M, Thakur S. Antimicrobial resistance and interspecies gene transfer in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from food animals, poultry processing, and retail meat in North Carolina, 2018-2019. *PLoS One*. 2021 Feb 11;16(2):e0246571. doi: 10.1371/journal.pone.0246571. PMID: 33571292; PMCID: PMC7877606.
24. Karp BE, Tate H, Plumblee JR, Dessai U, Whichard JM, Thacker EL, Hale KR, Wilson W, Friedman CR, Griffin PM, McDermott PF. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Two Decades of Advancing Public Health Through Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. *Foodborne Pathog Dis*. 2017 Oct;14(10):545-557. doi: 10.1089/fpd.2017.2283. Epub 2017 Aug 9. PMID: 28792800; PMCID: PMC5650714.
25. Kim YB, Seo KW, Jeon HY, Lim SK, Sung HW, Lee YJ. Molecular characterization of erythromycin and tetracycline-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken meats. *Poult Sci*. 2019 Feb 1;98(2):977-983. doi: 10.3382/ps/pey477. PMID: 30325436.
26. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014 Sep;78(3):510-43. doi: 10.1128/MMBR.00013-14. PMID: 25184564; PMCID: PMC4187679.
27. Li R, Xie M, Lv J, Wai-Chi Chan E, Chen S. Complete genetic analysis of plasmids carrying *mcr-1* and other resistance genes in an *Escherichia coli* isolate of animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Mar 1;72(3):696-699. doi: 10.1093/jac/dkw509. PMID: 27999050.

28. Li Y, Dai X, Zeng J, Gao Y, Zhang Z, Zhang L. Characterization of the global distribution and diversified plasmid reservoirs of the colistin resistance gene *mcr-9*. *Sci Rep*. 2020 May 15;10(1):8113. doi: 10.1038/s41598-020-65106-w. PMID: 32415232; PMCID: PMC7229202.
29. Lin J, Martinez A. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Nov;58(5):966-72. doi: 10.1093/jac/dkl374. Epub 2006 Sep 7. PMID: 16963459.
30. Liu J, Liu P, Feng F, Zhang J, Li F, Wang M, Sun Y. Evaluation of Potential ARG Packaging by Two Environmental T7-Like Phage during Phage-Host Interaction. *Viruses*. 2020 Sep 23;12(10):1060. doi: 10.3390/v12101060. PMID: 32977432; PMCID: PMC7598189.
31. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26603172.
32. Lopes GV, Ramires T, Kleinubing NR, Scheik LK, Fiorentini ÂM, Padilha da Silva W. Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog*. 2021 Dec;161(Pt A):105265. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105265. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34699927.
33. Luo, N., S. Pereira, O. Sahin, J. Lin, S. Huang, L. Michel, and Q. Zhang, Q. 2005. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:541–546.
34. Ma L, Konkel ME, Lu X. Antimicrobial Resistance Gene Transfer from *Campylobacter jejuni* in Mono- and Dual-Species Biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2021 Jul 13;87(15):e0065921. doi: 10.1128/AEM.00659-21. Epub 2021 Jul 13. PMID: 33990313; PMCID: PMC8276811.
35. Mishra S, Klümper U, Voolaid V, Berendonk TU, Kneis D. Simultaneous estimation of parameters governing the vertical and horizontal transfer of antibiotic resistance genes. *Sci Total Environ*. 2021 Dec 1;798:149174. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149174. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34375245.
36. Muhammad MH, Idris AL, Fan X, Guo Y, Yu Y, Jin X, Qiu J, Guan X, Huang T. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol*. 2020 May 21;11:928. doi: 10.3389/fmicb.2020.00928. PMID: 32508772; PMCID: PMC7253578.
37. Necidova L, Janstova B, Karpiskova S, Cupakova S, Duskova M, Karpiskova R. Importance of *Enterococcus* spp. For forming a biofilm. *Czech J Food Sci*. 2009; 27: 354-356
38. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*. 2009, 78, 119–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>
39. Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Trościanczyk A, Zieba 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. *Poult Sci*. 2017 Apr 1;96(4):986-996. doi: 10.3382/ps/pew365. PMID: 27702915.

40. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations: The Review on antimicrobial resistance. 2016, https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf
41. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Apr;44(4):967-71. doi: 10.1128/AAC.44.4.967-971.2000. PMID: 10722498; PMCID: PMC89799.
42. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Apr 15;245(2):195-203. doi: 10.1016/j.femsle.2005.02.034. PMID: 15837373.
43. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie weterynaryjnych produktów leczniczych i uchylające dyrektywę 2001/82/WE. D.U.U.E. 2019.1.7
44. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1831/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
45. Růžicková M, Vítězová M, Kushkevych I. The Characterization of *Enterococcus* Genus: Resistance Mechanisms and Inflammatory Bowel Disease. *Open Med (Wars)*. 2020 Apr 3;15:211-224. doi: 10.1515/med-2020-0032. PMID: 32292819; PMCID: PMC7147287.
46. Sabaté M, Prats G, Moreno E, Ballesté E, Blanch AR, Andreu A. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res Microbiol*. 2008 May;159(4):288-93. doi: 10.1016/j.resmic.2008.02.001. Epub 2008 Mar 7. PMID: 18434099.
47. Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes (Basel)*. 2017 Jan 18;8(1):39. doi: 10.3390/genes8010039. PMID: 28106797; PMCID: PMC5295033.
48. Scott KP. The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Dec;59(12):2071-82. doi: 10.1007/s000180200007. PMID: 12568333.
49. Sobisch LY, Rogowski KM, Fuchs J, Schmieder W, Vaishampayan A, Oles P, Novikova N, Grohmann E. Biofilm Forming Antibiotic Resistant Gram-Positive Pathogens Isolated From Surfaces on the International Space Station. *Front Microbiol*. 2019 Mar 19;10:543. doi: 10.3389/fmicb.2019.00543. PMID: 30941112; PMCID: PMC6433718.
50. Stępień-Pyśniak D, Hauschild T, Dec M, Marek A, Urban-Chmiel R, Kosikowska U. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. from yolk sac infections in broiler chicks with a focus on virulence factors. *Poult Sci*. 2021 Apr;100(4):100985. doi: 10.1016/j.psj.2021.01.008. Epub 2021 Jan 16. PMID: 33647720; PMCID: PMC7933482.
51. Suresh G, Das RK, Kaur Brar S, Rouissi T, Avalos Ramirez A, Chorfi Y, Godbout S. Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. *Crit Rev Microbiol*. 2018 May;44(3):318-335. doi: 10.1080/1040841X.2017.1373062. Epub 2017 Sep 11. PMID: 28891362.

52. Wolny-Koładka K, Lenart-Boroń A. Phenotypic and Molecular Assessment of Drug Resistance Profile and Genetic Diversity of Waterborne *Escherichia coli*. *Water Air Soil Pollut.* 2016;227:146. doi: 10.1007/s11270-016-2833-z. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27158170; PMCID: PMC4835524.
53. Yao H, Shen Z, Wang Y, Deng F, Liu D, Naren G, Dai L, Su CC, Wang B, Wang S, Wu C, Yu EW, Zhang Q, Shen J. Emergence of a Potent Multidrug Efflux Pump Variant That Enhances *Campylobacter* Resistance to Multiple Antibiotics. *mBio.* 2016 Sep 20;7(5):e01543-16. doi: 10.1128/mBio.01543-16. PMID: 27651364; PMCID: PMC5030363.
54. Ye H, Li Y, Li Z, Gao R, Zhang H, Wen R, Gao GF, Hu Q, Feng Y. Diversified *mcr-1*-Harbouring Plasmid Reservoirs Confer Resistance to Colistin in Human Gut Microbiota. *mBio.* 2016 Apr 5;7(2):e00177. doi: 10.1128/mBio.00177-16. PMID: 27048797; PMCID: PMC4817250.
55. Zarzecka U, Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W. Effects of osmotic and high pressure stress on expression of virulence factors among *Enterococcus* spp. isolated from food of animal origin. *Food Microbiol.* 2022 Apr;102:103900. doi: 10.1016/j.fm.2021.103900. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34809932.

5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową lub artystyczną realizowaną w jednej lub więcej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1. Pięciomiesięczny zagraniczny staż naukowo-badawczy

26.06 - 30.11.2012 - University of British Columbia, Land and Food Systems, Vancouver, Kanada

W 2012 roku, po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych, odbyłam 5-cio miesięczny staż naukowo-badawczy uczestnicząc w programie Food, Nutrition & Health, na wydziale Land and Food Systems Uniwersytetu British Columbia w Vancouver. Staż odbywał się w ramach przyznanego mi przez Fundację Dekabana stypendium naukowego "Dekaban Scholarship" dla młodych naukowców. W ramach stażu zostałam włączona do projektu naukowego, którego kierownikiem był Dr. Kevin Allen. Badania obejmowały analizę patogenności i antybiotykooporności szczepów *Listeria* spp. izolowanych z różnych produktów spożywczych. W trakcie odbywania stażu wykonałam testy określające wrażliwość badanych izolatów *Listeria* spp. na wybrane chemioterapeutyki przeciwbakteryjne oraz środki dezynfekcyjne a także przeprowadziłam testy adaptacji bakterii do niskich temperatur.

Efektom podjętej współpracy są 2 publikacje naukowe o łącznym IF równym 7,326:

- Kovacevic J, Arguedas-Villa C, **Wozniak A**, Tasara T, Allen KJ. Examination of food chain-derived *Listeria monocytogenes* strains of different serotypes reveals considerable diversity in inlA genotypes, mutability, and adaptation to cold temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Mar;79(6):1915-22. doi: 10.1128/AEM.03341-12.
- Kovacevic J, Sagert J, **Wozniak A**, Gilmour MW, Allen KJ. Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments. *Food Microbiol.* 2013 Jun;34(2):319-27. doi: 10.1016/j.fm.2013.01.002.

5.2. Staże szkoleniowe (warsztaty)

28.11 - 1.12.2017.2017 - Uniwersytet Piotra i Marii Curie, Paryż, Francja (Université Pierre et Marie Curie - Science et Médecine)

Staż szkoleniowy na Uniwersytecie Piotra i Marii Curie w Paryżu był kontynuacją zdobywanej przeze mnie wiedzy, jako pracownika naukowo-badawczego, z zakresu dobrostanu i procedur wykonywanych na zwierzętach laboratoryjnych (PoLlASA). Staż szkoleniowy organizowany był przez The Jackson Laboratory, Bar Harbour, USA, podczas których zdobyłam praktyczną wiedzę i umiejętności z zakresu postępowania i zabiegów chirurgicznych przeprowadzanych na wybranych zwierzętach laboratoryjnych. Szkolenie obejmowało wiedzę z zakresu anestezji i analgezji zwierząt laboratoryjnych, niezbędnej do przeprowadzenia zabiegów chirurgicznych. Podczas stażu samodzielnie wykonywałam iniekcje podskórne, dootrzewnowe oraz szereg zabiegów chirurgicznych jak: kastrację, wazektomię, splenektomię, adrenalalektomię, nefrektomię, tymektomię, owariektomię, transplantację jajnika, czy katetyzację żyły szyjnej. Zdobyta podczas stażu wiedza i umiejętności praktyczne zostały przeze mnie wykorzystane zarówno w celach naukowych, podczas wykonywania określonych procedur na zwierzętach laboratoryjnych, jak i w celach dydaktycznych, podczas prowadzenia zajęć praktycznych z zakresu chorób zwierząt egzotycznych, czy chorób zwierząt futerkowych ze studentami Wydziału Medycyny Weterynaryjnej.

1.04. - 30.09.2007 - staż kliniczny w ramach programu Socrates – Erasmus na Uniwersytecie Ludwig-Maximilians-Universität, München, Niemcy

W trakcie półrocznego stażu klinicznego na Uniwersytecie Ludwika Maksymiliana w Monachium zapoznałam się z protokołami diagnozowania, leczenia oraz zabiegów chirurgicznych przeprowadzanych u zwierząt egzotycznych (małe ssaki, ptaki oraz gady). Swoją staż odbywałam w różnych klinikach: Klinika Rozrodu i Chorób Wewnętrznych-Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik; Klinika Chirurgii Małych Zwierząt-Chirurgische Tierklinik; Klinika dla Ptaków, Gadów, Płazów i Ryb Ozdobnych-Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische Geflügelkrankheiten). Odbyty staż pozwolił mi na podniesienie wiedzy i umiejętności praktycznych wykorzystywanych podczas zajęć

dydaktycznych ze studentami Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

5.3. Szkolenia i kursy

- **13.09 - 15.09.2021** - brałam aktywny udział w szkoleniu on-line organizowanym przez The University of Tennessee, Knoxville, USA, którego tematem przewodnim było „Zapobieganie wykorzystywaniu wiedzy specjalistycznej podwójnego zastosowania oraz wiedzy ukrytej w Europie Środkowo-Wschodniej i krajach bałtyckich”. W trakcie 3-dniowego kursu szczegółowo zostały omówione zagadnienia związane z identyfikacją zagrożeń dotyczących wykorzystania badań podwójnego zastosowania - DURC (*ang.* Dual-Use Research of Concern), działaniami zmniejszającymi ryzyko w cyklu badań naukowych, a także zostały omówione najlepsze praktyki ochrony współpracy badawczej i wiedzy dotyczącej badań podwójnego zastosowania. Obok teorii ważnym elementem prowadzonego kursu była samodzielna oraz zespołowa praca uczestników nad opracowywaniem rozwiązań problemów dotyczących poszczególnych, omawianych zagadnień.
- **24.04.2020** - ukończyłam szkolenie on-line przeprowadzone przez Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu pt. “Obsługa platformy kształcenia zdalnego UPWr. Szkolenie on-line dla nauczycieli akademickich - poziom rozszerzony”
- **06.04.2020** - ukończyłam szkolenie on-line przeprowadzone przez Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu pt. “Co nauczyciel akademicki powinien wiedzieć o przepisach prawa autorskiego? Szkolenie on-line dla nauczycieli UPWr”
- **2015** - brałam czynny udział w szkoleniu PoLLASA (Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych), którego celem było zapoznanie się z aktualną wiedzą i przepisami prawa z zakresu dobrostanu oraz procedur przeprowadzanych na różnych gatunkach zwierząt laboratoryjnych (ptaki, małe ssaki).
- **2006** - brałam aktywny udział w szkoleniu i warsztatach praktycznych z zakresu biologii molekularnej organizowanym przez DNA Gdańsk pt. „Genotypowanie”, Gdańsk, 21-23.06.2006.

- **2006** - brałam czynny udział w szkoleniu organizowanym przez Państwowy Zakład Higieny w Warszawie pt. „Bakteriologiczna diagnostyka kamylobakteriozy u ludzi według rekomendacji WHO” Warszawa, 27-29.09.2006.

5.4. Współpraca z innymi instytutami i ośrodkami naukowymi

Współpraca z zespołem z Zakładu Weterynaryjnej Mikrobiologii Klinicznej, Katedry Weterynarii i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu w Kopenhadze, Dania (Section for Veterinary Clinical Microbiology, Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Denmark)

W 2021 roku, w ramach realizowanego tematu badawczego z zakresu antybiotykooporności i charakterystyki molekularnej szczepów *Gallibacterium anatis* izolowanych od drobiu, nawiązałam współpracę z prof. Andersem Miki Bojesenem z Uniwersytetu w Kopenhadze. Współpraca ma na celu dokonanie fenotypowej i molekularnej charakterystyki oraz analizy porównawczej szczepów *Gallibacterium* izolowanych od drobiu w Polsce oraz w Danii. Po zakończeniu badań planowana jest wspólna publikacja uzyskanych wyników.

Współpraca z zespołem z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

W latach 2017-2020 współpracowałam z dr inż. Martą Kuźmińską-Bajor z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności UPWr w ramach realizowanego projektu LIDER 378L-614_NCBR_2015 pt. “Preparaty bakteriofagowe dla drobiu przeciw bakteriom z rodzajów *Salmonella*, *Campylobacter* oraz ptasim patogennym *Escherichia coli* (APEC)”, którego byłam wykonawcą. Moja rola w projekcie obejmowała izolację szczepów *Campylobacter* spp. od różnych gatunków drobiu, ocenę zdolności tworzenia biofilmu przez te drobnoustroje oraz izolację bakteriofagów ze środowiska. Badania wykazały, że większość szczepów *Campylobacter* spp. nie posiadała silnych właściwości tworzenia biofilmu w środowisku. W trakcie prowadzonych badań wyizolowałam i wyselekcjonowałam szczep *Campylobacter jejuni* 3.4, wrażliwy na infekcje wieloma szczepami bakteriofagowymi, co w przyszłości może zostać skutecznie wykorzystane do selekcji i izolacji bakteriofagów przeciw pałeczkom z

gatunku *C. jejuni* z prób środowiskowych. Wykazałam, że wśród 10 szczepów *C. jejuni* i *C. coli*, tylko jeden szczep, *C. jejuni* 3.4, był wrażliwy na zakażenie siedmioma badanymi bakteriofagami, natomiast pozostałe 9 szczepów charakteryzowało się zmniejszoną wrażliwością na działanie badanych bakteriofagów. Ze względu na ważną i unikatową cechę szczepu *C. jejuni* 3.4, jaką jest wysoka wrażliwość na działanie bakteriofagów, izolat ten został zgłoszony do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej jako szczep do zastosowania w namnażaniu i izolacji bakteriofagów przeciw pałeczkom z rodzaju *Campylobacter*. Po przyznaniu patentu planowana jest publikacja osiągnięć w czasopiśmie z listy JCR.

Współpraca z zespołem z Zakładu Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie

W latach 2013-2016, wspólnie z zespołem prof. dr hab. Elżbiety Jagusztyn-Krynickiej z Uniwersytetu Warszawskiego prowadziłam badania dotyczące oceny immunogenności i skuteczności szczepień przeciwko kampylobakteriozie u kurcząt z wykorzystaniem wyselekcjonowanego szczepu *Salmonella* Typhimurium χ 9718, wytwarzającego białko CjaA *Campylobacter jejunii*.

Efektom podjętej współpracy są 2 publikacje naukowe o łącznym IF równym 5.199:

- Łaniewski P, Kuczkowski M, Chrząstek K, **Woźniak A**, Wszyńska A, Wieliczko A, Jagusztyn-Krynicka EK. Evaluation of the immunogenicity of *Campylobacter jejuni* CjaA protein delivered by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain with regulated delayed attenuation in chickens. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014 Jan;30(1):281-92. doi: 10.1007/s11274-013-1447-5.
- Godlewska R, Kuczkowski M, Wszyńska A, Klim J, Derlatka K, **Woźniak-Biel A**, Jagusztyn-Krynicka EK. Evaluation of a protective effect of in ovo delivered *Campylobacter jejuni* OMVs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Oct;100(20):8855-64. doi: 10.1007/s00253-016-7699-x.

Współpraca z zespołem z Katedry i Zakładu Farmakologii, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

W latach 2011-2013 współpracowałam z dr hab. Tomaszem Sozańskim, prof. UMW z Katedry i Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu prowadząc badania nad

wpływem wyciągu z owocu derenia jadalnego na koncentrację trójglicerydów i rozwój arteriosklerozy u królików z hipercholesterolemią.

Efektom podjętej współpracy była publikacja naukowa o IF równym 3.126, doniesienia konferencyjne, a także przyznany patent i Srebrny Medal na Międzynarodowych Targach Wynalazczości, Badań Naukowych i Nowych Techniki.

- Sozański T, Kucharska AZ, Szumny A, Magdalan J, Bielska K, Merwid-Ląd A, **Woźniak A**, Dzimira S, Piórecki N, Trocha M. The protective effect of the Cornus mas fruits (cornelian cherry) on hypertriglyceridemia and atherosclerosis through PPAR α activation in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine*. 2014 Nov 15;21(13):1774-84. doi: 10.1016/j.phymed.2014.09.005.
- Patent został udzielony przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, nr patentu PL-222598, autorzy: Sozański T, Kucharska AZ, Piórecki N, Szumny A, Szelał A, Trocha M, Merwid-Ląd A, Dziewiszek W, Dzimira S, **Woźniak A**, Magdalan J, Szumny D. „Preparat do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania stężenia lipidów, zwłaszcza trójglicerydów, suplement diety zawierający taki preparat oraz zastosowanie preparatu z owoców derenia jadalnego Cornus mas L. odmiany Raciborski do wytwarzania kompozycji do zapobiegania i leczenia chorób układu sercowonaczyniowego”. Data decyzji 19.10.2015 rok, o udzieleniu patentu ogłoszono dnia: 31.08.2016 WUP 08/16. Pkt. MNiSW: 30. Opatentowane rozwiązanie – wynalazek zostało ponadto, po uzyskaniu nr zgłoszenia patentowego (P-400211) przedstawione na 3 targach wynalazczości:
- Tomasz Sozański, Alicja Z. Kucharska, Antoni Szumny, Jan Magdalan, Małgorzata Trocha, Anna Merwid-Ląd, Narcyz Piórecki, **Anna Woźniak**, Stanisław Dzimira, Dorota Szumny, Adam Szelał.: The protective effects of Cornelian cherry lyophilisate on hypertriglyceridemia, atheromatic changes and oxido-redox state in hypercholesterolemic rabbits. XVIIIth International Congress of the Polish Pharmacological Society. Kazimierz Dolny, May 23-25, 2013. W: *Pharmacol.Rep.* 2013 Vol.65 suppl.; s.85
- Tomasz Sozański, Katarzyna Bielska, Alicja Z. Kucharska, Antoni Szumny, Jan Magdalan, Anna Merwid-Ląd, **Anna Woźniak**, Narcyz Piórecki, Małgorzata Trocha, Andrzej Ożyhar, Adam Szelał.: Enhancement of PPAR α protein expression in hypercholesterolemic rabbits by cornelian cherry fruits. The International Young Scientists Symposium "Plants in pharmacy & nutrition 2014". 30th May 2014; Wrocław Medical University, Faculty of Pharmacy, Wrocław, Poland. W: *Streszczenia*, 2014; s.113 poz. PS-65 ISBN 978-83-7055-590-0

- **2012 - Srebrny Medal** na Międzynarodowych Targach Wynalazczości, Badań Naukowych i Nowych Technik, Brussels INNOVA 2012, za projekt: Zastosowanie preparatu z odmiany uprawnej derenia właściwego (*Cornus mas L.*), wyselekcjonowanej w Europie do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów. Sozański T, Kucharska AZ, Piórecki N, Szumny A, Magdalan J, Trocha M, Merwid-Ląd A, **Woźniak A**, Dzimira S, Szumny D, Dziewiszek W, Szeląg A.

Udział w projektach badawczych:

- **2020 - 2022** - jestem Wykonawcą w projekcie współfinansowany ze środków unijnych, w ramach Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich na lata 2014 – 2020 (PROW 2014-2020) pt. "Wzrost konkurencyjności spółki na rynku drobiarskim poprzez wdrożenie innowacji dotyczących wylęgu piskląt w zakładzie wylęgowym w Wijewie" (nr umowy 00020.DDD.6509.00006.2018.04)
- **2016 – 2020** - pełniłam rolę Wykonawcy w projekcie LIDER VI nr 378/L-6/2014 finansowanym przez NCBiR pt. "Preparaty bakteriofagowe dla drobiu przeciw bakteriom z rodzajów *Salmonella*, *Campylobacter* oraz ptasim patogennym *Escherichia coli* (APEC)"
- **2018 - 2019** – byłam Wykonawcą w projekcie współfinansowany ze środków unijnych, w ramach Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich na lata 2014 – 2020 (PROW 2014-2020) pt. "Wzrost konkurencyjności na rynku poprzez wdrożenie innowacyjności produktowej, procesowej i marketingowej związanej z wylęgiem "Piskląt niemodlińskich" w zakładzie wylęgowym w Magnuszowicach (nr umowy 00002.DDD.6509.00014.2017.08)
- **2011 – 2014** - byłam Wykonawcą w projekcie finansowanym przez NCBiR nr 12 0126 10 pt. "Ptaki wolnożyjące jako rezerwuar ważnych bakteryjnych, wirusowych i pasożytniczych czynników chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt wolnożyjących"
- **2010 - 2013** - pełniłam rolę Wykonawcy w projekcie finansowanym przez NCN nr 19/9-W/2010/G pt. "Próba określenia wariantów patotypów *Escherichia coli* wywołujących kolibakteriozy drobiu w aspekcie plastyczności genomu bakterii związanej z transferem genów"

Udział w zadaniach badawczych:

- **2018** - byłam Kierownikiem zadania badawczego nr D210/0002/15 pt. "Występowanie białek ostrej fazy (BOF) u królików domowych" Projekt finansowany ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii KNOW dla Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
- **2016** - pełniłam rolę Kierownika zadania badawczego nr B030/0026/16 pt. "Występowanie zakażeń cytomegalowirusem (gpCMV) u kawii domowej"
- **2015** - byłam Kierownikiem zadania badawczego nr B030/0026/15 pt. "Występowanie i charakterystyka szczepów *Escherichia coli* produkujących toksynę Shiga (STEC) izolowanych od gołębi pocztowych (*Columba livia f. domestica*)"
- **2011- 2014** - pełniłam rolę Kierownika zadania badawczego pt. "Występowanie zakażeń wirusowych w stadach gołębi pocztowych (*Columba livia f. domestica*) na terenie Dolnego Śląska". Badania finansowane były z projektów: 4/GW/2011, MWet/736/2013/SC, MWet/285/2012/SC i MWet/401/2014/SC

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Działalność dydaktyczna

Jestem współautorem rozdziału „Patologia płuc i okolicy okołopłucnej” w **podręczniku akademickim** dla studentów medycyny weterynaryjnej i lekarzy weterynarii „Choroby drobiu” pod redakcją prof. dr hab. Michała Mazurkiewicza i prof. dr hab. dr h.c. Aliny Wieliczko, wydanie III. Zawarta w podręczniku najnowsza wiedza z zakresu chorób drobiu stanowi poszerzenie i uzupełnienie wiedzy zdobytej podczas studiów a także dużą pomoc merytoryczną w praktyce lekarza weterynarii, specjalisty chorób drobiu.

6.1.1. Zajęcia dydaktyczne

Od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich prowadzę zajęcia obligatoryjne (wykłady i ćwiczenia) oraz fakultatywne, w języku polskim i angielskim, dla studentów English Division

oraz studentów programu Erasmus, na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Szacunkowa liczba godzin wykładów i ćwiczeń przeprowadzonych przeze mnie w roku akademickim została przedstawiona w tabeli poniżej:

Nazwa przedmiotu	Obligatoryjne (O)/ Fakultatywne (F)	Ćwiczenia (h)	Wykłady (h)
Przedmioty polskojęzyczne - PL			
Choroby ptaków	O	85	6
Choroby ptaków - staż kliniczny	O	70	---
Zoonozy	O	6	---
Choroby zwierząt egzotycznych	F	30	---
Choroby gołębi *	F	120	---
Przedmioty anglojęzyczne - ENG			
Avian Diseases	O	9	9
Avian Diseases - clinical internship	O	5	---
Zoonoses	O	2	---
Diseases of Fur Animals *	O	15	10
Exotic Animal Diseases *	F	30	---
Pigeon Diseases *	F	30	---
Veterinary Care for Exotic Animals *	F	20	---

* W przypadku wymienionych przedmiotów obligatoryjnych i fakultatywnych, prowadzonych w języku polskim i/lub angielskim, jestem twórcą ich programu i koordynatorem:

- Diseases of Fur Animals / III rok
- Pigeon Diseases / VI rok
- Exotic Animal Diseases / V rok

- Veterinary Care for Exotic Animals / VI rok
- Choroby gołębi / VI rok

Przedmioty te znajdują się w ofercie przedmiotów dostępnych dla studentów dyscypliny “weterynaria” Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu i co roku cieszą się dużą popularnością.

Od 2018 roku prowadzę wykłady oraz ćwiczenia praktyczne, w tym staże kliniczne, z zakresu chorób ptaków ozdobnych i gołębi dla lekarzy weterynarii, słuchaczy **Szkolenia Specjalizacyjnego** w ramach kształcenia podyplomowego „Choroby drobiu i ptaków ozdobnych” (Specjalizacja nr 5).

6.1.2. Promotorstwo prac magisterskich i doktorskich

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych, pełniłam funkcję promotora oraz recenzenta prac magisterskich.

Promotor prac magisterskich:

- **2015** - pełniłam funkcję **promotora pracy magisterskiej** studenta Uniwersytetu Wrocławskiego, Wydziału Nauk Biologicznych, kierunku Mikrobiologia, Jakuba Burdzy, pt. “Charakterystyka fenotypowa i genotypowa szczepów *Enterococcus* spp. izolowanych od ludzi i drobiu”

Recenzent prac magisterskich:

- **2018** - pełniłam funkcję **recenzenta pracy magisterskiej** studentki Uniwersytetu Wrocławskiego, Wydziału Nauk Biologicznych, kierunku Mikrobiologia, Aleksandry Kosztowniak, pt. “Porównawcza charakterystyka wybranych czynników wirulencji w korelacji do lekooporności szczepów *Escherichia coli* wywołujących kolibakteriozę u ptaków”
- **2018** - pełniłam funkcję **recenzenta pracy magisterskiej** studentki Uniwersytetu Wrocławskiego, Wydziału Nauk Biologicznych, kierunku Mikrobiologia, Kingi Sławińskiej, pt. “Porównawcza charakterystyka czynników wirulencji szczepów *Escherichia coli*”

wywołujących kolibakteriozę u ptaków, w korelacji do oporności na bakteriobójczą aktywność surowicy”

- **2015** - pełniłam funkcję **recenzenta pracy magisterskiej** studentki Uniwersytetu Wrocławskiego, Wydziału Nauk Biologicznych, kierunku Mikrobiologia, Alicji Lubańskiej, pt. “Oporność szczepów *Campylobacter* spp. na wybrane chemioterapeutyki oraz analiza mechanizmów warunkujących tę oporność”

6.1.3. Opieka naukowa nad badaniami prowadzonymi przez studentów

Od 2013 roku sprawowałam opiekę naukową nad pracami badawczymi realizowanymi przez studentów dyscypliny “weterynaria”, należących do Studenckiego Koła Naukowego (SKN) “Mephitis” Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu:

- **2019** - opiekun naukowy pracy badawczej “Występowanie *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp. u ptaków ozdobnych na terenie Wrocławia i okolic - potencjalne źródło antropozoonozy” realizowanej przez Natalię Kwaśną, IV rok. Wyniki badań prezentowane były on-line podczas XXV Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych i XXXVII Sejmiku SKN, Wrocław 2020 r., gdzie praca została wyróżniona w konkursie dla młodych naukowców. Ponadto wyniki badań były prezentowane podczas organizowanej on-line II Ogólnopolskiej Konferencji Weterynaryjnej RESSONNVet, 11.04.2021. Tytuł wykładu: *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp. u ptaków ozdobnych na terenie Wrocławia i okolic – potencjalne źródło antropozoonozy.
- **2018** - opiekun naukowy pracy badawczej “Występowanie białek ostrej fazy (BOF) u królików domowych” realizowanej przez Aleksandrę Podolak, studentkę Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Wyniki badań prezentowane były podczas XXII Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych i XXXIV Sejmiku SKN, Wrocław 2018 r., gdzie praca zajęła I miejsce w konkursie organizowanym dla młodych naukowców. Dodatkowo, studentka była zaangażowana w realizację projektu nt. występowania *Toxoplasma gondii* u królików domowych oraz w przygotowanie artykułu naukowego prezentującego wyniki badań w czasopiśmie z listy JCR: **Woźniak-Biel A, Podolak A.** Comparison of seroprevalence and PCR results in the detection of *Toxoplasma gondii* in pet rabbits in Poland. Vector Borne Zoonotic Dis. 2020 Apr;20(4):281-284. Ponadto,

Aleksandra Podolak została **stypendystką Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** za wybitne osiągnięcia na rok akademicki 2018/2019 dla studentów i doktorantów.

- **2018** - publikacja artykułu, przygotowanego wspólnie ze studentką medycyny weterynaryjnej Aleksandrą Podolak, w Magazynie Weterynaryjnym, Zeszyt Edukacyjny "Choroby zwierząt egzotycznych", pt. "Wybrane problemy neurologiczne królików domowych oraz ich diagnostyka", luty 2018, pp. 57-65.
- **2016** - opiekun naukowy pracy badawczej "Występowanie zakażeń cytomegalowirusem (gpCMV) u kawii domowej" realizowanej przez Małgorzatę Ponikowską, studentkę Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Wyniki badań prezentowane były podczas XXI Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych i XXXIII Sejmiku SKN, Wrocław, 19-20 maja 2016 r., gdzie praca została wyróżniona w konkursie dla młodych naukowców. Dodam, że dzięki zaangażowaniu oraz swojej aktywności naukowej Małgorzata Ponikowska była **stypendystką Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** za wybitne osiągnięcia na rok akademicki 2017/2018 dla studentów i doktorantów.
- **2016** - opiekun merytoryczny doktorantki **Olena Lapa (Ukraina)** odbywającej staż naukowy w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, w ramach organizowanego międzynarodowego programu stypendialnego
- **2015** - opiekun naukowy pracy badawczej "Występowanie i charakterystyka wybranych zakażeń bakteryjnych u gołębi pocztowych (*Columba livia f. domestica*)" realizowanej przez Igora Przegralka i Marka Malka, studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Wyniki badań prezentowane były podczas XX Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych i XXXII Sejmiku SKN, Wrocław, 14 maja 2015 r., gdzie praca została **wyróżniona w konkursie dla młodych naukowców.**
- **2013** - opiekun naukowy pracy badawczej "Współczesne metody motywacji gołębi pocztowych jako naturalny doping w lotach konkursowych" realizowanej przez Wojciecha Panka, studenta Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Wyniki badań prezentowane były podczas XVIII Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych i XXX Sejmiku SKN, Wrocław, 16-17 maja 2013 r., gdzie praca została **wyróżniona w konkursie dla młodych naukowców.**
- **2012** - opiekun naukowy pracy badawczej "Charakterystyka lekooporności *Trichomonas columbae* izolowanych od gołębi pocztowych" realizowanej przez Wojciecha Panka,

studenta medycyny weterynaryjnej. Wyniki badań prezentowane były podczas VIII Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych oraz XX Sejmiku SKN, Wrocław, 19 maja 2012 r., gdzie praca została **wyróżniona w konkursie dla młodych naukowców**.

- **2011** - opiekun merytoryczny doktoranta **Nikola Rokvic (Serbia)** odbywającego staż naukowy w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, w ramach organizowanego międzynarodowego programu stypendialnego

6.2. Działalność popularyzatorska:

- **2017** - przeprowadziłam wykład oraz ćwiczenia praktyczne w języku angielskim dla studentów English Division należących do **Międzynarodowego Stowarzyszenia Studentów Weterynarii (IVSA)** pt. "Clinical examination and diseases of domestic pigeons", Wrocław, 22.02.2017 r.
- **2016** - przeprowadziłam wykład dla studentów medycyny weterynaryjnej oraz lekarzy weterynarii podczas **Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych** „Egzotyka Okiem Praktyka” pt. Problemy weterynaryjne w chowie i hodowli ptaków egzotycznych, Wrocław, 28.05.2016.
- **2015** - przeprowadziłam **warsztaty praktyczne** nt. "Badanie kliniczne zwierząt egzotycznych" dla uczniów Technikum Weterynaryjnego z Powiatowego Zespołu Szkół nr 1 w Krzyżowicach
- **2013** - przeprowadziłam wykład pt. "Aktualne problemy w hodowli gołębi pocztowych" dla studentów medycyny weterynaryjnej, Wrocław, 23.01.2013 r.
- **2010 – obecnie** - jestem autorem i/lub współautorem 8 publikacji o charakterze popularnonaukowym, szczegółowo wymienionych w pkt. II.3 i II.5 Załącznika nr 5 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.
- **2005 - 2017** - prowadziłam praktykę lekarsko-weterynaryjną dla zwierząt egzotycznych w ambulatorium Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W trakcie przyjmowania pacjentów **towarzyszyli mi studenci medycyny weterynaryjnej**, chcący pogłębiać swoją wiedzę z zakresu profilaktyki i leczenia chorób zwierząt egzotycznych.

- **2006 – 2009** - byłam twórcą i koordynatorem przedmiotu fakultatywnego w języku polskim dla studentów medycyny weterynaryjnej “Choroby zwierząt laboratoryjnych”
- **2006** - wygłosiłam wykład pt. „Influenza ptaków – aktualne zagrożenia” na IX Dolnośląskim Festiwalu Nauki, Wrocław, 14-16.10.2006

6.3. Działalność wdrożeniowa:

- **2019 - 2021** – opracowanie i wdrożenie innowacyjnej metody wylęgu kurcząt rzeźnych tzw. “piskląt niemodlińskich” w warunkach polepszanego dobrostanu w wylęgarni “ModernHatch”, które zostało odznaczone nagrodą Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w zakresie wdrażania postępu w rolnictwie, rozwoju wsi i rynkach rolnych (2021)
- **2016** - wdrożenie na rynek, na podstawie uprzednio uzyskanego patentu, preparatu farmakologicznego pod nazwą “Preparat do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów”. Numer patentu: 222598.
- **2012** – uzyskanie patentu nr PK/1637/AR obejmującego “Zastosowanie preparatu z odmiany uprawnej derenia właściwego (*Cornus mas* L.) wyselekcjonowanej w Europie do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów”

6.4. Działalność organizacyjna oraz przynależność do Stowarzyszeń:

- **2021 – obecnie** – jestem Członkiem grupy eksperckiej w zakresie zoonoz, zaangażowanej we wdrożenie w Polsce projektu ZODIAC (Zoonotic Disease Integrated Action) na lata 2021-2025, którego krajowym koordynatorem jest dr hab. Mirosława Polaka (PIW-PIB, Puławy)
- **2019 - obecnie** – jestem Członkiem Zarządu Polskiego Oddziału Międzynarodowego Stowarzyszenia Lekarzy Weterynarii Kolumpotalogów (IVPA - International Veterinary Pigeons Association), którego celem jest zrzeszanie specjalistów zajmujących się rozwijaniem i promocją medycyny gołębi poprzez edukację jego członków oraz społeczności weterynaryjnej
- **2018 - obecnie** – jestem Członkiem Komisji ds sprawozdawczości i informacji o działalności badawczej przy Radzie Dyscypliny Weterynaria (POLON). Moim zadaniem jest koordynowanie działań mających na celu dokładne i sprawne przygotowanie danych do ewaluacji działalności naukowej Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt

Egzotycznych oraz wprowadzanie danych dotyczących Dyscypliny Weterynaria do systemu POL-on i PBN

- **2017 – obecnie** - jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych
- **2017 - obecnie** – jestem Członkiem Zespołu ds. planów i rozkładów zajęć dla dyscypliny Weterynaria (Planista, USOS)
- **2005 - obecnie** – jestem Członkiem Komitetu Organizacyjnego odbywającej się corocznie międzynarodowej Konferencji Naukowej pt. „Aktualne problemy w patologii drobiu”, organizowanej przez prof. dr hab. dr *h.c.* Alinę Wieliczko z Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Uniwersytetu Przyrodniczego we współpracy z Sekcją Fizjologii i Patologii Ptaków Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych. Do 2022 roku łącznie zostało zorganizowanych 51 Konferencji Naukowych, z czego 14 z moim udziałem.
- **2019 - 2020** - byłam Członkiem Komisji Skrutacyjnej przy Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
- **2018 i 2020** - byłam Członkiem Komitetu Organizacyjnego II i III Międzynarodowej Konferencji Technicznej “Eimeriana Avia” organizowanej przez prof. dr hab. Andrzeja Gawła (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) oraz prof. dr hab. Piotra Szeleszczuka (SGGW, Warszawa)
- **2016 – 2020** - pełniłam rolę członka Komisji Dziekańskiej ds. informacji o działalności naukowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
- **2008 - 2018** - byłam odpowiedzialna za sporządzenie corocznego sprawozdania Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych w zakresie działalności naukowej, w tym realizowanych badaniach statutowych jednostki, w celu ewaluacji działalności naukowej Katedry
- **2011 i 2015** - byłam członkiem Wydziałowej Komisji Wyborczej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
- **2011** - byłam członkiem Komisji Rekrutacyjnej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
- **2011** - byłam członkiem Wydziałowej Komisji Stypendialnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

W 2010 roku, tuż po obronie pracy doktorskiej, objęłam stanowisko adiunkta w Zakładzie Chorób Ptaków, Zwierząt Egzotycznych, Futerkowych i Laboratoryjnych w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych. W ówczesnym czasie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu otworzył nabór studentów anglojęzycznych (English Division) na kierunek "weterynaria" (Wydział Medycyny Weterynaryjnej). Z związku z tym z podjęłam się zadania opracowania treści kształcenia dla wybranych przedmiotów obligatoryjnych i fakultatywnych w języku polskim i angielskim, które mogłyby wzbogacić ofertę przedmiotów wybieralnych dla studentów polsko- i anglojęzycznych (Diseases of Fur Animals, Exotic Animal Diseases, Pigeon Diseases, Choroby gołębi, Veterinary Care For Exotic Animals. Aby zapewnić studentom jak najlepsze przygotowanie praktyczne do zawodu lekarza weterynarii podjęłam, już w okresie wakacyjnym, kilkutygodniowy staż szkoleniowy obejmujący doskonalenie wiedzy oraz praktyki z tego zakresu. Ponadto, rozpoczęłam podyplomowe studia specjalizacyjne w zakresie utrzymania i chorób zwierząt futerkowych (Kierownik: dr hab. Jan Siemionek, prof. UWM). Równolegle podjęłam się opracowania). Stworzone przeze mnie kursy oraz realizacja podjętych wyzwań, są wynikiem mojego dużego zaangażowania w rozwój dydaktyki w obszarach medycyny weterynaryjnej zwierząt egzotycznych, futerkowych i gołębi. Przedmioty te corocznie cieszą się niestąbnącym zainteresowaniem ze strony studentów medycyny weterynaryjnej, gdyż są dla nich źródłem nie tylko wiedzy teoretycznej, ale również umiejętności praktycznych (źródło: niezależne ankiety wypełniane przez studentów).

Dodatkowo, w ramach stale podnoszonych przeze mnie kompetencji dydaktycznych, w 2022 r. ukończyłam kurs dla nauczycieli akademickich Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z zakresu metodyki Problem Based Learning, który organizowany był w ramach projektu „POWER na UPWr – kompleksowy program rozwoju uczelni” i współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

8. Nagrody i wyróżnienia:

W trakcie swojej pracy naukowej otrzymałam liczne wyróżnienia oraz nagrody, które potwierdzają wysoki poziom prowadzonych przeze mnie badań naukowych:

8.1. Nagrody naukowe:

- **2020** - Nagroda Zespołowa II Stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia naukowe
- **2018** - Nagroda zespołowa I stopnia za cykl 4 prac opublikowanych w 2017 r. poświęconych roli adenowirusów oraz drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella* i *Campylobacter* w patologii ptaków gospodarskich oraz wolno żyjących.
- **2015** - Nagroda Zespołowa I Stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia naukowe w szczególności za cykl trzech publikacji poświęconych diagnostyce i roli drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella* i *Campylobacter* w patologii ptaków i gadów
- **2014** – III miejsce w rankingu osiągnięć naukowych przedstawionych przez nauczycieli akademickich ze stopniem naukowym doktora, zatrudnionych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UPWr
- **2013** – Dyplom Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu za projekt pod nazwą: "Zastosowanie preparatu z odmiany uprawnej derenia właściwego (*Cornus mas L.*), wyselekcjonowanej w Europie do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów". Twórcy: Tomasz Sozański, Alizja Z. Kucharska, Narcyz Piórecki, Antoni Szumny, Jan Magdalan, Małgorzata Trocha, Anna Merwid-Ląd, **Anna Woźniak**, Stanisław Dzimira, Dorota Szumny, Wojciech Dziewiszek, Adam Szeląg.
- **2012** - Srebrny medal w kategorii Młody Wynalazca na 61 Targach Wynalazczości, Badań Naukowych i Nowych Techniki, Brussels Innova, "Zastosowanie preparatu z odmiany uprawnej derenia właściwego (*Cornus mas L.*) wyselekcjonowanej w Europie do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów", praca zbiorowa, 15-17.11.2012 r. Twórcy: Tomasz Sozański, Alizja Z. Kucharska, Narcyz Piórecki, Antoni Szumny, Jan Magdalan, Małgorzata Trocha, Anna Merwid-Ląd, **Anna Woźniak**, Stanisław Dzimira, Dorota Szumny, Wojciech Dziewiszek, Adam Szeląg.

- **2012** - Nagroda Indywidualna I Stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za cykl publikacji
- **2012** - Nagroda Zespołowa I Stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia naukowe a w szczególności za współautorstwo w cyklu trzech publikacji z 2011 r. poświęconych wrażliwości bakterii z rodzaju *Campylobacter* na wybrane chemioterapeutyki i przeciwbakteryjne
- **2012** - Zdobywczyni I Nagrody w "Konkursie na najlepszą pracę doktorską im. Jana Karola Kostrzewskiego z zakresu epidemiologii". Konkurs organizowany był przez Fundację „Zdrowie i Środowisko”, której Prezesem był prof. dr hab. Wiesław Jędrychowski

8.2. Nagrody wdrożeniowe:

- **2021** – Nagroda Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi Rzeczypospolitej Polskiej za osiągnięcia w zakresie wdrażania postępu w rolnictwie, rozwoju wsi i rynkach rolnych; "Wdrożenie innowacyjnej metody wylęgu kurcząt rzeźnych tzw. "piskląt niemodlińskich" w warunkach polepszonych dobrostanu w wylęgarni "ModerHatch"

8.3. Nagrody dydaktyczne:

- **2020** - Nagroda Zespołowa III Stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia dydaktyczne
- **2013** - Nagroda Zespołowa I Stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia dydaktyczne
- **2010** - Dyplom Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za opracowanie materiałów dydaktycznych w języku angielskim i prowadzenie zajęć ze studentami w ramach programu Erasmus-Sokrates oraz English Division z zakresu chorób wewnętrznych, parazytologii weterynaryjnej i epizootiologii

8.4. Nagrody organizacyjne:

- **2020** - Nagroda Zespołowa II Stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia organizacyjne
- **2015** - Nagroda Zespołowa I Stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia organizacyjne w szczególności za organizację w latach 2003-2014 dziesięciu konferencji naukowych oraz współorganizację dwóch sesji w ramach Kongresów PTNW nt. "Aktualne problemy w patologii drobiu"
- **2011** - Podziękowanie Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za zaangażowanie w organizację Dni Przyrodników oraz godną wyróżnienia współpracę i aktywność

Wrocław, 23 maja 2022 r.

.....

podpis